



universidade federal de pelotas
CDTec
centro de desenvolvimento tecnológico

PPGB

Programa de
Pós Graduação
em Biotecnologia



X SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
VI MOSTRA ACADÊMICA

ANAIIS
VI **MOS**
TRA
ACADÊMICA

SUSTENTABILIDADE NA
ERA4.0

NOVEMBRO/2022

SUMÁRIO

001 - MARIA EDUARDA BICCA DODE	01
VII DESAFIO MURAL G BIOTEC E A SUSTENTABILIDADE	
002 - GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO.....	04
Análises de genômica estrutural em TCPs de morango (<i>Fragaria x ananassa Duch.</i>)	
003 - AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO.....	08
Obtenção de vetores e desenho de primers para edição gênica por CRISPR/Cas em morango (<i>Fragaria x ananassa Duch.</i>)	
004 - YURI RIBEIRO DIOGO.....	12
DIETAS PROTEICAS COMO SUBSTITUTOS DE PÓLEN PARA ABELHAS AFRICANIZADAS	
005 - PATRÍCIA MIRANDA-PINTO.....	16
DESCOBERTA DE POTENCIAIS BIOMOLÉCULAS PARA USO COMO ANTIBIÓTICOS DA COLEÇÃO DE CULTURA DA FUNDAÇÃO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO	
006 - RAQUEL MOREIRA OLIVEIRA.....	20
EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA OVOALBUMINA E DA TEMPERATURA DO SPRAY DRYING NA MICROENCAPSULAÇÃO DE PRÓPOLIS	
007 - CAMILA OLIVEIRA PACHECO.....	24
MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FIBRAS DE ZEÍNA COM EXTRATO DE CEBOLA ROXA (<i>ALLIUM CEPA L.</i>)	
008 – Jéssica Leal Batista.....	28
Isolamento e seleção de bactérias potencialmente acumuladores de fósforo (e produtoras de polihidroxialcanoatos (PHAs)	
009 - Miriam Duarte.....	31
Variação na forma, tamanho e dimorfismo sexual em <i>Philodryas aestiva</i> e <i>Pseudablades patagoniensis</i> (Serpentes: Dipsadidae) a partir de análises de morfometria geométrica	
010 – RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ.....	35
LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i> EFEITO PROBIÓTICO E	

A IMUNOMODULAÇÃO DE VACINA CONTRA SARS COV 2

- 011 - ANTÔNIO DUARTE PAGANO.....39
GENÔMICA ESTRUTURAL APLICADA AO MONITORAMENTO AMBIENTAL
DE PEIXES ANUAIS *Austrolebias charrua*
- 012 - JULIE MEDEIROS DA SILVEIRA.....43
RESULTADOS PRELIMINARES DE UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A
RELAÇÃO ENTRE O MARCADOR DE CÉLULAS TRONCO OCT4 E A PROTEÍNA DE
EFLUXO ABCB1 NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS
- 013 – ANA VITÓRIA COSTA.....47
Imunogenicidade de vacina recombinante contra *Lawsonia intracellularis*
em equinos
- 014 - GIULIANA PETIZ ZUGNO.....51
GPN NAS REDES SOCIAIS: UM RELATO DESSA TRAJETÓRIA DURANTE A
PANDEMIA
- 015 - MARIA CHRISTINA WILLE.....55
FISIOPODCAST
- 016 - ALICE CALDERIPE DE LIMA.....58
PROJETO CINE BIOTEC: UMA PROPOSTA
- 017 - ELDER PACHECO DA CRUZ.....62
MEMBRANA DE FIBRAS ULTRAFINAS DE AMIDO DE BATATA-DOCE COM
EXTRATO DA CASCA DE CEBOLA ROXA: MORFOLOGIA E MOLHABILIDADE
- 018 - GRACIELE SARAIVA LEMOS.....66
PERFIL DE TEXTURA DE OLEOGÉIS A BASE DE AMIDO DE MILHO E ARROZ
INCORPORADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA
- 019 - YAGO PIRES.....70
Genes da família *FaWRKY* como potenciais alvos para o melhoramento
gênico mediado por CRISPR-Cas9 em morango (*Fragaria x ananassa*
Duch.)
- 020 - JEAN RODRIGUES OLIVEIRA DE SOUSA.....74
Classificação de dados de metagenoma para detecção de vírus de interesse
em saúde humana: monitoramento ambiental de SARS-Cov-2 como um caso
de estudo
- 021 - GEORGE WASHINGTON ALVES CARDOSO.....78
PROSPECÇÃO DE CIRCNRNAS PUTATIVOS EM BANCOS DE
RNASEQ DE MORANGO (*Fragaria x ananassa*) SUBMETIDOS A
ESTRESSES OSMÓTICOS
- 022 - GABRIELA BEHREND NEITZKE.....82

EFEITO DE DOSES DE CARVÃO ATIVADO NA MICROPROPAGAÇÃO DE AMORA, CV. TUPY

023 - VINICIUS FLORES DE SOUZA.....86

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DAS PROTEÍNAS DA SUPERFAMÍLIA AP2/ERF NO GENOMA DA OLIVEIRA

024 - MARIA CHRISTINA WILLE.....90

ESTUDOS PRELIMINARES DE SUBSTRATO PARA MICROVERDES DE ALFACE MIMOSA

025 - GUSTAVO RETZLAF MAAS.....94

Isolamento de uma levedura selvagem *Saccharomyces cerevisiae* com potencial para produção de cerveja

026 - JULIA NOBRE BLANK CAMOZZATO.....98

EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES PARA RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE SÊMEN NA SEGREGAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS SEMINAIS DE BOVINOS

027 – LIVIA FRATICELLI NEVES.....102

BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA

028 - KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS.....106

Estudo prévio da biodegradação de P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum* RS corados com cúrcuma e urucum.

029 - SARAH KALLI SILVA DA SILVA.....110

Microencapsulação de *Lactocaseibacillus casei* CSL3 por *spray drying* aplicado à simulação do trato gastrointestinal

030 - ANA PAULA BONATO WILLE.....114

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE OXADIAZOL IN VITRO

031 - TAYNÁ AMARAL VELEDA.....118

EFEITO DO TRATAMENTO COM TIAZOLIDINONA SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

032 - HENRIQUE GONÇALVES PEGORARO.....122

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE *Iridea cordata* NA FASE CISTOCÁRPICA DE DESENVOLVIMENTO CONTRA *Trichomonas vaginalis*

033 - LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS.....126

Efeitos moleculares da exposição de *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953) frente a exposição à herbicida a base de glifosato

VII DESAFIO MURAL G BIOTEC E A SUSTENTABILIDADE

MARIA EDUARDA BICCA DODE¹; KETHLIN DE QUADROS FERREIRA²,
YAGO PIRES³, LUCIANA BICCA DODE⁴;

¹Universidade Federal de Pelotas – dudadode@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas -kethlin04@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- yagopires022@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas-,=lucianabicca@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Fundamentada no tripé ensino-pesquisa-extensão, a formação acadêmica além de agregar conhecimento científico e tecnológico preparando futuros profissionais, também participa da popularização da ciência e da tecnologia na sociedade. A relevância da extensão na promoção da interação e troca de saberes com a comunidade é reforçada por Paula (2013). Contudo, para popularizar conhecimento cientificamente embasado em áreas em constante inovação, a academia deve também desmistificar temas pouco conhecidos e algumas vezes equivocadamente interpretados. *"Atuar fora dos muros da universidade é desafiador já que a população desconhece a biotecnologia, as denominações técnicas e as bases científicas de inúmeros processos cotidianos, exigindo uma adequação do discurso para cada novo público"* (Dode ; Chaves, 2020; p. 835-836).

Ainda que a extensão universitária tenha surgido com objetivo de proporcionar educação continuada, a atividade extensionista vem ampliando significativamente sua atuação a medida que possibilita que as universidades assumam de forma abrangente seu compromisso social (RODRIGUES, et al., 2013). Atividades extensionistas de popularização da ciência e tecnologia que reforçam o compromisso pelo desenvolvimento sustentável proporcionam espaços capazes estimular vivências significativas e promover a reflexão crítica sobre a necessidade de mudanças locais e globais. Contudo, durante o distanciamento social imposto pela pandemia de Covid 19 a manutenção da necessária interação com a comunidade constituiu um grande desafio da extensão (SATO, 2021).

Biotecnologia Invade a Escola e Mural G Biotec em Tempos de Distanciamento Social contempla uma proposta que engloba a releitura de diferentes projetos de extensão: Biotecnologia Invade a Escola, Mural G Biotec e Desafio Mural G Biotec (DODE ;CHAVES, 2020) adaptando a necessária discussão sobre a sustentabilidade à nova realidade. Estratégias combinadas de ensino e extensão e atividades remotas geraram diferentes ações para divulgação dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ONU, 2020). Para promover de forma mutuamente articulada a percepção da urgência de ações e atitudes em prol do desenvolvimento sustentável durante o período de

distanciamento social também exigiu novas dinâmicas, contribuindo para aquisição de habilidades e competências baseadas nas tecnologias da informação e comunicação e fortemente ancoradas nas redes sociais. O objetivo deste trabalho é relatar o VII Desafio Mural G Biotec uma ação do projeto Biotecnologia Invade a Escola e Mural G Biotec em Tempos de Distanciamento Social e seus resultados.

2. METODOLOGIA

O Projeto Biotecnologia Invade a Escola a Mural G Biotec em Tempos de Distanciamento Social contempla ações de extensão propriamente ditas e eventos com prazo de execução está compreendido entre agosto de 2021 e abril de 2023. A fim contribuir para a popularização da ciência e tecnologia durante o período de isolamento social, atividades foram propostas utilizando-se redes sociais on line e ambientes virtuais da UFPEL, combinando diferentes ferramentas digitais e estratégias de comunicação.

O VII Desafio Mural G Biotec foi um evento aberto a instituições de ensino superior, escolas e empresas. Através de edital foram estabelecidas as regras para participação no certame que em 2021 contemplou as modalidades de postagens para divulgação nas redes sociais e também vídeos curtos que deveriam atender a temática "Sustentabilidade: os desafios da ciência e da tecnologia no pós pandemia".

O evento teve o cronograma divulgado no perfil @MURAL.G.BIOTEC (Instagram) e na fã page MURALGBIOTEC (Facebook) com amplo compartilhamento e visibilidade nas mídias sociais. Os trabalhos inscritos foram avaliados quanto a adequação ao tema, forma de abordagem, tempo de apresentação, criatividade e impacto, sendo selecionados trabalhos destaque em cada modalidade. A divulgação dos trabalhos dos resultados aconteceu dia 09/11/2021, no VI Espaço Ciência, durante o IX Simpósio de Biotecnologia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O VII Desafio recebeu propostas de diferentes áreas de conhecimento, reunindo interessante material sobre sustentabilidade e sua importância no pós pandemia. Os vídeos "Tecnologia e automação ligada a agricultura" e "Agricultura sustentável: do quintal de casa para o mundo" e os posts "Plantas inseticidas"; "Compostagem e minhocultura" e "Erradicação da fome e agricultura sustentável" trouxeram importantes reflexões sobre a importância da sustentabilidade na agricultura enquanto os posts "Cosmetologia Natural e Clean Beauty", "Sustentabilidade na área de medicina veterinária" e "Pensando nos ODS, oportunidade de mudança de comportamento" trouxeram a tona abordagens mais específicas a respeito da produção e do consumo sustentável em diferentes áreas. A articulação entre os colaboradores, organizadores e a comunidade participante ocorreu eficientemente de forma remota, síncrona ou



assíncrona, reforçando que a extensão pode ocorrer integrando distintas estratégias.

4. CONCLUSÕES

A reflexão crítica sobre o papel da ciência e da tecnologia no desenvolvimento sustentável no período pós pandemia é uma das necessidades geradas ao longo processo iniciado com o ensino remoto emergencial. O VII Desafio como ação do projeto unificado Biotecnologia Invade a Escola e Mural G biotec em Tempos de Distanciamento Social cumpriu seu papel na popularização da ciência com a produção e divulgação dos materiais produzidos.

5. REFERÊNCIAS

DODE, L.B., CHAVES, A.L.S. Mural G Biotec: 10 anos, p.835-836. In: **A extensão universitária nos 50 anos da Universidade Federal de Pelotas** [recurso eletrônico] / org. Francisca Ferreira Michelin, Ana da Rosa Bandeira. – Pelotas : UFPel. PREC; Ed. da UFPel, 2020. 843 p.

NAÇÕES UNIDAS. Como as Nações Unidas apoiam os objetivos do desenvolvimento sustentável no Brasil. Disponível em: <https://brasil.in.org/pt-br/sdgs>.

PAULA, J. A. de A extensão universitária: história, conceito e propostas. **Interfaces: Revista de Extensão da UFMG**, v.1, n.1, p.5-23, 2013.

RODRIGUES, A. L. L.; COSTA, C. L. N. do A.; PRATA, M. S.; BATALHA, T. B. S.; PASSOS NETO, I. de F. Contribuições da extensão universitária na sociedade. **Caderno de Graduação - Ciências Humanas e Sociais - UNIT - SERGIPE**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 141–148, 2013. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/cadernohumanas/article/view/494>. Acesso em: 19 out. 2022.

SATO, O. Extensão se reinventa em tempos de pandemia. Disponível em: <https://ifms.edu.br/noticias/2021/extensao-se-reinventa-em-tempos-e-pandemia>. Cesso em 19/10/2022.

Análises de genômica estrutural em TCPs de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO¹; YAGO PIRES²; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO³; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ⁴; GEORGE WASHINGTON ALVES CARDOSO⁵; VANESSA GALLI⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – gustavocamozatto@gmail.com

²Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – yagopires022@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – audreycn97@gmail.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - christian.kun@gmail.com

⁵Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - george.gvac37@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas– vanessagalli.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O morango é um pseudofruto resultante do desenvolvimento do receptáculo floral e que apresenta um alto teor de compostos antioxidantes benéficos a saúde humana, como o ácido ascórbico (vitamina C) e as antocianinas, pigmentos solúveis responsáveis por sua coloração avermelhada nos estádios mais avançados da maturação (WEI *et al.*, 2016). O processo de maturação do morango é caracterizado por uma série de alterações fisiológicas, como degradação da parede celular e clorofila e aumento nos teores de antocianinas e sacarose (JIA *et al.* 2011).

Essas modificações acontecem durante o amadurecimento e são coordenadas por diferentes proteínas capazes de se ligar ao DNA. As TCPs são uma família de fatores de transcrição caracterizada pela presença de uma região conservada bHLH (basic helix-loop-helix) responsável por sua ligação ao segmento de DNA e domínios proteicos como 2Fe-2S ferredoxin, tiolase, EGF e VWFC (Fator Von Willebrand de tipo C) (DANISMAN, 2012). Tais proteínas, estão presentes apenas em plantas vasculares e suas isoformas apresentam diferentes funções. Em *Fragaria x vesca* por exemplo, a *FvTCP9* regula a biossíntese de ácido abscísico (ABA) um importante hormônio vegetal capaz de promover a maturação dos frutos, visto que, o silenciamento gênico da enzima chave da biossíntese de ABA acarreta em frutos sem a coloração avermelhada característica dos frutos maduros (XIE *et al.*, 2019).

Dessa forma, identificar as características dos membros dessa família protéica se mostra importante pois o mecanismo de maturação dos frutos não-climatéricos é um processo fisiológico complexo que envolve a atuação de diferentes fatores de transcrição capazes de ativar ou inibir rotas bioquímicas do desenvolvimento e senescência do fruto. As análises realizadas são pertinentes para nortear próximas etapas na busca pela função de cada membro dessa família. Sendo assim, o presente estudo busca categorizar e comparar as TCPs do organismo *Fragaria x ananassa*.

2. METODOLOGIA

As sequências gênicas correspondentes às diferentes isoformas de *FaTCP* foram baixadas do banco de dados de FTs vegetais Plant TFDC (<http://plantfdb.gaolab.org/>) e reunidas em um arquivo FASTA para realizar as análises descritas a seguir.

As informações de ponto isoelétrico e peso molecular referentes a cada membro da família *FaTCP* foi realizada utilizando a ferramenta ComputePI/Mw da plataforma ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Além disso, foi realizado a predição de localização subcelular, na qual as sequências de aminoácidos foram submetidas ao preditor de localização para eucariotos DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca de *FaTCPs* em morango (*Fragaria x ananassa*) resultou em quinze sequências putativas de FTs “*Plant TFDB*”. As sequências obtidas e verificadas foram submetidas às análises descritas na metodologia. Sendo *FaTCP12* (57534,4 Da) a com maior peso molecular e *FaTCP13* (10699,9 Da) a com menor peso molecular, enquanto o ponto isoelétrico variou de 4,7918 (*FaTCP3*) a 11,2265 (*FaTCP2*) (Tabela 1).

Os valores de peso molecular, ponto isoelétrico e quantidade de aminoácidos das isoformas de *FaTCP* são semelhantes aos identificados em *TCPs* de espécies como *Malus domestica* (Maçã), *Vitis vinifera* (Uva), *Gossypium hirsutum* (Algodão) e *F. vesca* (morango selvagem) (JIU et al., 2019; LI et al., 2017; XU et al., 2014). Entretanto, podemos observar no banco de FTs PlantTFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/>) que a quantidade de integrantes dessa família de FTs pode variar significativamente. A espécie que mais possui *TCPs* de acordo com o banco é a *Nicotiana tabacum* (tabaco) com 96 isoformas, enquanto a espécie *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) conta com apenas duas isoformas. É importante salientar que, outras cópias de *TCP* poderão ser identificadas em bancos de mRNAseq obtidos a partir de plantas de morango submetidas a diferentes condições, visto que o Plant TFDB realiza a predição a partir do genoma da planta, sem considerar a possibilidade de variantes provenientes de *splicing* alternativo. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de existência de outras cópias em genótipos de *F. ananassa* como consequência de mutações aleatórias.

As 15 isoformas da família das *FaTCP* possuem localização nuclear (Tabela 1) indicando um padrão típico de FTs, visto que estes regulam a transcrição de genes alvos através da ligação a cis elementos específicos em seus promotores e essa ligação, por sua vez, ocorre no núcleo. No entanto, a predição realizada pelo preditor DeepLoc apontou a possibilidade de localização citoplasmática da proteína *FaTCP3*, este FT foi relacionado à biossíntese de flavonóides em *Arabidopsis thaliana*. Através de um ensaio

Y2H, foi demonstrado que a AtTCP3 pode formar um complexo com proteínas R2R3-MYB que ativa os genes necessários para a biossíntese de flavonóides (LI; ZACHGO, 2013).

Tabela 1 – Características das isoformas da família *FaTCP*.

Gene	CDS (nt)	PM	pl	aa	Localização Celular	Probabilidade
<i>FaTCP1</i>	289	10882,1 Da	10,7452	96	Núcleo	0,9666
<i>FaTCP2</i>	361	13124,8 Da	11,2265	120	Núcleo	0,9971
<i>FaTCP3</i>	332	11796,1 Da	4,7918	109	Núcleo Citoplasma	0,5391 0,4063
<i>FaTCP4</i>	954	33037,2 Da	7,9127	317	Núcleo	0,9962
<i>FaTCP5</i>	663	24092,6 Da	8,4067	220	Núcleo	0,9898
<i>FaTCP6</i>	1050	39411,3 Da	10,7765	349	Núcleo	0,9386
<i>FaTCP7</i>	1344	50327,7 Da	6,8793	447	Núcleo	0,9996
<i>FaTCP8</i>	783	28026,9 Da	9,0438	260	Núcleo	0,9993
<i>FaTCP9</i>	1269	45235,5 Da	7,2598	422	Núcleo	0,921
<i>FaTCP10</i>	1182	41701,8 Da	7,952	393	Núcleo	0,8603
<i>FaTCP11</i>	1128	41477,2 Da	9,0286	375	Núcleo	0,8987
<i>FaTCP12</i>	1596	57534,4 Da	10,1545	531	Núcleo	0,8534
<i>FaTCP13</i>	309	10699,9 Da	7,4205	103	Núcleo	0,8815
<i>FaTCP14</i>	1056	39151,1 Da	8,9351	351	Núcleo	0,9993
<i>FaTCP15</i>	1507	53108,7 da	8,3545	501	Núcleo	0,9971

CDS – Sequência Codificadora; PM – Peso Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; aa – aminoácidos.
Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou a discrepância nas propriedades entre os membros dessa família protéica na espécie estudada e entre outras espécies de plantas. A importância desse estudo se dá por nortear futuros trabalhos no organismo *Fragaria x ananassa*, pois a partir das análises realizadas podemos conhecer em maior detalhes os membros de TCPs em morango traçando um paralelo com as isoformas de outras espécies cuja as funções estão melhor



estabelecidas. Além disso, esses atributos são essenciais para efetuar técnicas de proteômica como o isolamento, precipitação e purificação de proteínas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DANISMAN, S. et al. Arabidopsis class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant Physiology*, v. 159, n. 4, p. 1511–1523, ago. 2012.

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

JIA, H.-F. et al. Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. Source: *Plant Physiology*, v. 157, n. 1, p. 188–199, 2011.

JIU, S. et al. Genome-Wide Identification, Characterization, and Transcript Analysis of the TCP Transcription Factors in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Genetics*, v. 10, n. December, 2019.

LI, W. et al. Genome-wide identification and characterization of TCP transcription factor genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

LI, S.; ZACHGO, S. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v. 76, n. 6, p. 901–913, 2013.

WEI, W. et al. Identification and transcript analysis of the TCP transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. DECEMBER2016, p. 1–18, 2016.

XIE, Y. G. et al. Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 146, n. October 2019, p. 374–383, 2020b.

XU, R. et al. Genomewide analysis of TCP transcription factor gene family in *Malus domestica*. *Journal of Genetics*, v. 93, n. 3, p. 733–746, 2014.

Zheng, L., X. Zhou, Y. Ma and M. Guo. (2019). Genome-wide identification and characterization of TCP family genes associated with flower and fruit development in *Fragaria vesca*. *Pak. J. Bot.*, 51(2).

Obtenção de vetores e desenho de *primers* para edição gênica por CRISPR/Cas em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO¹; YAGO PIRES²; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ³; GEORGE WASHINGTON ALVES CARDOSO⁴; MARIA CLARA MARTINS FERREIRA⁵; VANESSA GALLI⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – audreycn97@gmail.com

²Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – yagopires022@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - christian.kun@gmail.com

⁴Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - george.gwac37@gmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - maria.c.martins07@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas– vane.galli@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é amplamente comercializado devido às suas características sensoriais, principalmente coloração, sabor e aroma (NEZHADAHMADI et al., 2015). Pertencente à família *Rosaceae*, o morango é, na verdade, um pseudofruto e destaca-se por ser a espécie dos chamados pequenos frutos, mais explorada do Brasil. No entanto, sua produção é limitada por alguns fatores bióticos e abióticos, que causam perdas significativas a cada ano (WEI et al., 2016).

O alto custo de técnicas convencionais de transformação levou a encontrar alternativas de protocolos mais acessíveis em relação a custos e demanda de trabalho. Dessa forma, a técnica de edição gênica por CRISPR/Cas permite realizarmos o silenciamento gênico de forma rápida e precisa para gerar alterações pontuais em sequências no genoma de plantas (POLETTI, et al. 2021).

A família das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) estão envolvidas na sinalização de estresse, resposta hormonal e regulação da via metabólica (CRIZEL et al, 2020). As estruturas de CDPK incluem quatro domínios: N-terminal, autorregulador/autoinibitório, serina/treonina quinase e, finalmente, domínios reguladores tipo calmodulina (CaM-LD) (GAO et al, 2014). O domínio CaM-LD contém três ou quatro motivos de ligação a Ca²⁺ EF-hand que reconhecem assinaturas de Ca²⁺ distintas com afinidades variáveis. O lóbulo C-terminal da CaM-LD liga Ca²⁺ com alta afinidade. Em níveis baixos de Ca²⁺, a estrutura é estabilizada pela interação deste lobo com a região autoinibitória da proteína. Caso contrário, uma mudança conformacional induzida pela ligação de Ca²⁺ ao lóbulo N-terminal de baixa afinidade de CaM-LD resulta na liberação da auto-inibição (BOUDSOCQ et al, 2013; HAMEL et al, 2014).

Com base na análise de expressão *in silico* de bancos mRNA-Seq de morango anteriormente descrita pelo grupo de pesquisa (CRIZEL et al, 2020), os genes *FaCDPK4* e *FaCDPK11* são potenciais alvos para a edição gênica, uma vez que apresentam maior nível de expressão e contra estresse osmótico,

bem como obtiveram melhor resposta ao tratamento com ABA. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenhar primers, bem como selecionar vetores para possibilitar a clonagem em vetor CRISPR/Cas, para tal fim, visando o silenciamento transiente dos genes *FaCDPK4* e *FaCDPK11*

2. METODOLOGIA

Os desenhos dos primers RNA-guia de *FaCDPK4* e *FaCDPK11* foram realizados na plataforma CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) utilizando o genoma de *F. ananassa* disponível no GDR (*Genome Database for Rosaceae* - <https://www.rosaceae.org/>).

Os vetores CRISPR/Cas phATC e phsn6a01, por sua vez, foram adquiridos pela plataforma Addgene (<https://www.addgene.org>) em discos de papel com *E. coli* DH5-*Alfa* contendo os vetores. Esses plasmídeos foram recuperados e multiplicados em meio LB, suplementado com 50 µg/ml de Canamicina, à 37°C por 48h em agitação.

O DNA plasmidial foi obtido a partir do *Kit GeneJET Plasmid Midiprep* que é projetado para isolar e purificar DNA plasmidial em larga escala em culturas recombinantes de *E. coli*.

A quantidade e a pureza do DNA extraído foram obtidas por meio de espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™. Nesse método a análise da pureza do DNA baseia-se na propriedade da molécula de absorver radiação.

Além disso, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1.5%, com voltagem de 120 V, por 30 min. O gel foi preparado com tampão TBE (1x) e corado com brometo de etídio. O DNA foi visualizado no gel e fotografado em fotodocumentador (UVP) sob luz UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem várias ferramentas que ajudam na montagem de primers para edição gênica por CRISPR/Cas, baseados na sequência PAM, que apresenta três nucleotídeos. No caso, utilizou-se a sequência-guia, a PAM do tipo NGG e enzimas de restrição, para formar o RNA-guia visando o silenciamento ou superexpressão dos alvos. Utilizando o genoma de *F. ananassa* disponível no GDR foi possível apenas desenhar os primers para *FaCDPK4* (Primer forward: CATTGCGCAGGGAGTGTACT CGG) com 2 Off-targets e primer reverse: (GAACTCGGAAGAGGCCAGTT CGG) com 17 Off-targets uma vez que não foram encontradas sequências completas de *FaCDPK11* no banco de dados do genoma.

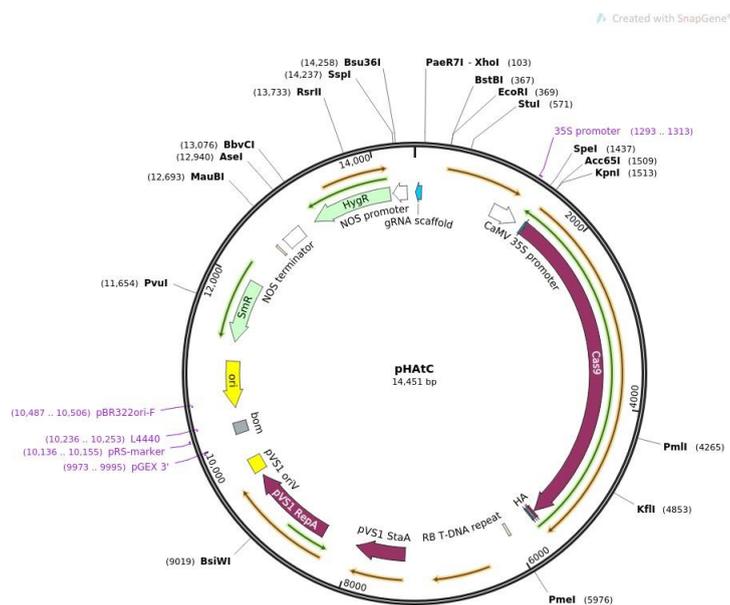


Figura 1. Vetor pHatC de Jin-Soo Kim & Sang-Gyu Kim (plasmídeo Addgene # 78098; <http://n2t.net/addgene:78098>; RRID:Addgene_78098)

O vetor pHSN6A01 foi projetado para expressar dCas9-VP64, andaime de gRNA para inserção da sequência alvo (promotor AtU6-26), visando superexpressão. Enquanto phaTC foi obtida para a expressão vegetal de Cas9 e gRNA de backbone vazio, visando silenciamento.

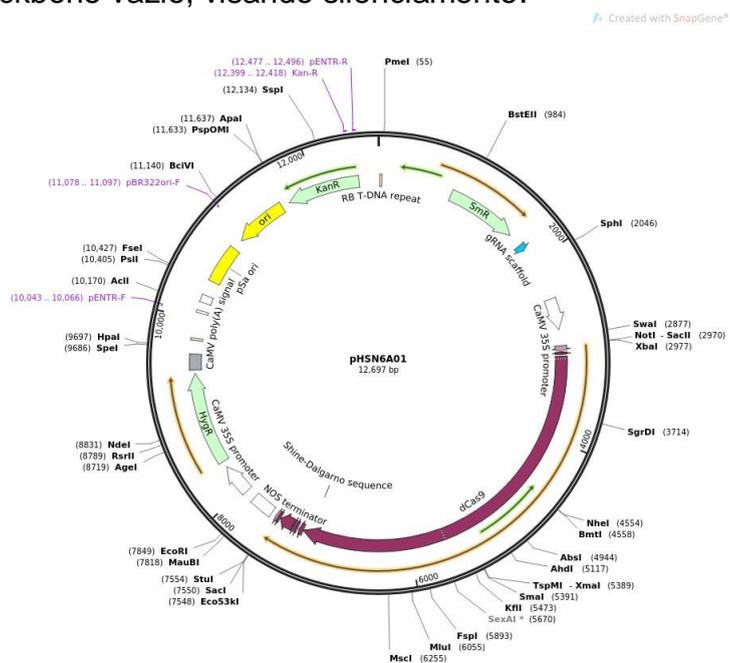


Figura 2. pHSN6A01 foi um presente de Qi-Jun Chen (plasmídeo Addgene # 50586; <http://n2t.net/addgene:50586>; RRID:Addgene_50586)

O DNA plasmidial de ambos os vetores foi extraído e purificado. A fim de verificar a quantidade e a pureza do DNA extraído foi utilizado o

espectrofotômetro NanoDrop™. Nesse sentido, obteve-se de phATC uma concentração de 19,50 ng/microL e pureza de 1,8; enquanto phsn6a01, 30,00 ng/microL e pureza de 1,66.

4. CONCLUSÕES

Os primers desenhados e vetores escolhidos apresentam potencial para a edição gênica visando o melhoramento da espécie e podem ser explorados como uma forma de intensificar o enfrentamento a condições adversas de cultivo do morangueiro como estresse osmótico e estresses por infecções fúngicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arash Nezhadahmadi, Golam Faruq & Kamaludin Rashid (2015) Influence of Drought Stress on Leaf Traits of Different Strawberry (*Fragaria ananassa* L.) **Varieties in Natural Environment, Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 46:10, 1249-1262

Cheng Chen, Kaixuan Zhang, Muhammad Khurshid, Jinbo Li, Ming He, Milen I. Georgiev, Xinquan Zhang & Meiliang Zhou (2019): MYB Transcription Repressors Regulate Plant Secondary Metabolism, **Critical Reviews in Plant Sciences**.

Crizel, R.L., Perin, E.C., Vighi, I.L. et al. Genome-wide identification, and characterization of the CDPK gene family reveal their involvement in abiotic stress response in *Fragaria x ananassa*. **Sci Rep** 10, 11040 (2020).

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends Plant Sci**. 2010 Oct;15(10):573-81.

Lapham R, Lee LY, Tsugama D, Lee S, Mengiste T, Gelvin SB. (2018) *VIP1* and Its Homologs Are Not Required for *Agrobacterium*-Mediated Transformation, but Play a Role in *Botrytis* and Salt Stress Responses. **Front Plant Sci**.

NASCIMENTO, A.C. Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) . Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) –Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2018.

POLETTI, I. EDIÇÃO GENÔMICA MEDIADA POR CRISPR/Cas NA ERA DO MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL DE PRECISÃO. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) –Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2020.

Wei, F., Hu, X. & Xu, X. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. **Sci Rep** 6, 22611 (2016).

Yan, H.; Pei, X.; Zhang, H.; Li, X.; Zhang, X.; Zhao, M.; Chiang, V.L.; Sederoff, R.R.; Zhao, X. (2021).MYB-Mediated Regulation of Anthocyanin Biosynthesis. **Int. J. Mol. Sci**.

DIETAS PROTEICAS COMO SUBSTITUTOS DE PÓLEN PARA ABELHAS AFRICANIZADAS

YURI RIBEIRO DIOGO¹; MICHELLE MANFRINI MORAIS¹

¹Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
– diogo.yuri@unifesp.br; michelle.manfrini@unifesp.br

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* são insetos de grande importância ecológica e econômica. Dessa maneira, diversos são os estudos sobre suas exigências nutricionais, tipos de alimentos coletados e armazenados e a influência da alimentação artificial na colônia (CRAILSHEIM, 1990). Através da coleta de recursos das flores, o néctar coletado nos nectários florais e depois transportado para a colônia e armazenado nos favos, fornece os carboidratos, os quais são convertidos em mel e utilizado como fonte de energia para suas funções vitais (SOMERVILLE 2005; NICOLSON 2011). Já o pólen, é a única fonte de proteína disponível para as abelhas na natureza (WINSTON, 2003). Além de suprir as exigências de aminoácidos, essa substância também preenche as necessidades de lipídios, vitaminas e minerais (que são indispensáveis para o desenvolvimento de sua estrutura corporal) (HERBERT e SHIMANUKI, 1978). Como as abelhas não armazenam grande quantidade de pólen na colônia, os estoques diminuem rápido em períodos de pouco forrageamento ou falta de recursos florais na natureza (SCHMICKL e CRAILSHEIM, 2002). Dessa maneira, em épocas de escassez, o pólen estocado nos favos diminui e as proteínas presentes nas abelhas são rapidamente gastas (MORAIS et al. 2013b; PAIVA et al. 2016). Assim, o enfraquecimento da colônia acarreta na diminuição da postura da rainha, que reduz consideravelmente a quantidade de indivíduos em diversos estágios de desenvolvimento (HUANG, 2010) e pode comprometer o desenvolvimento normal e o crescimento da colônia (SOMERVILLE, 2005). Como a longevidade das operárias é afetada pelo começo do forrageio, as operárias que se tornam forrageiras mais cedo, morrem antes do que as operárias que executam tarefas dentro da colônia. Sendo assim, na ausência de floradas, quando a reserva de alimento na colônia é insuficiente, é aconselhável o fornecimento de alimentação artificial às abelhas (AZEVEDO-BENITEZ; NOGUEIRA-COUTO, 1998). O desenvolvimento de dietas artificiais de boa aceitabilidade e qualidade para as abelhas é necessário para que possam ser usadas como substitutos de pólen na manutenção das colônias. Como a apicultura é uma atividade dependente dos recursos naturais, sofrendo oscilações de produção de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região, é importante o estudo de dietas acessíveis e de baixo custo para os apicultores (MORAIS et al, 2013a). A utilização de um substituto para o pólen é um dos esforços para

manter a colônia de abelhas produtiva ou para manter a saúde da colônia durante os períodos de escassez (WIDOWATI et al. (2020). Assim, a suplementação com rações protéicas na entressafra é uma ferramenta que os apicultores devem utilizar para aumentar suas produções, visto que, ao entrar no período de floração, as colônias estarão com a população de abelhas em um nível produtivo, não necessitando de um período maior de recuperação dos enxames (PEREIRA et al., 2005).

2. METODOLOGIA

Operárias recém-emergidas foram retiradas de três colônias diferentes para a montagem dos experimentos. Após emergência, gaiolas foram preparadas e mantidas em estufas, sem luz, a 30°C e umidade de 80%. Em cada uma, 100 abelhas foram introduzidas e mantidas por sete dias. Cada grupo de abelhas recebeu uma das cinco dietas proteicas diferentes (administradas como pasta). Foram oferecidas 20 gramas de cada dieta por semana em porção de 10 gramas. Dois grupos foram usados como tratamento, o controle positivo (C+), alimento natural consumido pelas abelhas (beebread); o controle negativo (C-), sem alimento proteico, apenas energético, solução de sacarose 70% *ad libitum*).

Tabela I: Ingredientes utilizados nas dietas proteicas fornecidas às abelhas africanas recém emergidas das gaiolas durante sete dias.

	Dietas						
	Bee bread (D+)	Sucrose (D-)	D1	D2	D3	D4	D5
Farinha de soja	-	-	15g	30g	-	15g	20g
Farinha de arroz	-	-	10g	10g	15g	-	-
Levedura de destilaria	-	-	5g	5g	10g	5g	-
Leite de soja em pó	-	-	-	-	15g	-	-
Farinha de milho	-	-	-	-	-	15g	-
Lentilhas	-	-	-	-	-	-	10g
Farinha de trigo	-	-	-	-	10g	-	-
Açúcar	-	-	10g	20g	30g	20g	20g
70% Solução de sacarose	-	-	15ml	15ml	15ml	15ml	30ml
Xarope de sacarose	<i>ad libitum</i>						
Bee bread	20g	-	-	-	-	-	-

Foi coletada a hemolinfa das operárias recém-emergidas (15 – 20 horas, chamadas de Dia 0). Após o confinamento e a alimentação das operárias com as respectivas dietas, foi realizada a coleta de hemolinfa de um *pool* de 10 operárias com uma pipeta a partir de uma pequena incisão feita no abdômen e/ou na base da asa. O nível protéico foi quantificado com um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de proteínas na hemolinfa ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) das abelhas engaioladas variaram significativamente entre os grupos ($P=0,004$, ANOVA). Não houve diferenças significativas entre quatro das dietas (D1, D2, D4 e D5) em comparação com o grupo do controle positivo “beebread” ($p<0,05$). Todas as dietas proteicas deram níveis proteicos superiores ao xarope de sacarose ($17,3 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,4$) e os níveis no dia 0 ($14,4 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,4$) (abelhas emergentes 15 – 20 horas, chamadas de Dia 0) exceto para D3 ($16,4 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,1$); os valores médios das proteínas foram significativamente superiores aos do dia 0. Numa análise em pares, comparando todas as dietas, não encontramos diferenças significativas entre as quatro melhores dietas (D1- $24,0 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 3,1$; D2 - $27,9 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,0$; D4 - $23,0 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,8$ e D5 - $20,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2,7$). Uma das dietas (D2) deu níveis de proteína numericamente mais elevados do que o “beebread” ($26,0 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 5,4$), embora a diferença não tenha sido significativa. As abelhas alimentadas apenas com soluções de sacarose desenvolveram níveis baixos de proteínas na hemolinfa, próximos dos valores encontrados nas abelhas recém emergidas, semelhantes aos encontrados em estudos anteriores (CREMONEZ et al. 1998; DE JONG et al. 2009).

4. CONCLUSÕES

A redução na oferta de pólen na natureza prejudica a produtividade das colônias e a fisiologia das abelhas, pois estas necessitam de alimentos protéicos para o desenvolvimento das crias. As dietas respectivamente testadas funcionam como uma alternativa na alimentação suplementar das colônias em períodos de condições climáticas desfavoráveis como secas. Dessa forma, concluímos que os ingredientes localmente disponíveis podem ser um recurso valioso para os apicultores manterem e aumentarem as suas colmeias, embora as dietas “caseiras” necessitem de ser testadas objetivamente para se certificar de que são adequadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K.E., SHEEHANS, T.H., MOTT, B.M., MAES, P., SNYDER L., SCHWANS, M.R., WALTON, A., JONES, B.M, CORBY-HARRIS, V. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS One**, 2013.

AZEVEDO-BENITEZ A.L.G.; NOGUEIRA-COUTO R.H. Estudo de algumas dietas artificiais visando à produção de geléia real em colônias de *Apis mellifera*. In: **III ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, Ribeirão Preto, SP, 227-230, 1998.

CRAILSHEIM K. The protein balance of the honey bee worker. **Apidologie** **21**: 417-429, 1990.

CREMONEZ, T M; DE JONG, D; BITONDI, M M G. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 1284-1289, 1998.

HERBERT Jr., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.

HUANG, H., Yu, Z., ZHANG, S., LIANG, X., CHEN, J., Li, C., MA, J., JIAO, R. Drosophila CAF-1 regulates HP1-mediated epigenetic silencing and pericentric heterochromatin stability. **J. Cell Sci**, 2853--2861, 2010.

MORAIS, M.M., TURCATTO, A.P., PEREIRA, R.A., FRANCOY, T.M., GUIDUGLI-LAZZARINI, K.R., GONÇALVES, L.S., ALMEIDA-DIAS, J.M.V., ELLIS, J.D. De JONG, D. Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. **Genet. Mol. Res.** **12 (4)**, 2013b.

NICOLSON SW. Bee Food: The Chemistry and Nutritional Value of Nectar, Pollen and Mixtures of the Two. **Afr. Zool.** **46(2)**, 197–204, 2011.

PAIVA, J.P.L.M., PAIVA, H.M., ESPOSITO, E., MORAIS, M.M. On the Effects of Artificial Feeding on Bee Colony Dynamics: A Mathematical Model. **PLoS One** **11 (11)**, 2016.

SCHMICKL, T. and CRAILSHEIM, K. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to nonforaging conditions and poor pollen conditions. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 51:415–425, 2002.

SOMERVILLE, Doug & Rural Industries Research and Development Corporation. Fat bees skinny bees: a manual on honey bee nutrition for beekeepers: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. **Rural Industries Research and Development Corporation**, Australia, 2005.

URCAN, A.C.; CRISTE A.D.; DEZMIREAN D.S.; MARGAOAN R.; CAEIRO A.; GRAÇA CAMPOS, M. Similarity of data from bee bread with the same taxa collected in India and Romania. **Molecules** **23**, 2491. 2018

WIDOWATI R, MARIANDAYANI HN, RAHAYU IL, SJAMSURIDZAL W, BASUKRIADI A, OETARI A. Soybean dregs as main ingredients of pollen substitute for *Apis cerana* honey bees. **Intl J Mod Agric** **9 (4)**, 541-555. 2020.

WINSTON, M. L. **A Biologia da abelha**. Porto Alegre, p.276, 2003.

DESCOBERTA DE POTENCIAIS BIOMOLÉCULAS PARA USO COMO ANTIBIÓTICOS DA COLEÇÃO DE CULTURA DA FUNDAÇÃO ZOOLOGICO DE SÃO PAULO

PATRÍCIA MIRANDA-PINTO¹; IRYS HANY LIMA GONZALEZ²; LAÍS CALPACCI-ARAUJO¹; PATRÍCIA LOCOSQUE RAMOS²; MICHELLE MANFRINI MORAIS³; LUCIANA TERESA DIAS CAPPELINI⁴

¹*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Paulo, Diadema – SP, 09920-000 – e-mail: miranda.patricia@unifesp.br*

²*Departamento de Pesquisas Aplicadas, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo SP, 04301-905 - e-mail: igonzalez@zoologico.sp.gov.br*

³*Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Paulo, Diadema SP, 09920-000 - e-mail: michelle.manfrini@unifesp.br*

⁴*Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema - SP, 09972-270 - e-mail: lu_cappelini@alumni.usp.br*

1. INTRODUÇÃO

O papel dos zoológicos modernos vai além da exposição de animais e atualmente, são considerados importantes centros de pesquisa e conservação de espécies. A Fundação Zoológico de São Paulo (FZSP), reconhecida como uma Instituição de Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo desde 2018, mantém a Coleção Microbiológica e Genética de Biomas Brasileiros (CMGBB), um banco de microrganismos com mais de 10.000 isolados microbiológicos obtidos de diferentes matrizes ambientais, como compostagem, chorume e da fauna silvestre, com potencial biotecnológico ainda pouco explorado. Existem diversos estudos sendo realizados a partir dos microrganismos da coleção, dentre eles a busca de potenciais biomoléculas com atividade antimicrobiana.

Os antibióticos são essenciais para assegurar desde o sucesso de transplantes de órgãos até o tratamento de uma intoxicação alimentar. Porém, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a crescente existência de microrganismos resistentes aos antibióticos representam uma ameaça à saúde global, resultando na persistência e disseminação de doenças infecciosas causadas por tais microrganismos (TANWAR et. al., 2014; HUEMER et. al., 2020), que apenas em 2019 foram responsáveis por mais de 1,20 milhões de mortes no mundo, podendo chegar a até 10 milhões de mortes até 2050. (O'NEILL, 2016; ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022)

Diante deste cenário, pesquisas para a descoberta de potenciais biomoléculas capazes de combater os microrganismos que são multirresistentes aos antibióticos disponíveis atualmente são essenciais. A seleção de microrganismos para tal finalidade pode ser realizada através de diferentes metodologias, nas quais patógenos de interesse são inoculados em placas contendo o microrganismo teste para avaliação do seu potencial antimicrobiano.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar microrganismos da CMGBB da FZSP com potencial para produzir biomoléculas com atividade antimicrobiana.

2. METODOLOGIA

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia da FZSP entre junho e novembro de 2021. A partir de um levantamento bibliográfico sobre as espécies descritas na literatura com potencial para produção de antibióticos, foram selecionados 110 isolados bacterianos provenientes da CMGBB para avaliação da atividade antimicrobiana. Esses isolados, mantidos em freezer à - 80 °C, foram reativados em Ágar Triptona de Soja (*do inglês Tryptone Soy Agar - TSA*), e incubados em estufa à 36 °C por 24 horas.

As linhagens de referência pertencentes às espécies *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* foram reativadas em TSA, a 36°C por 24 horas e utilizadas para verificar o potencial antimicrobiano dos microrganismos testados.

Para avaliar a atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de difusão em poço. Neste método, as bactérias de interesse são colocadas em um poço perfurado no ágar e na superfície não perfurada do meio é adicionado o organismo o qual deseja-se inibir seu crescimento; quando esse fato acontece ao redor do poço forma-se uma halo que indica o potencial de inibição dos organismos contido no poço.

Os 110 isolados selecionados para o estudo foram inoculados previamente em caldo Triptona de Soja (*do inglês Tryptone Soy Broth - TSB*) e incubados em estufa a 36 °C por 24 horas. Para cada linhagem de referência (controle) preparou-se uma suspensão com padrão de turvação de 0,5 da escala nefelométrica de McFarland. A suspensão foi inoculada de forma homogênea com o auxílio de um swab em uma placa de TSA e em seguida foram feitos poços de aproximadamente 6 milímetros, nos quais foram aplicados 100µl do inóculo em TSB dos microrganismos a serem testados . Em seguida, todas as placas foram incubadas em estufa à 36°C por 24 horas.

Após as 24 horas de incubação, foi verificado se ocorreu ou não a formação da zona de inibição (halo) dos organismos em estudo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 110 isolados testadas, 7 apresentaram atividade de inibição de crescimento das linhagens de referência de *Staphylococcus aureus* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Imagem 1). Dentre os isolados que inibiram o crescimento bacteriano, dois foram obtidos a partir de amostras de preguiça comum (*Bradypus variegatus*), um de lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e quatro de diferentes espécies de morcegos.

As espécies bacterianas que tiveram o seu crescimento inibido pela atividade dos microrganismos testados neste trabalho são altamente relevantes para a saúde humana e animal. A espécie *Staphylococcus aureus* é classificada como cocos gram-positivos que embora faça parte da microbiota humana, pode provocar simples infecções como espinhas e furúnculos, até quadros infecciosos graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outros (SANTOS, et. al., 2007). *Stenotrophomonas maltophilia* é uma espécie gram-negativa associada principalmente a infecções pulmonares como a fibrose cística e, devido a sua resistência a uma grande variedade de antibióticos, as opções terapêuticas atualmente para o tratamento de infecções por esses microrganismos são limitadas (PORCINO, A. O., et al., 2021)

Atualmente, a utilização de tecnologias modernas permite que pesquisadores aprofundem os estudos em novos meios e recursos naturais em busca de novos microrganismos e suas respectivas habilidades biossintéticas (KEALEY, C., et. al., 2017) e nos últimos anos, os cientistas têm focado na busca de novas biomoléculas em fontes pouco exploradas, devido aos organismos encontrados nesses ambientes estarem mais frequentemente associados a uma maior diversidade genética (GUIMARÃES, et. al; 2010). Considerando que a CMGBB mantém microrganismos provenientes de fontes pouco exploradas, incluindo a fauna silvestre, os resultados preliminares deste trabalho, demonstram a importância da manutenção das coleções biológicas na busca de potenciais novas biomoléculas.



Imagem 1: Técnica de difusão em poço, demonstrando a formação de halo de inibição de crescimento de bactérias.

4. CONCLUSÕES

Através deste estudo, verificou-se que microrganismos isolados a partir de amostras de animais silvestres de vida livre podem ser uma fonte em potencial para a obtenção de novas biomoléculas com atividade antimicrobiana. Além de demonstrar a importância da realização de pesquisas em fontes pouco

exploradas como solo, plantas, insetos, animais, entre outros, evidencia a relevância da manutenção e gerenciamento de coleções microbiológicas. A busca por biomoléculas capazes de inibir crescimento de microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Stenotrophomonas maltophilia*, como ocorreu nesse experimento, visa contribuir com o controle da resistência a antimicrobianos, uma das maiores preocupações mundiais. A partir destes resultados, novos testes para a obtenção de informações sobre as biomoléculas poderão ser realizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, vol. 399, p. 629-655, 2022

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, vol. 33, n. 3, p. 667-679, 2010

HUEMER, M.; MAIRPADY-SHAMBAT, S.; BRUGGER, S. D.; ZINKERNAGEL, A. S. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO Rep.** vol. 21, n. 12, 2020

KEALEY, C.; CREAVER, C. A.; MURPHY, C. D.; BRADY, C. B. New approaches to antibiotic discovery. **Biotechnol Lett.**; vol. 39, n. 6, p. 805-817, 2017

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.

PORCINO, A. O. .; NETO, M. O. . STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 58, 2021.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. De Patol. E Med. Lab.** v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA OVOALBUMINA E DA TEMPERATURA DO SPRAY DRYING NA MICROENCAPSULAÇÃO DE PRÓPOLIS

RAQUEL MOREIRA OLIVEIRA¹; CRISTINA JANSEN – ALVES¹; CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES²; RUI CARLOS ZAMBIAZI²

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA - Universidade Federal do Pelotas – raquelmoroli@gmail.com; cris-janse@hotmail.com

²Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos- CCQFA - Universidade Federal de Pelotas – caroldellin@hotmail.com; zambiazzi@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas através de substâncias resinosas e gomosas (SILVA et al. 2012). Diversos estudos têm relatado as propriedades benéficas da própolis como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, cicatrizante e anestésica (MOREIRA et al 2008; SILVA et al. 2012). Tais benefícios são atribuídos à presença de alguns compostos isolados e ao sinergismo entre os compostos bioativos presentes na própolis (MOREIRA et al. 2008).

Apesar de todos os efeitos benéficos já relatados sobre o consumo da própolis, seu consumo ainda é dificultado devido ao seu sabor forte amargo, o que limita sua aplicação (KESKIN, KESKIN, KOLAYLI, 2019). Por isso, buscam-se formas alternativas de introduzir a própolis na alimentação, sem ocasionar a alteração do odor e sabor dos alimentos. A técnica de encapsulação é conhecida por propiciar a proteção dos compostos bioativos, aumentar a solubilidade, assim como minimizar o sabor, o odor e a cor destes. O uso de proteínas como material de parede na encapsulação tem se intensificado, pois estes polímeros naturais são biocompatíveis, biodegradáveis e anfifílicos (NESTERENKON et al. 2013). A ovoalbumina, principal proteína presente na clara de ovo (54%), apresenta atividade antibacteriana, tendo a função de proteção no desenvolvimento embrionário da ave (WOLF et al. 2011). O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de ovoalbumina como material encapsulante, e diferentes temperaturas de secagem no *spray drying*, sobre a eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos e a morfologia das partículas.

2. METODOLOGIA

O extrato de própolis (EP) foi preparado de acordo com o descrito por SILVA et al. (2012), onde foram preparadas soluções de ovoalbumina nas concentrações de 1% e 4% (m/v), como descrito por COSTA et al. (2015). As soluções da ovoalbumina e o EP na proporção de 1:1 (v/v) foram determinados conforme descrito por DA SILVA et al. (2013), a formulação foi atomizada em

spray dryer. Para a determinação dos compostos fenólicos nas microcápsulas e no EP foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al. 1999). A eficiência de encapsulação foi calculada conforme descrito por ALISHAHI et al. (2011).

A morfologia das microcápsulas foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-6060 LV, Japão), conforme ELBAZ et al. (2016).

Os valores obtidos foram expressos em médias \pm desvio padrão, e todas as análises foram realizadas em triplicata e posteriormente submetidas a análise de variância usando S.A.S (Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a temperatura de secagem não influenciou na eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos do EP para as microcápsulas elaboradas com 1% de ovoalbumina a 120°C e 160°C obtendo 73,40% e 74,80%, respectivamente. Quando se utilizou 4% de ovoalbumina, a maior eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos foi obtida com 4% de ovoalbumina a 120 °C de secagem por spray drying (88,20%). Esse resultado está relacionado ao fato de que a maior concentração de ovoalbumina possibilitou um maior número de sítios de ligações com os compostos fenólicos do EP.

O declínio na retenção de compostos fenólicos do pó com a alta concentração de ovoalbumina (4%), obtida a partir de uma temperatura de entrada elevada (160 °C) no spray drying (54,60%). A causa disso pode ser devido a quebra da camada de revestimento (externo) das microcápsulas (CHUYEN et al. 2019). Os autores relatam que quando se aumentou a concentração do material encapsulante, o tempo para secagem e obtenção dos pós no *spray drying* foi superior.

Através da análise de morfologia percebeu-se microcápsulas relativamente esféricas, de tamanhos variados e com concavidades (Figura 1). O uso de 1% de ovoalbumina conferiu os menores tamanhos as microcápsulas, porém com formatos irregulares, tamanhos variados e com concavidades (Figura 1– A, B). A concentração maior de material encapsulante ocasionou aumento no tamanho das microcápsulas, obtendo-se microcápsulas mais esféricas (Figura 1– C, D). Esse resultado pode estar relacionado a maior viscosidade da formulação 2 (4% de ovoalbumina). Resultado semelhante foi encontrado por CHUYEN et al. (2019) ao encapsular óleo utilizando whey protein e goma arábica utilizando spray drying.

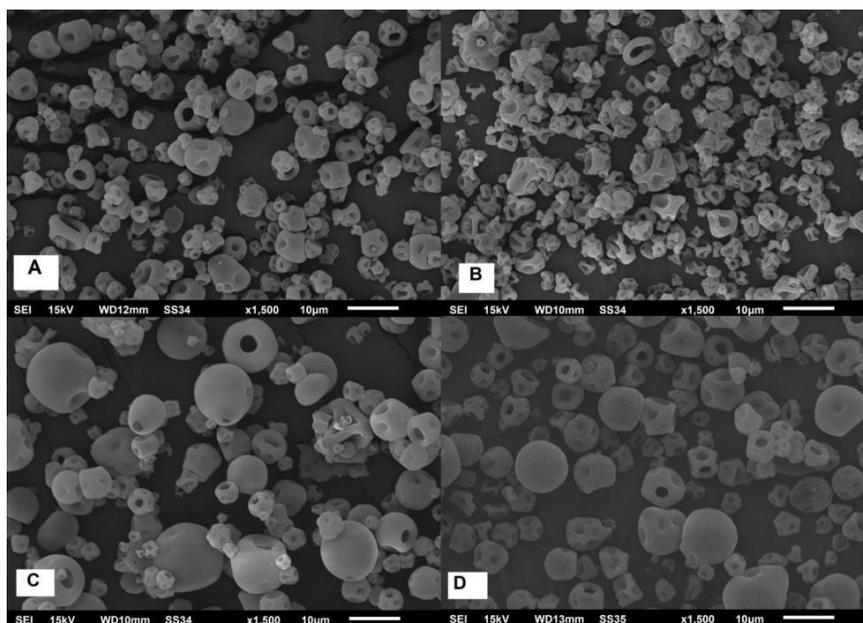


Figura 1. Imagens da morfologia das microcápsulas de extrato de própolis com: a) 1% de ovoalbumina a 120 °C; b) 1% de ovoalbumina a 160 °C; c) 4% de ovoalbumina a 120 °C; d) 4% de ovoalbumina a 160 °C.

4. CONCLUSÕES

Houve influência da concentração de ovoalbumina na eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos e morfologia das microcápsulas. A maior eficiência de encapsulação ocorreu com 4% de ovoalbumina a 120 °C, morfologicamente o aumento na concentração de ovoalbumina ocasionou aumento no tamanho e permitiu a formação de microcápsulas mais esféricas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHUYEN, H. V.; ROACH, P. D.; GOLDING, J. B.; PARKS, S. E.; NGUYEN, M. H. Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. **Powder Technology**, p. 344 373–379, 2019.

COSTA, A. M. M.; NUNES, J. C.; LIMA, B. N. B.; PEDROSA, C.; CALADO, V.; TORRES, A. G.; & PIERUCCI, A. P. T. R. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v.168, p.157–166, 2015.

DA SILVA, F. C., DA FONSECA, C. R.; DE ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. D. C.; PITTIA, P.; & FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v.91, n.1, p. 28–36, 2013.

ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; ABD-RABOU, A. A.; & EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.92, p. 254–269, 2016.

KESKIN, M.; KESKIN, Ş.; KOLAYLI, S. Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization, and release property. **LWT - Food Science and Technology**, v.108, p. 89-96, 2019.

MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 3482 - 3485, 2018.

NESTERENKO, A.; AIRIC, I.; SILVESTRE, F.; & DURRIEU, V. Review. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v.42, p. 469–479, 2013.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; & ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 1790–1795, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p. 152–178, 1999.

WOLF, S. E.; LEITERER, J.; PIPICH, V.; BARREA, R.; EMMERLING, F.; TREMEL, W. Stabilization of Amorphous Calcium Carbonate Emulsion by Ovalbumin: Gaining Insight into the Mechanism of ‘Polymer-Induced Liquid Precursor’ Processes. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, p. 12642–12649, 2011.

MORFOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FIBRAS DE ZEÍNA COM EXTRATO DE CEBOLA ROXA (*ALLIUM CEPA* L.)

CAMILA OLIVEIRA PACHECO¹; ELDER PACHECO DA CRUZ², JULIANI
BUCHVEITZ PIRES³, LAURA MARTINS FONSECA⁴, ELESSANDRA DA
ROSA ZAVAREZE⁵, ALVARO RENATO GUERRA DIAS⁶

^{1,2,3,4,5,6} Universidade Federal de Pelotas – camipachecco@gmail.com;
elderpachecodacruz@gmail.com; juliani_97@hotmail.com; laura_mfonseca@hotmail.com;
elessandrad@yahoo.com.br; alvaro.guerradias@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cebola (*Allium cepa* L.) é um vegetal com propriedades funcionais, visto que possui atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, dentre outras (COLINA-COCA et al., 2017). Além disso, é uma fonte de compostos bioativos, com aporte de proteínas, vitaminas e minerais (SAMI et al., 2021). A presença de compostos voláteis e a sensibilidade dos compostos bioativos frente aos fatores internos e externos, como pH e luz, faz com que a encapsulação desses compostos, como as antocianinas, seja uma alternativa promissora para sua proteção (CRUZ et al., 2021).

O processo de *electrospinning* possui grande vantagem para encapsulação frente a outros métodos tradicionais, uma vez que, utiliza temperatura ambiente durante o processo, evitando a degradação de compostos termossensíveis (CRUZ et al., 2021). Dentre os materiais poliméricos que podem ser utilizados para a encapsulação de compostos bioativos, a zeína apresenta vantagem, devido a capacidade de formar materiais em nanoescala e com alta eficiência de encapsulação (RADÜNZ et al., 2021).

O presente estudo objetivou encapsular o extrato de cebola roxa em fibras de zeína pela técnica de *electrospinning*, como possíveis alternativas para aplicação em embalagens ativas ou matrizes alimentícias.

2. METODOLOGIA

2.1 Material

As cebolas roxas (*Allium cepa* L., var. Crioula) foram adquiridas de produtores da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A zeína foi adquirida da Sigma-Aldrich (CAS: 90-10-66-6). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

2.1 Preparo do extrato de cebola roxa

A preparação do extrato foi realizada de acordo com Sarvinehbaghi et al. (2021), com modificações. As cebolas liofilizadas foram moídas (Oster, Modelo OMDR100), homogeneizadas em 250 mL de etanol 75% (em água destilada,

v/v) e aquecidas em banho-maria termostático (Velp Scientifica, Enzymatic Digester-GDE, Itália) a 60 °C por 3 h, com agitação a 300 rpm. Em seguida, a solução extratora foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi inserido em um rotaevaporador (Laborota 4000eco, Heidolph, Alemanha), acoplado a um banho ultratermostático (Q214M2, Quimis, Brasil) a 60 °C e 90 rpm de agitação, até a completa evaporação do etanol. O extrato líquido obtido foi contido em um frasco hermeticamente fechado e armazenado a -18 ± 2 °C.

2.2 Soluções poliméricas e processo de *electrospinning*

As soluções poliméricas de zeína a 30% (p/v) foram preparadas em etanol 85% (v/v, em água ultrapura) e agitadas durante 30 min para sua completa solubilização. Após, o extrato foi adicionado nas concentrações de 0 e 10% (v/v) nas soluções de zeína, as quais foram agitadas por 15 min para garantir a completa homogeneização do extrato na solução polimérica.

No processo de *electrospinning*, as soluções poliméricas foram adicionadas individualmente em uma seringa plástica de 3 mL acoplada a uma agulha de aço inoxidável de 0,8 mm de diâmetro. No processo de eletrofiação foram utilizados os seguintes parâmetros: vazão de bombeamento das soluções poliméricas de 0,8 mL/h, tensão aplicada de +20 kV e distância de 20 cm entre a ponta da agulha e o coletor (RADÜNZ et., 2021).

2.3 Morfologia, distribuição de tamanho e atividade antioxidante

A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Jeol, JSM - 6610LV, EUA). Com fita dupla face, uma pequena porção dos materiais foi fixada em *stubs* e recoberta com ouro por meio de um metalizador (Sputtering, Denton Vacuum Desk V, EUA). As imagens foram obtidas com voltagem de aceleração de 15 kV e ampliação de 1000 e 6000x.

O diâmetro médio foi determinado a partir das micrografias do MEV, onde foram realizadas 60 medidas aleatórias de cada imagem utilizando o *software* ImageJ, versão 2015.

A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pela capacidade de eliminação dos radicais 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e óxido nítrico (ON), de acordo com Vinholes et al. (2011). A porcentagem de inibição máxima (%) da atividade antioxidante foi calculada usando a Equação 1 e os ensaios realizados em triplicata.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{branco}}$ = absorvância do controle (branco) e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorvância da amostra.

2.4 Análise estatística

Os dados da atividade antioxidante foram analisados por análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micrografias evidenciaram que as condições e parâmetros utilizados no processo de *electrospinning* garantiram a obtenção de fibras aleatórias, contínuas e sem *beads*, tanto para as fibras sem adição de extrato (Figura 1a₁), como para àquelas adicionadas de 10% (v/v) de extrato (Figura 1a₂). A adição do extrato promoveu uma redução de aproximadamente 67% no diâmetro médio das fibras, em que as fibras de zeína sem adição de extrato (0%) e com 10% de extrato de cebola apresentaram diâmetros médios de 512 nm (Figura 1b₁) e 345 nm (Figura 1b₂), respectivamente.

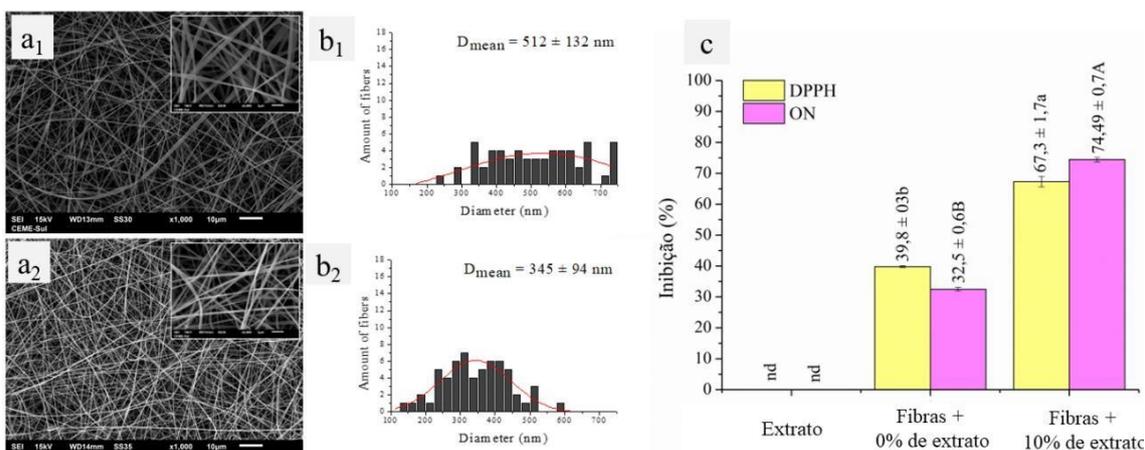


Figura 1. Morfologia (a₁ e a₂), distribuição de tamanho (b₁ e b₂) e atividade antioxidante (c) das fibras de zeína com 0% e 10% (v/v) de extrato de cebola, respectivamente. ^{a,b,A,B} Valores com letras diferentes são significativamente diferentes para as amostras para o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação a atividade antioxidante (Figura 1c), o extrato livre apresentou maior poder de inibição (67,3 e 74,5%, para DPPH e ON, respectivamente), quando comparado as fibras de zeína com 10% de extrato (39,8 e 32,5%, para DPPH e ON, respectivamente). As fibras de zeína sem extrato (0%), não apresentaram inibição frente aos radicais avaliados.

O radical DPPH é muito utilizado para determinar a atividade antioxidante, pois é um dos poucos radicais estáveis disponíveis no mercado, capazes de aceitar um radical elétron ou hidrogênio para se tornar uma molécula estável. As espécies reativas de oxigênio (EROS), como os radicais ON, podem ser associadas a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Assim, são capazes de ocasionar a deterioração dos alimentos e, ainda, possuem relação com diversas doenças em organismos vivos (RADÜNZ et al., 2021).

4. CONCLUSÕES

As fibras de zeína, com e sem extrato, apresentaram morfologia homogênea, cilíndrica, ultrafinas e sem a presença de *beads*. A incorporação do extrato promoveu uma diminuição na distribuição de tamanho médio nas fibras de zeína, de aproximadamente 67%. O extrato encapsulado nas fibras de zeína e na forma livre apresentou atividade antioxidante frente aos radicais avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASANGA, E.; OLORUNFEMI, E.; EKANEM, A. Anti-nutrients composition and mineral analysis of *allium cepa* (onion) bulbs. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, p. 456-459, 2015.

COLINA-COCA, C., GONZÁLEZ-PEÑA, D., ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C. Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 300-309, 2015

CRUZ, E. P., FONSECA, L. M., RADÜNZ, M., SILVA, F. T. DA, GANDRA, E. A., ZAVAREZE, E. R., BORGES, C. D. Pinhão coat extract encapsulated in starch ultrafine fibers: Thermal, antioxidant, and antimicrobial properties and in vitro biological digestion. **Journal of Food Science**, v. 86, p. 2886-2897, 2021.

FONSECA, L. M., OLIVEIRA, J. P., CRIZEL, R. L., SILVA, F. T., ZAVAREZE, E. R., BORGES, C. D. Electrospun starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**, v. 15, p. 355-367, 2020.

RADÜNZ, M., CAMARGO, T. M., HACKBART, H. C. S., BLANK, J. P., HOFFMANN, J. F., STEFANELLO, F. M., ZAVAREZE, E. R. Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of in vitro simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. **Food Chemistry**, v.339, 2021.

SAMI, R., ELHAKEM, A., ALHARBI, M., BENAJIBA, N., ALMATRAFI, M., HELAL, M. Nutritional Values of Onion Bulbs with Some Essential Structural Parameters for Packaging Process. **Applied Sciences**, v. 11, p. 2317, 2021.

SARVINEHBAGHI, M. B., AHMADI, M., SHIRAN, M., AZIZKHANI, M. Antioxidant and antimicrobial activity of red onion (*Allium cepa*, L.) extract nanoencapsulated in native seed gums coating and its effect on shelf-life extension of beef fillet. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 4771-4780, 2021.

VINHOLES, J., GROSSO, C., ANDRADE, P. B., GIL-IZQUIERDO, A., VALENTÃO, P., PINHO, P. G., FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 454-462, 2011.

Isolamento e seleção de bactérias potencialmente acumuladores de fósforo (P) e produtoras de polihidroxialcanoatos (PHAs)

Jéssica Leal Batista¹; Lisianne Brittes Benitez²; Maria Viviane Gomes Muller³

¹Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) – jessica.batista013@gmail.com

²Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) – lisianne@unisc.br

³Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) – mmuller@unisc.br

1. INTRODUÇÃO

Estudos apontam que, a maior carga de fósforo (P) em água doce, ocorre em países com baixas porcentagens de tratamento e remoção de fósforo. No Japão, com uma cobertura de tratamento de águas residuais de 67%, e uma taxa de remoção de P de 10%, a carga de fontes pontuais é de 0,26kgP/ano per capita, enquanto que na Alemanha, uma cobertura de tratamento de águas residuais de 100% e uma taxa de remoção de P de 86%, isto é 0,07kgP/ano per capita (MEKONNEN et al. 2018). Os crescentes problemas relacionados à eutrofização da água, comumente causada pela alta concentração de compostos de fósforo (P), estimulam os estudos que visam uma solução ambientalmente segura (NOVAIS, 2018).

A busca por soluções que reduzem concentrações de P, torna-se cada vez mais emergente, estas soluções diminuem também impactos ambientais, como a eutrofização. Em sistemas biológicos de remoção de P, são encontrados os organismos acumuladores de fósforo (OAPs), incluindo bactérias que são capazes de armazenar quantidades excessivas de fósforo na forma de Poly-P, cerca de 30% (BLANK, 2012; VON SPERLING, M., 2016).

Em estações de tratamento de efluentes industriais, microrganismos empregados para remoção de fósforo, têm a capacidade de sintetizar PHB como sua fonte de energia. Os PHBs são poliésteres sintetizados como reservas intracelulares de carbono e energia. Este polímero é caracterizado por propriedades químicas e físicas semelhantes ao plástico que, em combinação com a biodegradabilidade e biocompatibilidade, os tornam alternativas promissoras aos plásticos derivados da indústria petroquímica (ARIAS, 2018).

Desta forma, o trabalho teve como objetivo bioprospectar microorganismos responsáveis pela remoção de fósforo (P) nos efluentes, principalmente as bactérias acumuladoras de P que, durante a sua rota metabólica de



biorremediação de fósforo, sintetizam o polihidroxialcanoatos (PHA), um bioproduto importante para a indústria de polímeros.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de efluentes de Estações de Tratamento de Efluentes (ETE), com remoção de fósforo por via biológica e histórico de eficiências na redução de P. Realizou-se o isolamento, identificação preliminar e seleção de bactérias acumuladoras de P, aplicando meios de cultura seletivos para o grupo de Organismos Acumuladores de Fósforo (OAPs) e para verificação de acúmulo efetivo de Poly-P e de PHAs, se empregou a técnica analítica de FT-IR (Infravermelho por transformada de Fourier).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas e identificadas por diferenças morfológicas, duas cepas distintas de bactérias. Através de ensaios de biorremediação, foi possível observar que cada cepa bacteriana têm um comportamento distinto em relação à acumulação de Polifosfato (Poly-P) e produção de PHAs distintos. Ao reduzir a fonte de carbono do meio e diminuir a razão de C:P (Carbono:Fosfato), maiores foram as eficiências de redução de fósforo, pelo aumento na acumulação de Poly-P, para tanto se observou a redução da produtividade celular de PHAs.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o trabalho demonstra a importância das etapas de isolamento e seleção de microorganismos, para que ocorra de forma efetiva a bioprospecção de bactérias potencialmente acumuladores de fósforo e produtoras de o polihidroxialcanoatos em efluentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, Dulce María et al. Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: effect of nutrients limitation and photoperiods. **New biotechnology**, v. 42, p. 1-11, 2018.



BLANK, Lars M. The cell and P: from cellular function to biotechnological application. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 846-851, 2012.

MEKONNEN, Mesfin M.; HOEKSTRA, Arjen Y. Global anthropogenic phosphorus loads to freshwater and associated grey water footprints and water pollution levels: A high-resolution global study. **Water resources research**, v. 54, n. 1, p. 345-358, 2018.

NOVAIS, Sarah Vieira et al. Phosphorus removal from eutrophic water using modified biochar. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 825-835, 2018.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Lodos Ativados. v. 4. rev. e ampl. **Belo Horizonte: Editora UFMG**, 2016.

**Variação na forma, tamanho e dimorfismo sexual em
Philodryas aestiva e *Pseudablades patagoniensis* (Serpentes: Dipsadidae)
a partir de análises de morfometria geométrica**

Miriam Duarte¹; Tamires Pereira Pintado²; Adriana Gava³

¹Universidade Federal do Rio Grande – miriamfurg@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – tamires.pintado@riogrande.ifrs.edu.br

³Universidade Federal do Rio Grande – adriana.gava@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a variação adaptativa é um dos componentes principais da evolução por seleção natural, já que resulta em sobrevivência e/ou, reprodução diferenciais de indivíduos com características hereditárias mais bem ajustadas às condições ambientais (VINCENT et al., 2009).

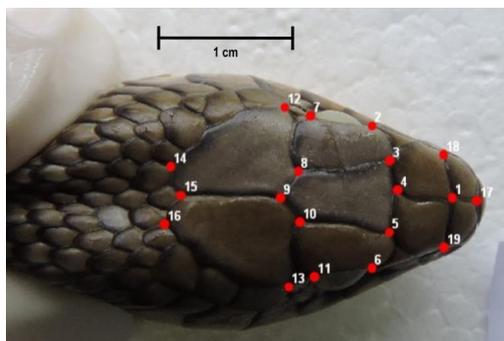
A morfometria geométrica vem se popularizando nos estudos que buscam identificar diferenças morfológicas, já que permite análises mais detalhadas da morfologia e do tamanho, além de possibilitar a comparação da forma do corpo dos organismos e a aplicação de análises estatísticas mais detalhadas (TAMAGNINI et al., 2018). *Pseudablades patagoniensis* é mais terrestre e possui maior tamanho e robustez corporal em comparação com *P. aestiva*, além de divergir quanto à dieta que inclui itens como anuros, peixes e roedores associados à ambientes úmidos e alagados (QUINTELA & LOEBMANN, 2019). Logo, este trabalho teve como objetivo comparar o tamanho e a forma da cabeça de *P. patagoniensis* e *P. aestiva*, assim como testar o dimorfismo sexual nessas variáveis utilizando a morfometria geométrica como ferramenta.

2. METODOLOGIA

Espécimes da coleção da Universidade Federal do Rio Grande, *Philodryas aestiva* e *P. patagoniensis* têm sido coletados desde 2006 ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Esse estudo utilizou 113 espécimes adultos preservados em álcool, 47 de *P. aestiva* (24 fêmeas e 23 machos) e 66 de *P. patagoniensis* (40 fêmeas e 26 machos).

Fotografias do plano dorsal da cabeça de cada espécime foram obtidas com câmera (Nikon Coolpix P600). Os 19 marcos anatômicos (LMs, Fig.1) foram digitalizados no programa TPSdig2 v.2,31 (Rohlf 2015, Fig.1). A sobreposição generalizada de Procrustes das coordenadas dos LMs, como implementada no programa MorphoJ (Klingenberg 2011), gerou variáveis de forma (variáveis de Procrustes) e tamanho do centroide (CS) utilizados nas análises estatísticas posteriores; a variação na forma em comparação à configuração média foi visualizada por meio dos LMs unidos por linhas (Klingenberg 2013).

Figura 1: Posição dos marcos anatômicos utilizados



Os testes de Shapiro-Wilk e Levene avaliaram as premissas de normalidade e homogeneidade das variâncias do CS em relação à média, considerando as espécies e os sexos. Como a variância do CS apresentou heterocedasticidade ($p < 0,001$), o teste F de Welch foi utilizado para verificar diferenças entre o CS médio das espécies ou dos sexos (Tab. 1). Assim, diferenças relacionadas às espécies e ao dimorfismo sexual no CS foram visualizadas usando boxplots (RStudio Team 2022) (Fig. 2A). Diferenças na forma média da cabeça das serpentes foram avaliadas por uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) de duas vias, onde os fatores espécie e sexo foram considerados (Tab. 2). O grau de dimorfismo nas espécies quanto ao tamanho e à forma foi avaliado pelo índice de dimorfismo sexual (Tab.3). Todas as estatísticas foram obtidas pelo PAST v. 4,09c (Hammer et al., 2001). As dimensões principais da variação na forma da cabeça das espécies e dimorfismo sexual foram observadas por meio de uma análise dos componentes principais (PCA) das coordenadas de Procrustes, como implementado no programa MorphoJ (Klingenberg 2011), cujos coeficientes são apresentados na Fig. 4B.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Philodryas aestiva e *Pseudablabes patagoniensis* divergiram significativamente quanto ao tamanho da cabeça, existindo dimorfismo sexual significativo para o tamanho do centroide (Tab. 1). Sendo assim, *P. patagoniensis* apresentou o maior centroide em comparação com *P. aestiva*, fato que pode ser explicado pelo maior tamanho e robustez corporais da primeira espécie (QUINTELA & LOEBMANN, 2019). O dimorfismo sexual de tamanho aqui encontrado também foi relatado para outra variável, o comprimento rostro-cloacal médio, para o qual as fêmeas são maiores QUINTELA & LOEBMANN (2019) (Fig. 2A).

Divergência na forma da cabeça das espécies, assim como o dimorfismo sexual de forma foram significantes, com o fator espécie (16%) sendo mais determinante do que o sexo (3,3%) (Tab. 2). O dimorfismo sexual foi corroborado pelos índices que revelaram um grau de dimorfismo de tamanho mais acentuado em *P. aestiva* do que em *P. patagoniensis*, quanto à forma, a tendência foi inversa (Tab. 3).

Os eixos PC1 e PC2 explicaram 27,6% e 14,3% da variação na forma, respectivamente, mostrando a sobreposição dos sexos e a separação das espécies dentro do morfo-espaco (Fig. 2B). O PC1 mostra o aumento da largura da cabeça e da escama parietal no setor positivo, localização de *P. patagoniensis*, compatível com o hábito alimentar anurofágico e concordando com os resultados encontrados por TAMAGNINI et al. (2018) para *Natrix helvetica*. Já o PC2 exibe principalmente o aumento da largura da escama frontal em *P. aestiva*, no setor negativo do gráfico, compatível com o hábito generalista da espécie, que consome desde insetos até pequenos mamíferos e com o hábito da espécie de explorar ambientes arbustivos e arbóreos (QUINTELA & LOEBMANN, 2019).

Tabela 1: Diferenças no tamanho médio do centroide da cabeça em função da espécie (*Philodryas aestiva* ou *Pseudablabe patagoniensis*) e do sexo (fêmea ou macho). g.l.: graus de liberdade. Os valores em negrito são significativos.

	Fator	g.l.	F de Welch	valor p
Tamanho do centroide	Espécie	97,9	119,8	< 0,001
	Sexo	110,6	17,7	< 0,001

Tabela 2: Dimorfismo na forma da cabeça em função da espécie (*Philodryas aestiva* ou *Pseudablabe patagoniensis*) e sexo (fêmea ou macho). g.l.: graus de liberdade; SS: soma dos quadrados; MS: estimativas dos quadrados médios. Os valores em negrito são significativos.

	Fator	g.l.	SS	MS	F	valor p
Coordenadas de Procrustes	Espécie	1	0,0454	0,0454	22,743	0,0001
	Sexo	1	0,00729	0,00729	3,65	0,001
	Interação	1	0,000759	0,000759	0,379	0,95
	Resíduos	109	0,218	0,00199		
	Total	112	0,271			

Tabela 3: Índices de dimorfismo sexual em *Philodryas aestiva* e *Pseudablabe patagoniensis*, serpentes simpátricas da região costeira do Rio Grande do Sul. Csmédio: tamanho médio do centroide.

Espécie	Dimorfismo sexual no tamanho (SSD)	Dimorfismo sexual na forma (SShD)		
	(Csmédio fêmeas – Csmédio machos) Csmédio fêmeas	Distâncias médias de Procrustes	Distância Procrustes Máxima	Índice de dimorfismo
<i>P. aestiva</i>	17,5 %	0,0158	0,046	34,35 %
<i>P. patagoniensis</i>	12,8 %	0,018	0,046	39,13 %

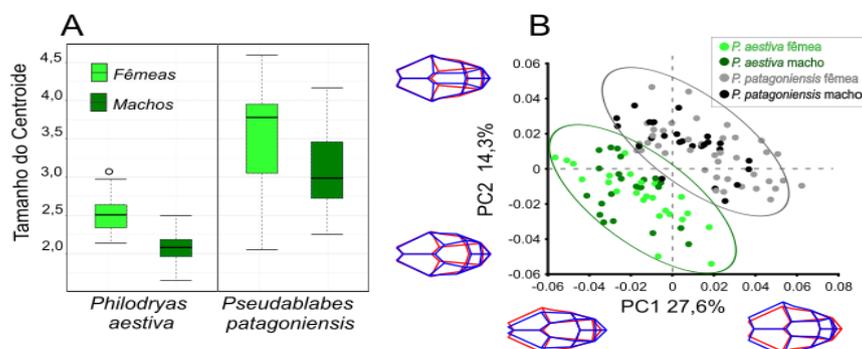


Figura 2: A: Boxplot do tamanho do centroide. Os limites das caixas correspondem ao primeiro e terceiro quartil, enquanto a linha preta interna representa a mediana. B: Gráfico de dispersão mostrando a variação nos escores PC1 e PC2. As configurações de forma nos extremos de cada componente estão mostradas em azul em comparação com a forma média (vermelho).

4. CONCLUSÕES

Com esse trabalho, pudemos concluir que existe dimorfismo sexual nas duas espécies estudadas. Além disso, observamos que os hábitos alimentares, assim como o modo de vida das serpentes pode estar sendo refletido no formato da cabeça. Ainda, a morfometria geométrica demonstrou ser uma ferramenta eficiente na identificação de diferenças intra e interespecíficas, concordando com resultados preexistentes que utilizaram as mesmas espécies para responder perguntas similares utilizando outras metodologias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, vol. 4, 9p., 2001.
- KLINGENBERG, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, vol. 11, pag. 353-357, 2011.
- KLINGENBERG, C.P. Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy*, vol. 24, pag. 15-24, 2013.
- QUINTELA, F. M. & LOEBMANN, D. Diet, sexual dimorphism and reproduction of sympatric racers *Philodryas aestiva* and *Philodryas patagoniensis* from the coastal Brazilian Pampa. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 91, pag. 1-12, 2019.
- ROHLF, F. J. tps Utility program. SUNY at Stony Brook, 2013.
- ROHLF, F. J. tps Dig2. program. SUNY at Stony Brook, 2015.
- RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2020.
- SHINE, R. B.; PHILLIPS, H.; WAYE, M.; LEMASTER R. T. Benefits of female mimicry in snakes. *Nature*, vol. 414, pag. 267, 2001.
- TAMAGNINI, D.; STEPHENSON, J.; BROWN, R. P.; MELORO, C. Geometric morphometric analyses of sexual dimorphism and allometry in two sympatric snakes: *Natrix helvetica* (Natricidae) and *Vipera berus* (Viperidae). *Zoology*, vol. 129, pag. 25-34, 2018.
- VINCENT, S. E., BRANDLEY, M. C., HERREL, A., ALFARO, M. E. Convergence in trophic morphology and feeding performance among piscivorous Natricine snakes. *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 22, pag. 1203-1211, 2009.

LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces*, EFEITO PROBIÓTICO E A IMUNOMODULAÇÃO DE VACINA CONTRA SARS-COV-2

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ¹; NEIDA LUCIA CONRAD²;
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES³; GUSTAVO MAAS RETZLAF⁴;
YASMIM DE MACEDO CORRÊA⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – renanbiotec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – vitoriasgon@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – gustavo.retzlaf@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – yasmimcorress2@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, Lab. de Microbiologia, CDTec – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A definição de probióticos, a qual se refere a microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (AMORIM *et al.*, 2018), está estabelecida há anos. O efeito imunestimulatório dos probióticos está relacionado à potencialização da resposta imune a diferentes vacinas e antígenos, tendo sua utilização sugerida no tratamento e prevenção da infecção por SARS-CoV-2 (OLAIMAT *et al.*, 2020).

Saccharomyces boulardii é comercializada e estudada desde os anos 1950, e atualmente é a levedura melhor caracterizada quanto sua atividade probiótica (AMORIM *et al.*, 2018). Contudo, outras leveduras não-*Saccharomyces* emergem como possíveis novos probióticos de ação benéfica igual ou superior às observadas para *S. boulardii* (CASSANEGO *et al.*, 2017). Essas leveduras são ubíquas no ambiente, sendo frequentemente isoladas de fontes como superfícies de frutas, plantas, no solo e em alguns insetos (TIKKA *et al.*, 2013). Assim podem representar ferramentas importantes disponíveis de acordo com a biodiversidade do local onde foram isoladas. O antagonismo a patógenos, a produção de toxinas *killer*, a tolerância ao trato gastrointestinal (TGI) e outros atributos que caracterizam microrganismos probióticos são observados também em leveduras dos gêneros *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., entre outros (HATOUM *et al.*, 2012). Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o potencial probiótico, a partir de testes *in vitro* e *in vivo*, de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas da biodiversidade local.

2. METODOLOGIA

As leveduras *Pichia kluyveri* LAR001, *Hanseniaspora uvarum* PIT001 e *Candida intermedia* ORQ001 foram isoladas na cidade de Pelotas, RS (Brasil) e estavam disponíveis no banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPEl. Essas leveduras, além de *S. boulardii* CNCM I-745 (Floratil®), foram selecionadas para avaliação de sua atividade probiótica e imunomoduladora. Inicialmente, foi avaliada a capacidade das leveduras resistirem às condições do TGI. Ambientes artificiais, que simulam o suco gástrico e o suco pancreático, foram utilizados incubando ~10⁸ UFC/mL de cada levedura sob

agitação a 150 rpm, 37 °C e, avaliada após 7 h de cultivo a concentração de células viáveis. A atividade antimicrobiana contra bactérias relacionadas à Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) foi analisada pelo protocolo de dupla camada (AMORIM *et al.*, 2018), em que 10 µL de cada levedura foi aplicado em meio YPD ágar (*Yeast Peptone Dextrose*). Após 48 h de incubação a 28 °C, ágar nutriente (ágar 0.7%) adicionado da cultura bacteriana foi aplicado sobre o cultivo. Após 24 h a 37 °C, halos de inibição de crescimento são formados pela atividade antagonista da levedura.

Testes de auto-agregação (levedura + levedura) foram realizados com suspensões das leveduras com D.O._{600nm} de 0.25, as quais foram incubadas nas temperaturas de 18, 28 e 37 °C. Após 2 e 20 h, a D.O._{600nm} foi avaliada novamente, e esses valores foram utilizados na equação $[1 - D.O._{600nm} \text{ da suspensão final} / D.O._{600nm} \text{ da suspensão inicial}] \times 100$. Nos testes de co-agregação (levedura + patógeno), os patógenos *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram-negativa) e *Listeria monocytogenes*

ATCC 7644 (Gram-positiva) também tiveram a D.O._{600nm} de suas suspensões ajustadas para 0.25. Então, volumes iguais (1:1) das suspensões das leveduras e bactérias (na mesma D.O._{600nm}) foram misturados e incubados nas mesmas condições que o teste de auto-agregação. A absorbância após 2 e 20 h foi aplicada na equação: $[(A_{pat} + A_{isol}) - (A_{mix})] / (A_{pat} + A_{isol}) \times 100$, em que “A_{pat} + A_{isol}” representa a D.O._{600nm} da mistura patógeno + isolado no tempo 0 h, e “A_{mix}” é a D.O._{600nm} das suspensões de microrganismos nos diferentes períodos avaliados.

Células vivas (10⁸ UFC/mL) e inativadas por calor e pressão (120 °C e 1 atm), sobrenadantes da cultura, e o DNA extraído (850 ng) das leveduras foram utilizados para estimular culturas *in vitro* de macrófagos murinos RAW 264.7. O RNA dos macrófagos foi extraído utilizando TRIzol, e então a concentração de 400 ng foi utilizada para obtenção do cDNA. As reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit SYBR Green qPCR Master Mix (Promega, USA), em que 1 µl de cDNA foi aplicado. A transcrição relativa de mRNA de *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL23*, *TNFα*, *Bcl6*, *NFκβ*, *STAT3*, *YM1*, e *TLR2* foram determinadas com β-actina como gene de referência endógeno, usando o método CT comparativo (ΔΔCt).

Camundongos Balb/c foram separados em 5 grupos de 10 animais cada. Cada um desses grupos foi suplementado, via gavagem (tubo intragástrico), com 10⁸ UFC/mL de cada uma das leveduras, ou PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (grupo controle). Os animais foram vacinados pela via subcutânea, no dia 0 e 21, com uma vacina experimental composta pelo vírus SARS-CoV-2 inativado na concentração de 10⁶ UFP (Unidades Formadoras de Placa), adicionado de 10% hidróxido de alumínio (adjuvante), em um volume total de 100 µL. A suplementação dos animais foi realizada durante 5 dias antes de cada dose vacinal. Amostras de sangue e fezes foram coletadas a cada 7 dias, em um período total do experimento de 42 dias. Para análise da resposta imune humoral, foi realizado o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) com SARS-CoV-2 ligado à placa, sendo avaliados os isotipos IgM, IgA e IgG.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que não foi observada diferença estatística na concentração de células viáveis após a incubação na solução que simulava a digestão gástrica (p>0.05). *C. intermedia*, *H. uvarum* e *P. kluyveri* tiveram uma redução de 1

\log_{10} a $2 \log_{10}$ quando submetidas à solução de digestão pancreática. Enquanto no estudo de CASSANEGO *et al.* (2017) foi visualizado que grande parte das leveduras não resistiu às condições de digestão pancreática, em nosso estudo observamos que todas as leveduras avaliadas mantiveram células viáveis após estarem sujeitas à essa condição. A auto-agregação é uma propriedade importante para adesão às células epiteliais do intestino, em que níveis $>80\%$ são considerados indicadores de boa capacidade de adesão (AMORIM *et al.*, 2018). O percentual de auto-agregação ao final do teste manteve-se acima de 84% para todas as leveduras. Os menores percentuais foram observados a 18°C . Quando incubadas a 28 e 37°C , o percentual de auto-agregação detectado foi $>98\%$ para as três leveduras não-*Saccharomyces*.

A atividade antagonista e co-agregatória são características buscadas em probióticos, uma vez que representam a habilidade em dificultar ou até mesmo prevenir o desenvolvimento de patógenos que penetram sítios nas mucosas do organismo (AMORIM *et al.*, 2018). As leveduras analisadas demonstraram capacidade inibitória do crescimento dos patógenos alimentares *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Moraxella* spp. e *Klebsiella* spp. Os percentuais de co-agregação com *E. coli* e *L. monocytogenes*, a 28 e 37°C , mantiveram-se entre $60-78\%$. No entanto, quando a incubação foi mantida em 18°C , esses percentuais foram significativamente menores ($p<0.05$) e inferiores a 60% , demonstrando que a temperatura afeta essa propriedade. Quando as leveduras foram incubadas com *L. monocytogenes*, foi observado um aumento no percentual de co-agregação, entre $5-12\%$ ($p<0.05$).

Pesquisadores caracterizaram diferentes padrões de resposta imune induzida pelo estímulo por leveduras, como observado também em nosso trabalho (BAZAN *et al.*, 2018). Células vivas e inativadas de *P. kluyveri* foram capazes de estimular um aumento na expressão de *Bcl-6*, *NF κ B* e *STAT3* ($p<0.05$). Para esses dois estímulos, foi observado também o aumento da expressão do receptor TLR2. Resultados similares foram observados para *H. uvarum*, em que houve um aumento significativo na expressão do mRNA dos fatores de transcrição quando células inativadas da levedura foram usadas como estímulo. Células vivas de *H. uvarum* também foram responsáveis pelo aumento expressivo do fator *Bcl-6*. Quando células vivas de *C. intermedia* foram utilizadas para estimular os macrófagos, uma potente ativação de *IL4* e *IL13* foi observada. Para células inativadas dessa levedura, foi observada a indução da expressão de níveis significativos de *TNF α* e *Bcl-6*. Ainda, o sobrenadante do cultivo de *C. intermedia* foi capaz de induzir a expressão de mRNA do receptor TLR2 por macrófagos RAW 264.7. Leveduras também possuem atividade paraprobiótica, ou seja, células não-viáveis que estimulam a resposta imune, como observado em nosso trabalho e em outros para *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp. e *Pichia* spp. (BAZAN *et al.*, 2018; NAVARRO-ARIAS *et al.*, 2019).

Os níveis de IgM específica contra SARS-CoV-2 foram aumentados a partir do dia 35 no grupo suplementado com *C. intermedia*. As suplementações com as leveduras *C. intermedia* e *S. boulardii*, a partir do dia 28 do experimento, foram capazes de modular um aumento significativo dos níveis de IgG total ($p<0.05$) nos respectivos grupos quando comparados ao grupo controle (não suplementado). Na titulação de IgG, todas as leveduras foram responsáveis por títulos superiores no dia 35 em até 8 vezes frente ao grupo não suplementado e suplementados com *S.*

boulardii. Entre as leveduras não-*Saccharomyces*, os maiores títulos de IgG nos dias 28 e 42 foram observados no grupo suplementado com *C. intermedia*. Foi possível detectar a presença de IgA secretora (slgA) específica nos animais a partir das amostras fecais, um indicativo que houve modulação da resposta imune de mucosa. Nos animais suplementados com *H. uvarum*, foram observados maiores níveis de slgA após 7 dias da primeira dose ($p < 0.05$), enquanto animais do grupo *C. intermedia* apresentaram níveis de slgA superiores a partir dos 35 dias do experimento, ambos comparados com o grupo controle vacinado não suplementado. O nosso grupo já demonstrou o efeito imunomodulador de *S. boulardii* em diversos modelos animais com outras vacinas experimentais (SANTOS *et al.*, 2021), no presente estudo, demonstramos esse efeito imunomodulador também em leveduras não-*Saccharomyces*, associadas a vacinação com o vírus SARS-CoV-2.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que leveduras não-*Saccharomyces* isoladas da biodiversidade local possuem propriedades que caracterizam sua potencial ação probiótica. Além disso, quando utilizadas para suplementação, sugerem ter impacto na resposta imune humoral contra uma vacina experimental composta por SARS-Cov-2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, J. C.; PICCOLI, R. H.; DUARTE, W. F. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International**, v. 107, n. 1, p. 518-527, 2018.
- BAZAN, S. B.; WALCH-RUCKHEIM, B.; SCHIMITT, M. J. Maturation and cytokine pattern of human dendritic cells in response to different yeasts. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 1, p. 75-81, 2018.
- CASSANEGO, D.; RICHARDS, N.; VALENTE, P. *et al.* Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS. **Food Science and Technology**, v. 38, n.1, p. 59-65, 2017.
- HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-12, 2012.
- NAVARRO-ARIAS, M. J.; HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J.; GARCÍA-CARNERO, L. C. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, n. 1, p. 783-794, 2019.
- OLAIMAT, A. N.; AOLYMAT, I.; AL-HOLY *et al.* The potential application of probiotics and prebiotics for the prevention and treatment of COVID-19. **npj Science of Food**, v. 4, n. 1, 2020.
- SANTOS, F. D. S.; MAUBRIGADES, L. R.; GONÇALVES, V. S. *et al.* Immunomodulatory effect of short-term supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112T and *S. boulardii* CNCM I-745 in sheep vaccinated with *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 237, n. 1, p. 110272, 2021.
- TIKKA, C.; OSURU, H.; ATLURI, N. *et al.* Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. **Bioinformation**, v. 9, n. 8, p. 421-425, 2013.

GENÔMICA ESTRUTURAL APLICADA AO MONITORAMENTO AMBIENTAL DE PEIXES-ANUAIS *Austrolebias charrua*

ANTÔNIO DUARTE PAGANO¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²;
MARIANA HÄRTER REMIÃO²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹ Laboratório de Genômica Estrutural (CDTec - UFPel) – antonioduartepagano@gmail.com

² Laboratório de Genômica Estrutural (CDTec – UFPel) - williamwwe@yahoo.com.br

² Laboratório de Genômica Estrutural (CDTec - UFPel) – marri.hr@gmail.com

³ Laboratório de Genômica Estrutural (CDTec - UFPel) – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os peixes-anuais representam o grupo continentais de peixes mais ameaçado do Brasil. Esses animais habitam ambientes sazonais extremos, os charcos temporários. Durante a estação seca, a totalidade da população adulta é levada a morte, permanecendo apenas os ovos enterrados no solo. Esses são resistentes aos ciclos sazonais de seca ao manterem-se em estágio de dormência, conhecido como diapausa. Na próxima estação chuvosa, com o enchimento dos charcos, esses ovos eclodem e iniciam um novo ciclo. Os juvenis recém-eclodidos crescem, atingem a maturidade sexual rapidamente e reproduzem ao longo de toda sua vida, estocando uma quantia significativa de ovos no substrato ao final do período reprodutivo (BEROIS et al., 2015).

Nesta perspectiva, *Austrolebias charrua* (*A. charrua*) é uma espécie de peixe-anual endêmica ameaçada de extinção, distribuindo-se desde o sul do Brasil ao leste do Uruguai. Essa espécie encontra-se sob proteção do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos (PAN Rivulídeos). Também, é considerada espécie-chave para acompanhamento no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018). O principal fator antropogênico que ameaça a sobrevivência de *A. charrua* no ambiente é a agricultura extensiva, sobretudo orizicultura e sojicultura, que determina a perda das áreas alagadas e a contaminação dos charcos através do uso indevido de pesticidas agrícolas, especialmente o herbicida baseado em glifosato Roundup® (VOLCAN; LANÉS, 2018).

Neste sentido, muito ainda falta a ser entendido sobre a genômica estrutural e funcional dos peixes-anuais, sobretudo aspectos relacionados à expressão de genes e os fatores ambientais que influenciam as espécies a nível molecular. Isso representa um entrave para o emprego de técnicas de verificação dos níveis de expressão gênica, como a PCR quantitativa (qPCR), considerando técnica padrão-ouro para análise da expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA) pela rápida leitura, alta eficiência e alto grau de automatização (TANG et al., 2012). Na qPCR, para análise da expressão gênica relativa de mRNA, compara-se a expressão de genes-alvo à expressão constante de genes de referência (normalizadores). Uma vez que a utilização dessa técnica predispõe o conhecimento exato da sequência nucleotídica espécie-específica dos genes a serem analisados, o sequenciamento de normalizadores em *A. charrua* torna-

se o primeiro passo para analisar a expressão gênica nesta espécie. Nesta perspectiva, a fim de impulsionar o desenvolvimento de novas biotecnologias de monitoramento ambiental de peixes-anaís, este trabalho descreve a clonagem molecular e sequenciamento de genes normalizadores em *A. charrua*.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta dos animais e condições de criação

Indivíduos ($n = 24$) da espécie *Austrolebias charrua* em estágio adulto foram co-letados em poças temporárias através do uso de puçás de malha 4mm, em campos costeiros próximos a orla da praia do Cassino no município de Rio Grande (32°2'6" 52°5'56"O). A coleta foi realizada sob alvará IBAMA/SISBIO 71072. Os espécimes foram transferidos para tanques com água do ambiente, e transportados até o Biotério Aquático da Universidade Federal do Rio Grande onde foram mantidos durante 3 semanas sob condições de criação previamente estabelecidas até a futura extração dos tecidos. O uso animal e todas as práticas de manejo foram aprovadas por comitês de ética em experimentação animal (CEEA UFPEL 145/2019 e CEUA FURG P053/2019).

2.2. Coleta dos tecidos, extração de RNA e síntese de cDNA

Os animais foram submetidos ao choque térmico com água e gelo até a perda total do equilíbrio para eutanásia. Amostras de cérebro, brânquias e fígado foram coletadas, acondicionadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (N₂). Por conseguinte, o RNA das amostras foi extraído por cromatografia de troca iônica usando PureLink™ RNA Mini Kit (USA). Após, o RNA foi quantificado e avaliado em termos de pureza (razão A 260 / A 280 usando o espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, USA). A confecção de DNA complementar foi realizada usando kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA).

2.3. Clonagem molecular e sequenciamento de normalizadores

Este estudo objetivou clonar sete genes normalizadores de peixes anuais *A. charrua* sendo estes: RNA ribossômico 18s (*18s*); β -actina (*actb*); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*); short stature homeobox (*shox*); fator de alongamento 1- α (*ef1 α*); subunidade G do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica (*eif3g*), e histona h3a (*h3a*) Para clonagem molecular dos genes candidatos o alinhamento de sequências de espécies filogeneticamente próximas à *A. charrua* e o desenho dos primers foram realizados na ferramenta online PriFi. O cDNA confeccionado e os primers foram utilizados nas PCRs, onde foi usado o mix buffer GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. A amplificação clonal dos fragmentos gênicos ocorreu em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, USA), e confirmada via eletroforese em gel agarose. Para o subsequente sequenciamento de genes, a purificação dos produtos da PCR foi realizada através de gel eletrônico E Gel™ EX Agarose Gels (Invitrogen, USA). As amostras purificadas a partir do E Gel foram então, submetidas ao sequen-

ciamento pelo método de Sanger automatizado na plataforma Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer® (Life Technologies, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O risco de extinção iminente dos peixes-anaís brasileiros torna urgente o desenvolvimento de novas metodologias de monitoramento ambiental, a fim de acessar a toxicidade dos ambientes aquáticos e minimizar o risco de exposição à xenobióticos. De forma inovativa, este trabalho impulsiona a geração de métodos moleculares de monitoramento de peixes-anaís através de um painel de genes normalizadores para análises de expressão gênica pela técnica de qPCR (Tabela 1). Então visto que os normalizadores não possuíam sua sequência nucleotídica caracterizada, realizamos a clonagem molecular destes genes. Uma vez que os primers engenheirados apresentaram alta especificidade aos fragmentos de interesse, os sete genes candidatos foram clonados com sucesso (Figura 1).

Tabela 1. Sumário dos genes normalizadores candidatos.

Gene	T_m média (°C)/ Amplicon (pb)	GenBank accession
<i>18s</i>	64°C / 733pb	ON243868
<i>actb</i>	62.5°C / 721pb	ON212043
<i>gapdh</i>	64°C / 719pb	ON212047
<i>shox</i>	62°C / 836pb	ON212048
<i>ef1α</i>	64°C / 892pb	ON212045
<i>ef3g</i>	62°C / 802pb	ON212046
<i>h3a</i>	66°C / 241pb	ON245197

Haja visto que normalizadores atuam como controle endógeno da reação de qPCR, o presente trabalho gera subsídios para futuras análises de expressão gênica em peixes-anaís. A caracterização a nível genômico destas espécies facilita o direcionamento de medidas de conservação e monitoramento ambiental a partir de biotecnologias baseadas em marcadores moleculares. Isso possui extrema relevância em ecotoxicologia aquática, uma vez que a exposição à herbicidas agrícolas representa um dos principais fatores que ameaçam *A. charrua*. Mudanças na expressão gênica potencialmente indicam toxicidade ambiental, uma vez que genes constituem biomarcadores sensíveis e específicos à exposição a poluentes (FEDORENKOVA et al., 2010). Desta forma, através da qPCR é possível diagnosticar a qualidade da água e mensurar o efeito de agentes antropogênicos sob a biota aquática.

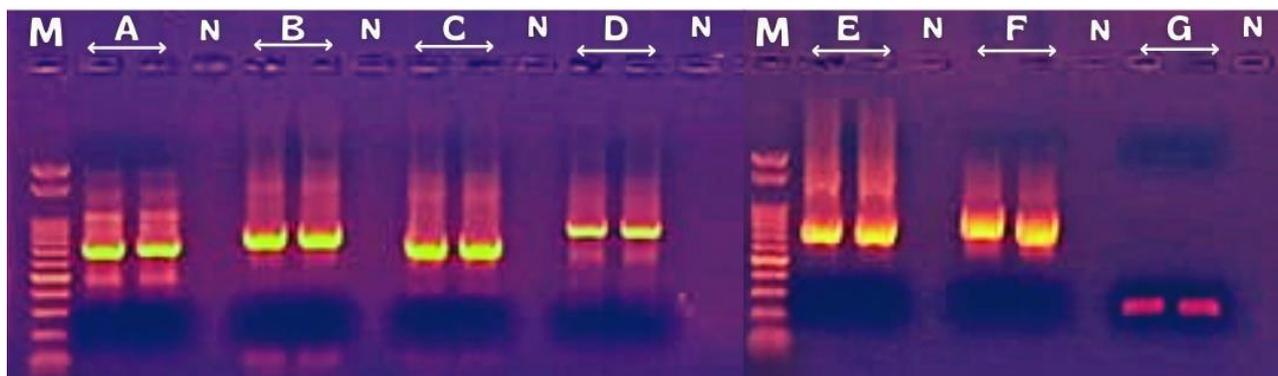


Figura 1. Clonagem molecular de genes normalizadores. A- gene *eif3g*; **B-** gene *shox*; **C-** gene *gapdh*; **D-** gene *ef1 α* ; **E-** gene *18s*; **F-** gene *actb*; **G-** gene *h3a*; **M-** marcador molecular 100pb; **N-** controle negativo.

4. CONCLUSÕES

A prospecção de um painel de genes normalizadores incrementa significativamente o conhecimento sobre a genômica, fisiologia e zootecnia destes animais. Especialmente no cenário dos peixes-anaís, o grupo de peixes mais ameaçado do Brasil, a partir deste trabalho abrem-se diversas possibilidades de desenvolvimento de biotecnologias inovadoras aplicadas ao monitoramento ambiental destas espécies. A detecção de respostas biológicas moleculares geradas por organismos bioindicadores (*Austrolebias charrua*) durante situações ambientais adversas, pela técnica de qPCR, torna possível a prospecção de um diagnóstico molecular de qualidade ambiental dos charcos temporários, ambientes usualmente poluídos por glifosato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEROIS et al. Annual Fishes - Life History Strategy, Diversity, and Evolution. **CRC Press**, New York, 2015.

ICMbio. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI – Peixes**, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Ministério do meio ambiente. 1235 p. Brasília. 2018.

TANG, Y. KAI et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio var. jian*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 775–779, 2012.

VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, n. 6400, p. 340–341, 2018.

FEDORENKOVA et al. Ecotoxicogenomics: bridging the gap between genes and populations. **Environ Sci Technol**. 2010 Jun 1;44(11):4328-33.

RESULTADOS PRELIMINARES DE UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A RELAÇÃO ENTRE O MARCADOR DE CÉLULAS TRONCO OCT4 E A PROTEÍNA DE EFLUXO ABCB1 NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

JULIE MEDEIROS DA SILVEIRA¹; EDUARDO FELIPE WAGNER²; ANA PAULA DE
SOUZA VOTTO³

¹Universidade Federal do Rio Grande – FURG – julie.msilveira67@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – FURG – eduardo.felipe.wagner@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande – FURG – anavotto@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O efluxo de substâncias prejudiciais é realizado por células não-cancerígenas como uma forma de protegê-las dos danos desses compostos (CORT et al. 2016). Essa atividade é desempenhada pelas proteínas transportadoras “ATP-binding cassette” (ABC), como por exemplo a glicoproteína-P, também conhecida como ABCB1 ou MDR1 (SZAKÁCS et al. 2006). Porém, esse mecanismo também é utilizado por células cancerígenas e, nesse contexto, a utilização de fármacos citotóxicos utilizados para o tratamento do câncer acaba resultando em uma maior estimulação de expressão e atividade dessas proteínas (CORT et al. 2016). Dessa forma, uma vez que as células conseguem fazer a extrusão dos medicamentos para o tratamento do câncer, elas conseguem seguir sobrevivendo e proliferando, e assim são caracterizadas como resistentes aos tratamentos. Sendo assim, visto que a resistência pode ocorrer para drogas que não apresentam relação em estrutura e/ou mecanismo de ação, este fenótipo dificultador do tratamento do câncer é chamado de resistência à múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN *et al.* 2002).

Todavia, o câncer também pode ser constituído por células tronco cancerígenas (CTC) (DEAN et al. 2005) que, assim como as células tronco, apresentam a capacidade de se auto renovar e originar células diferenciadas (BARBATO et al. 2019). Porém, as CTC também expressam os mecanismos de resistência (ZHAO 2016), bem como são capazes de regenerar o tumor maligno (DEAN et al. 2005) uma vez que a quimioterapia convencional não consegue eliminá-las (WEN et al. 2013). Além disso, foi identificado que o marcador de células tronco OCT4, que é um fator de transcrição (ATARI et al. 2011) que atua nas células tronco embrionárias nas etapas iniciais do desenvolvimento (SCHÖLER et al. 1989), bem como em células tronco de indivíduos adultos (TAI et al. 2005), também encontra-se nas CTC (ZEINEDDINE et al. 2014).

Não obstante, as pesquisas têm indicado uma possível relação entre a regulação das proteínas ABC com o marcador de células tronco OCT4, de forma que células cancerígenas resistentes aos tratamentos que apresentam uma maior expressão das proteínas ABC, também apresentam uma maior expressão do OCT4, enquanto a menor expressão das proteínas ABC também coincide com a menor expressão do OCT4 (WU et al. 2014, CARRET-DIAS et al. 2016; GWAK et al. 2017), o que indica que pode haver uma relação entre esses dois fatores. Nesse sentido, embora estudos já tenham demonstrado que existem sítios de ligação para o OCT4 nos genes da proteína ABCB1 (MARQUES et al. 2010), bem como que o pseudogene

OCT4-PG1 pode interferir na expressão de proteica de OCT4 e proteica e gênica de ABCB1 (LETTNIN et al. 2019), ainda não é conhecida de fato a forma como isso pode acontecer. Dessa forma, são levantadas as seguintes hipóteses: 1) as proteínas ABCB1 podem ter a sua atividade regulada pelo OCT4; 2) o OCT4 pode ser regulado pelas proteínas ABCB1; 3) o OCT4 e as proteínas ABCB1 atuam em um sistema de retroalimentação ou 4) são controlados por outro fator.

Buscando estabelecer quais são os principais pontos a serem pesquisados para contribuir com a compreensão da atuação das proteínas ABC e do OCT4 na resistência do câncer, a presente revisão sistemática têm como objetivo reunir em um único trabalho informações que forneçam as direções para responder à pergunta “qual é a relação de regulação entre o fator de transcrição OCT4 e as proteínas de efluxo ABCB1 no fenótipo de resistência a múltiplas drogas?”.

2. METODOLOGIA

A revisão sistemática encontra-se cadastrada no banco de dados online PROSPERO sob o número de registro CRD42022307209. A formulação da pergunta norteadora do trabalho utilizou-se do anagrama PICOT, onde (P): população (células cancerígenas que expressam ABCB1 e OCT4); (I): intervenção (avaliação da atuação do OCT4 e das proteínas ABCB1); (C): Comparador (interação entre o OCT4 e as proteínas ABCB1 na regulação do fenótipo de resistência), (O): Desfecho (do inglês, Outcome) (como o OCT-4 e/ou as proteínas ABCB1 regulam o fenótipo de resistência) e (T): Tipo de estudo (in vivo e in vitro), resultando no questionamento “qual é a relação de regulação entre o fator de transcrição OCT4 e as proteínas de efluxo ABCB1 no fenótipo de resistência a múltiplas drogas”.

A busca dos artigos que irão compor o trabalho foi realizada nas bases de dados PubMed, Web of Science, Scopus e Google Scholar. Os termos de busca utilizados foram “OCT4” e “MDR” com suas variações. O *software online* Rayyan foi utilizado para as etapas de a) exclusão de trabalhos duplicados ou triplicados; b) análise de título, palavras-chave e resumo para a exclusão dos trabalhos que não corroboram com a pesquisa seguindo os seguintes critérios: 1) o trabalho não é em português ou inglês; 2) o artigo não está disponível; 3) é artigo de revisão de qualquer natureza ou resumo de conferência; 4) não é um estudo in vivo ou in vitro; 5) não apresenta animais/células que expressam o OCT4 e as proteínas ABCB1; 6) não apresenta análises de expressão do OCT4 e das proteínas ABCB1; 7) o fenótipo de resistência não foi analisado pela expressão das proteínas ABCB1.

Os artigos caracterizados como “incluídos” para a elaboração da revisão sistemática são aqueles que serão lidos na íntegra e que terão os seus dados extraídos. Além disso, é importante citar que todas as etapas da elaboração da revisão sistemática são realizadas por dois pesquisadores independentes, e a consulta a um terceiro pesquisador independente foi realizada quando não houve concordância entre os dois primeiros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação de resultados é parcial, uma vez que a etapa de extração de dados ainda está em andamento. Sendo assim, têm-se que as buscas nas bases de dados resultaram em um total de 1345 artigos, sendo 317 do PubMed, 375 do Web of Science, 385 do Scopus e 269 do Google Scholar, onde 54% do total de artigos encontravam-se em comum entre as bases. Portanto, após a deleção dos trabalhos duplicados ou triplicados, 727 artigos passaram para a etapa de análise de critérios de inclusão e exclusão, dos quais 92 foram incluídos e 635 foram excluídos.

Analisando-se os artigos excluídos, é possível perceber que a maioria deles não apresenta animais ou células que expressam tanto o OCT4 quanto as proteínas ABCB1, o que resultou em 248 artigos excluídos pela razão 5. Além disso, 235 artigos foram excluídos pela razão 7 pois analisaram a resistência aos tratamentos por métodos como, por exemplo, viabilidade celular e citotoxicidade, e não pela expressão de proteínas ABCB1, o que abre a possibilidade de outros trabalhos de revisão sistemática serem realizados levando em conta esses outros tipos de análises. Também é interessante destacar que embora 114 tenham sido excluídos pela razão 3, muitos deles puderam ser utilizados para estudar a temática do trabalho.

Em relação à razão 2, 18 artigos foram excluídos uma vez que não se encontram disponíveis, assim como 16 artigos foram excluídos pela razão 1 pois encontravam-se em outros idiomas que não inglês ou português. Um resultado interessante é o fato de que apenas 4 artigos foram excluídos pela razão 6, o que faz sentido uma vez que a maioria dos artigos que citam a expressão do OCT4 e das proteínas ABCB1 costumam analisá-las. Por fim, não houveram exclusões em decorrência única da razão 4, uma vez que trabalhos in silico, por exemplo, também estavam acompanhados de trabalhos in vitro.

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares mostram que todas as etapas das revisões sistemáticas possuem resultados importantes, não apenas indicando trabalhos que poderão responder a pergunta de interesse e contribuir com o estudo teórico do pesquisador pré ensaios em laboratório, como também apresentando novas lacunas e possibilidades de pesquisa que podem ser exploradas para contribuir com o entendimento e novas descobertas acerca da temática de interesse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATARI, M.; BARAJAS, M.; HERNÁNDEZ-ALFARO, F.; GIL, C.; FABREGAT, M.; PADRÓ, E. F.; GINER, L.; CASALS, N. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 1, p. 1057-1070, Barcelona, 2011.

BARBATO, L.; BOCCHETTI, M.; DI BIASE, A.; REGAD, T. Cancer stem cells and targeting strategies. **Cells**, v. 8, n. 926, p. 1-19, Nottingham, 2019.

CARRETT-DIAS, M.; ALMEIDA, L. K; PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, D. V.; FILGUEIRA, D. M. V. B.; MARINS, L. F.; VOTTO, A. P. S.; TRINDADE, G. S. Cell

differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. **Leukemia Research**, v. 42, n. 1, p. 13-20, Brasil, 2016.

CORT, A.; OZBEN, T.; SASO, L.; DE LUCA, C.; KORKINA, L. Redox control of multidrug resistance and its possible modulation by antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Moscow, v. 2016, n. 4, p. 1-17, 2016.

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nature Reviews - Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275-284, Maryland, 2005.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews - Cancer**, Maryland, v. 2, n. 1, p. 48-58, 2002.

GWAK, J. M.; KIM, M.; KIM, H. J.; JANG, M. H.; PARK, S. Y. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 36305-36318, República da Coréia, 2017.

LETTNIN, A. P.; WAGNER, E. F.; CARRET-DIAS, M.; MACHANDO, K. S.; WERHLI, A.; CAÑEDO, A. D.; TRINDADE, G. S.; VOTTO, A. P. S. Silencing the OCT4-PG1 pseudogene reduces OCT-4 protein levels and changes characteristics of the multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 1873-1884, Brasil, 2019.

MARQUES, D. S.; SANDRINI, J. Z.; BOYLE, R. T.; MARINS, L. F.; TRINDADE, G. S. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. **Leukemia Research**, v. 34, n. 1, p. 757-762, Brasil, 2009.

SCHÖLER, H. R.; BALLILNG, R.; HATZOPOULOS, A. K.; SUZUKI, N.; GRUSS, P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 9, p. 2552-2557, Göttingen, 1989.

SZAKÁCS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews - Drug Discovery**, Maryland, v. 5, n. 3, p. 219-234, 2006.

TAI, M.; CHANG, C.; OLSON, L. K.; TROSKO, J. E. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem célula theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 495-502, Michigan, 2005.

WEN, K.; FU, Z.; WU, X.; FENG, J.; CHEN, W.; QIAN, J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer células enriched for cancer stem cells: Effects associated with STAT3/Survivin. **Cancer Letters**, v. 333, n. 1, p. 56-65, China, 2013.

WU, C. L.; LU, C. S.; SHIAU, A. L. Multidrug resistance gene MDR1 is transactivated by Oct4 to increase chemotherapy resistance. In: **EACR-23 CONGRESS**, Munich, 2014. Poster Sessions. European Journal of Cancer, Suppl. 5, S63.

ZEINEDDINE, D.; HAMMOUD, A. A.; MORTADA, M.; BOEUF, H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. **American Journal of Stem Cells**, v. 3, n. 2, p. 74-82, Bordeaux, 2014.

ZHAO, J. Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, n. 1, p. 145-158, Florida, 2016.

Imunogenicidade de vacina recombinante contra *Lawsonia intracellularis* em equinos

ANA VITÓRIA COSTA¹; NEIDA LUCIA CONRAD²; ILANA MAZZOLENI³;
VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES⁴; RENAN EUGÊNIO ARAUJO
PIRAINE⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ilana.mazzoleni@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - renanbiotec@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos principais setores da economia brasileira, onde se destaca a equinocultura. A indústria do cavalo é responsável pelo Produto Interno Bruto (PIB) de 16 bilhões de reais em 2018, com crescimento de 12% em relação ao ano anterior, ultrapassando importantes setores do agronegócio como a produção de suínos, feijão, trigo e algodão (FEBRAC, 2018). Em estados como o Rio Grande do Sul, a criação de equinos está relacionada à cultura regional, estando ligada a lazer, esporte e trabalho (COSTA et al., 2013).

Doenças infecciosas resultam em perdas diretas para a produção pecuária pela mortalidade, perda de produtividade, restrições comerciais e redução do valor de mercado (DEHOVE et al., 2012). A Enteropatia Proliferativa (EP) é uma doença que cursa com uma patologia intestinal possuindo distribuição mundial. A infecção foi inicialmente caracterizada em suínos, mas também é detectada com frequência em rebanhos equinos (COOPER & GEBHART, 1998). A bactéria Gram negativa intracelular obrigatória, *Lawsonia intracellularis*, é o agente da EP (GEBHART & GUEDES, 2010). Os principais sintomas descritos são diminuição nos níveis de reprodução, anemia, febre, diarreia e perda de peso, podendo levar o animal à óbito (PAGE et al., 2012).

A vacinação é a melhor medida profilática contra a EP, contudo não há vacinas comerciais destinadas a equinos (VISSCHER et al., 2018). As vacinas atualmente disponíveis para suínos são baseadas na bactéria ou em células vivas atenuadas de *L. intracellularis*, as quais exigem cultivo em larga escala em culturas celulares em suspensão, tornando a sua produção onerosa. As falhas na indução de imunidade esterilizante e intervenções adicionais para controlar a doença são limitações das vacinas disponíveis (RIBER et al., 2015; KRUSE et al., 2016).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma vacina recombinante contra *L. intracellularis* e avaliar sua imunogenicidade em equinos.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da proteína recombinante

O epítipo alvo para o desenvolvimento da vacina foi previamente selecionado através de estudos de vacinologia reversa. A sequência selecionada foi sintetizada pela Epoch Life Science, de acordo com a preferência de códon das células de *E. coli* BL21 (DE3), para isso inserida no vetor pet/28a. O plasmídeo recombinante *Li/pet28a* foi transformado em células *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3). A expressão e caracterização da proteína foi realizada conforme descrito por Sambrook & Russel (2012). A expressão foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. A quantificação da proteína foi realizada através de Ensaio de Bradford, utilizando curva de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich).

2.2 Vacinação de equinos

Foram utilizados 20 equinos (*Equus caballus*), machos e fêmeas adultos, hípidos e sem raça definida, divididos de forma aleatória em 2 grupos. Os animais do grupo 1, foram inoculados com a formulação experimental constituída da proteína recombinante purificada (400 µg/dose) adsorvida no adjuvante hidróxido de alumínio (10%), contidos no volume de 2 ml. Os animais do grupo controle (grupo 2) foram inoculados com PBS e hidróxido de alumínio. Os animais foram inoculados por injeção intramuscular (2 ml) nos dias 0 e 14. Amostras de sangue foram coletadas por venopunção da veia jugular externa a cada 10 dias, totalizando 6 coletas (do dia 0 ao dia 50). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 28134-2019) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

2.3 Ensaio imunoenzimático

A avaliação da resposta imune humoral foi verificada através de ensaio imunoenzimático, onde placas de 96 cavidades foram revestidas com 100 ng/cavidade do antígeno recombinante de *L. intracelullaris*. O antígeno foi diluído em tampão carbonato bicabornato (pH 8,0) e incubado por 18 h a 4 °C. Os soros foram diluídos (1:100) em PBS e aplicados em duplicata às placas. Posteriormente, foram adicionados anticorpos anti-IgG equino conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos 1:6000 em PBS. Entre cada etapa as placas foram incubadas por 1h a 37 °C e lavadas 5 vezes com PBS-T. Após, foi adicionado 100 µl de solução de revelação (10 ml de tampão fosfato-citrato 0,004 g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15 µl de H₂O₂), por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µl por cavidade de H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico GraphPad prism 5.03 (GraphPad Software, CA, USA). As diferenças entre as

médias foram analisadas pelo teste de Tukey, considerando-se que houve diferença significativa quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína recombinante foi expressa de forma insolúvel, sendo solubilizada com adição de tampão contendo uréia (8M). Após o processo de purificação, esta foi quantificada, obtendo o rendimento de $0.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Os equinos vacinados apresentaram anticorpos contra o antígeno recombinante após uma única dose vacinal, sendo detectados já no dia 10 do experimento, com nível de anticorpos de aproximadamente 0.25 (absorbância). Após a segunda dose, dia 20 do experimento, um maior nível de anticorpos foi observado, com nível de 0.5 (absorbância), equivalente a 2 vezes o nível obtido após uma única dose ($p < 0.05$) (Figura 1 A). A avaliação dos soros individuais revelou que, de forma geral, os animais responderam de forma homogênea, exceto um dos animais que teve nível significativo de anticopros apenas no dia 20 do experimento (Figura 1B). Níveis significantes de anticorpos foram detectados até o final do experimento (dia 50). Animais do grupo controle, inoculados com PBS, não foi detectado anticorpos específicos (Figura 1A).

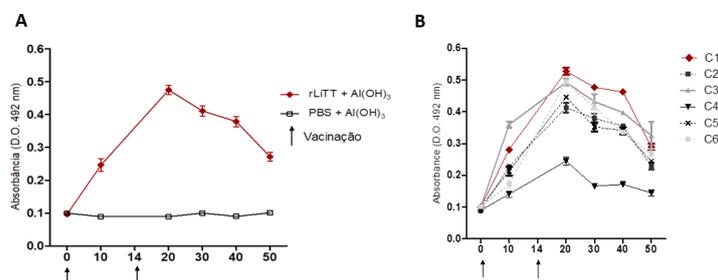


Figura 1. Imunogenicidade da vacina experimental em equinos. Resposta IgG total específica anti-rLi. O gráfico demonstra a densidade óptica média (D.O.492 nm) da avaliação dos soros em dos grupos experimentais nos respectivos dias do experimento. A. Avaliação dos soros em *pool*; B. Avaliação dos soros individuais dos animais vacinados.

Vacinas utilizando antígenos recombinantes, selecionados através de vacinologia reversa e obtidos em sistema de expressão heterólogo, apresentam potencial para superar as limitações das vacinas atualmente disponíveis, e permitem o diagnóstico diferencial entre os animais vacinados dos infectados (RAPPUOLI et al., 2016). Devido ao tamanho da molécula recombinante e seu nível de pureza, foi necessário a adição do adjuvante hidróxido de alumínio, permitindo a liberação do antígeno de forma lenta, proporcionando o aumento da imunogenicidade da molécula (MOREFIELD et al., 2005).

A vacina recombinante contra EP desenvolvida neste estudo apresentou capacidade de gerar resposta imune com apenas uma dose vacinal, tornando-se assim um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas contra EP.

4. CONCLUSÕES

A vacina recombinante contra *L. Intracellularis* foi capaz de induzir resposta imune em equinos, demonstrando potencial vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COOPER, D. M.; GEBHART, C. J. Comparative aspects of proliferative enteritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 9, p. 1446–1451, 1998.
- COSTA, E.; DIEHL, G. N.; SANTOS, DIEGO VIALI. Panorama da Equinocultura no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**. v. 33, n. 196, 2013.
- DEHOVE, A.; COMMAULT, J.; PETITCLERC, M.; TEISSIER, M.; MACÉ, J. Economic analysis and costing of animal health: A literature review of methods and importance. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), v. 31, p. 604–605, 2012.
- GEBHART, C. J.; GUEDES, R. M. C. *Lawsonia Intracellularis*. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, n. 4, p. 503–512, 2010.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1936 p., 4a ed, 2012.
- KRUSE, A. B.; DE KNEGT, L. V.; NIELSEN, L. R.; ALBAN, L. No Clear Effect of Initiating Vaccination against Common Endemic Infections on the Amounts of Prescribed Antimicrobials for Danish Weaner and Finishing Pigs during 2007–2013. **Frontiers in veterinary science**, v. 3, p. 120, 2016.
- MOREFIELD, G. L.; JIANG, D.; ROMERO-MENDEZ, I. Z.; GEAHLEN, R. L.; HOGENESC, H.; HEM, S.L. Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. **Vaccine**, v. 23, p. 1502–1506, 2005.
- PAGE, A. E.; FALLON, L. H.; BRYANT, U. K.; HOROHOV, D. W.; LUNA, T. W.; MARSH, P. S.; SLOVIS, N. M.; SPRAYBERRY, K. A.; LOYNACHAN, A. T. Acute deterioration and death with necrotizing enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* in 4 weanling horses. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 26, p. 1476–1480, 2012.
- RAPPUOLI, R.; BOTTOMLEY, M. J.; D'ORO, U.; FINCO, O.; DE GREGORIO, E. "Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design," **J. Exp. Med.**, vol. 213, nº. 4, pp. 469–481, 2016.
- RIBER, U.; HEEGAARD, P. M.; CORDES, H.; STÅHL, M.; JENSEN, T. K.; JUNGENSEN, G. Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. **Vaccine**, v. 33, p. 156–162, 2015.
- VISSCHER, C.; MISCHOK, J.; SANDER, S.; VERSPOHL, J.; PEITZMEIER, EU.; VON DEM BUSCHE I.; KAMPHUES, J. Spread of an Experimental Salmonella Derby Infection in Antibiotic-Treated or *Lawsonia intracellularis* Vaccinated Piglets. **Animals**, v. 8, n. 11, p. 206, 2018.

GPN NAS REDES SOCIAIS: UM RELATO DESSA TRAJETÓRIA DURANTE A PANDEMIA

GIULIANA PETIZ ZUGNO¹; AIRTON SINOTT²; PALOMA TABORDA BIRMANN³; LUCIELLI SAVEGNAGO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – giulizugno@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – antsinott@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – paloma_birmann@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Durante a pandemia da COVID-19 que assolou a população mundial nos anos de 2020 e 2021, a divulgação científica entrou em cena como uma forte aliada para a desmistificação das chamadas “pós-verdades” (PARMET e PAUL, 2020) e permitiu com que a população tivesse um maior protagonismo no meio científico (CAETANO et al. 2021). Nos últimos dois anos, o incremento de diversas iniciativas para estabelecer o diálogo sobre ciência, principalmente aplicada à saúde, foram colocados em prática através da produção de conteúdo para as redes sociais (WHO, 2021).

Em vista disso, o Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) da Universidade Federal de Pelotas, sensibilizado pelo rigor científico para desmistificar informações equivocadas e transmitir o conhecimento de maneira a estreitar o vínculo entre academia e sociedade, efetivou a criação do seu perfil no Instagram (@gpn_ufpel) em 15 de abril de 2020, para publicação de conteúdos educativos com enfoque na neurociência.

Diante do contexto pandêmico e dos efeitos que o distanciamento impôs aos padrões de vida social (MARROQUÍN et al., 2020), debates voltados à saúde mental (ORNELL et al., 2020) entraram em pauta como importante forma de fornecer subsídios para melhor compreender e prevenir os efeitos deletérios do isolamento. Tais assuntos vão ao encontro das linhas de pesquisa desenvolvidas pelo GPN, como depressão e ansiedade, o que fez desse momento oportuno para gerar visibilidade à importância das pesquisas nesta área, bem como seu impacto positivo na sociedade.

Nesse sentido, ao longo de nossa jornada estabelecemos a criação de diversos quadros com temáticas específicas que incluíram “GPN em foco”, “Neuromitos” e “Notícias da semana” além de conteúdos informativos sobre descobertas em neurociência, curiosidades na área, grandes nomes na neurociência e visibilidade a campanhas de prevenção a doenças, em especial relacionada a COVID-19. Assim, o objetivo do presente trabalho é, portanto, relatar as ações de divulgação do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia durante o período de pandemia.

2. METODOLOGIA

Por meio da plataforma Instagram, o GPN desenvolveu o perfil @gpn_ufpel. As postagens foram organizadas para ocorrer semanalmente durante as segundas, quartas, sextas-feiras e domingo, contando com diferentes quadros, dos quais inclui-se: “GPN em foco”, em que foram explicados artigos publicados pelo nosso grupo de pesquisa de uma forma simplificada; “Neuromitos”, os quais foram realizados no formato de *stories* utilizando-se o recurso “enquete” para lançar perguntas de verdade ou mito que poderiam ser respondidas pelos seguidores, sendo a explicação discutida no *story* subsequente; “Notícias da semana” em que foi feita uma coletânea de 6 novidades científicas das mais diversas áreas de conhecimento publicadas ao longo da semana. Além disso, foram publicadas curiosidades e conteúdos relacionados a descobertas neurocientíficas e suas contribuições para a sociedade. Todos os assuntos abordados possuíam embasamento em artigos e notícias científicas referenciados na legenda das suas respectivas publicações juntamente a um parágrafo introdutório.

Para a confecção do *layout* das postagens no *feed* e *stories* foi utilizada a plataforma online Canva (<https://www.canva.com/>) de design gráfico. Os posts foram submetidos à aprovação prévia da professora coordenadora do projeto. Os resultados obtidos foram calculados pelo algoritmo do Instagram.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A plataforma do Instagram provém diversas métricas as quais podem ser utilizadas para acompanhar o progresso do perfil. Desde sua criação em 15/04/2020, o perfil @gpn_ufpel expandiu seu alcance totalizando, em 24/10/2022, 1.365 seguidores, sendo em sua maioria mulheres (75,1%) (Fig. 1A), e a faixa etária de maior predominância do público está entre 18 e 44 anos (Fig. 1B). O fato do público-alvo ser em sua maioria do sexo feminino, pode estar relacionado ao grande número de profissionais atuantes na área da saúde serem mulheres (CONASEMS, 2020), o que poderia explicar o interesse destas em nossa página devido as publicações de cunho científico relacionadas a assuntos como transtornos neuropsiquiátricos, doenças neurodegenerativas e a pandemia de COVID-19, por exemplo. Ademais, a faixa etária alcançada se justapõem à idade do público acadêmico (MEC, 2019).

Nota-se também que, apesar da localização dos usuários que acompanham nossa página ser majoritariamente brasileira, representando um total de 95,1%, e ser da região sul do Brasil, também conseguimos alcançar outros países como pode ser observado na Fig. 1C. Naturalmente, pelo conteúdo das postagens estar escrito na língua portuguesa, era esperado que a localização das pessoas que acompanham a página concentre-se majoritariamente no Brasil, contudo a porcentagem de seguidores que



conseguimos alcançar em outros países é um indicativo do potencial de crescimento do perfil.

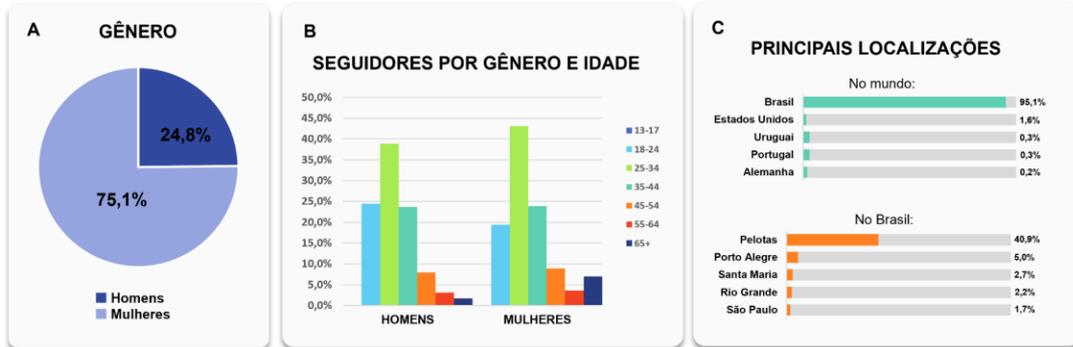


Figura 1. Dados gerais do perfil @gpn_ufpel fornecidos pelo algoritmo do Instagram. (A) Porcentagem de seguidores por gênero, (B) seguidores por faixa etária e (C) principais localizações de acesso ao perfil pelo público obtido no período de 15/04/2020 a 24/10/2022.

Ao longo de dois anos desta trajetória, contabilizamos 366 publicações apenas no *feed*, dentre as quais as de melhor engajamento com base no número de curtidas, podem ser conferidas na Figura 2A, B e C. Além disso, os melhores resultados obtidos com as publicações nos *stories* com o quadro “Neuromitos”, baseando-se no número de contas alcançadas, estão dispostos na Figura 2D.



Figura 2. Posts de cada quadro (A) curiosidades na neurociência, (B) GPN em foco e (C) Notícias da Semana, com maior engajamento publicados no *feed* e (D) Neuromitos nos *stories* do Instagram @gpn_ufpel. Coração: número de curtidas; balão: número de comentários; seta: número de compartilhamentos; bandeira: número de salvamentos.

Dentre os quadros publicados no *feed*, pode-se verificar que a temática das publicações sobre curiosidades na neurociência e “Notícias da Semana” (Fig. 2A e C) com melhor engajamento englobam conteúdos relacionados à pandemia, devido à relevância cotidiana desse tema. Assim, nosso quadro de conteúdos e curiosidades científicas desperta o interesse do público, por tratar assuntos diversificados, englobando especialmente o conhecimento da neurociência inserido no contexto atual de forma acessível e descontraída.

Além disso, o quadro “GPN em foco” (Fig. 2B), embora apresente um conteúdo técnico ao abordar metodologias e resultados de estudos

desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa ou em conjunto com laboratórios parceiros, também apresentou boa aceitação por nossos seguidores.

Notou-se também um bom retorno do público com o quadro “Neuromitos” publicado nos *stories* (Fig. 2D), uma vez que se trata de uma publicação mais dinâmica e interativa que visa desmistificar concepções errôneas e informações equivocadas sobre a neurociência, contando com a participação da audiência a qual poderia responder a enquete de “Verdade ou Mito?”.

Por fim, vale ressaltar a importância da distribuição espaçada e periódica entre os posts de modo a manter um fluxo de publicações e permitir que o perfil continue ativo e relevante ao algoritmo.

4. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados, podemos concluir que o perfil @gpn_ufpel cumpriu com seu propósito de disseminar o conhecimento científico, em especial da neurociência, a partir da publicação sistemática de conteúdos com fundamento científico explicados de uma maneira acessível à população.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAETANO, K. et al. Desafios para o trabalho da disseminação científica em saúde pública em contexto de disseminação do coronavírus. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde**, v. 15, n. 1, 2021.
- CONASEMS. **Protagonismo feminino na saúde: mulheres são a maioria nos serviços e na gestão do SUS - CONASEMS**. CONASEMS. Disponível em: <<https://www.conasems.org.br/o-protagonismo-feminino-na-saude-mulheres-sao-a-maioria-nos-servicos-e-na-gestao-do-sus.>>. Acesso em: 20 Aug. 2021.
- MARROQUÍN, B. et al. Mental health during the COVID-19 pandemic: Effects of stay-at-home policies, social distancing behavior, and social resources. **Psychiatry research**, v. 293, n. 113419, p. 113419, 2020.
- MEC. **Educação**. Disponível em: <<http://portal.mec.gov.br/component/tags/tag/32044-censo-da-educacao-superior>>. Acesso em: 25 oct. 2022.
- ORNELL, F. et al. Pandemia de medo e Covid-19: impacto na saúde mental e possíveis estratégias. **Revista Debates em Psiquiatria**, v. 10, n. 2, p. 12–16, 2020.
- PARMET, W. E.; PAUL, J. COVID-19: The first posttruth pandemic. **American journal of public health**, v. 110, n. 7, p. 945–946, 2020.
- WHO. **Social media & COVID-19: A global study of digital crisis interaction among Gen Z and Millennials**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/social-media-covid-19-a-global-study-of-digital-crisis-interaction-among-gen-z-and-millennials>>. Acesso em: 25 oct. 2022.

FISIOPODCAST

MARIA CHRISTINA WILLE¹;
DAVI BARWALDT DUTRA²; MARIA EDUARDA BICCA DODE³;
LUCIANA BICCA DODE⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – chriswille@yahoo.com;

²Universidade Federal de Pelotas - ddavibarwaldt@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - dudadode@hotmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas - lucianabicca@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o uso de tecnologias da comunicação na vida cotidiana vem crescendo rapidamente, se tornando inevitável. Além disso, em 2020, a chegada da pandemia do Covid-19, trouxe novos hábitos e formas de construir ou complementar o conhecimento. Entre elas, o uso de mídias específicas, de fácil compartilhamento e que permitam a flexibilização do processo de aprendizagem, seja ele formal ou não.

Os Podcasts integram o cardápio de oferta de conhecimento geral, específico ou apenas compartilhamento de notícias e opiniões. Um Podcast é caracterizado como um arquivo de áudio disponibilizado na Internet para download gratuito por qualquer usuário da rede (LENHARO; CRISTÓVÃO, 2016). Eles podem ser reproduzidos em computadores, celulares ou em outros dispositivos portáteis de áudio (JHAM et al, 2007). Eles podem exercer funções variadas, desde o entretenimento, a divulgação de informações e, até mesmo, para fins educacionais.

Eles se tornaram importante ferramenta educacional, não apenas como fontes de informações, mas também incorporando, produzindo e disseminando descobertas e ações que promovam o aprendizado (BARROS; MENTA, 2007). Os autores também afirmam que a utilização de tecnologias de informação e comunicação disponíveis na Internet, traz inúmeras possibilidades para a educação, principalmente utilizando-se da produção crítica e colaborativa de programas realizados pelos próprios alunos.

Os estudantes estão cada vez mais “móveis”, este fato foi agravado pela pandemia do Covid-19. Eles se encontram envolvidos em múltiplas tarefas, trabalhando meio período, residindo longe das suas instituições de ensino, etc. Dessa forma, a ideia de poder acessar à informação sem estar vinculado a um local físico se tornou muito atraente. Os podcasts estão se tornando cada vez mais populares, porque eles oferecem uma alternativa portátil e conveniente para a leitura de um livro, por exemplo (CASARES JR., 2020).

Dentro deste contexto, o FisiPodCast foi criado para disseminar o conhecimento da fisiologia vegetal e estimular a curiosidade científica através de chamadas criativas e dinâmicas durante o FisiPop 2022, que foi parte integrante do XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, ocorrido em Porto Alegre/RS. Organizados em blocos, a Rádio FisiPop2022 apresentou e destacou as atividades em curso no FisiPop 2022, com narrativas curtas e atrativas no ambiente do evento e nas mídias sociais.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste projeto, e no intuito de facilitar a comunicação entre os autores dos trabalhos que foram apresentados durante o evento Fisiopop 2022 e os integrantes do projeto FisiopodCast, foi criado um e-mail exclusivo para a atividade. Através deste e-mail foi enviada uma mensagem apresentando a proposta do FisiopodCast, e também esclarecendo que as dúvidas em relação ao projeto poderiam ser sanadas diretamente através de mensagem via WhatsApp com os integrantes do grupo.

Além disso, foi solicitado aos autores dos trabalhos inscritos no Fisiopop 2022 que fossem feitas gravações curtas, de até 3 minutos, que seriam veiculadas. As gravações foram realizadas em formato mp4, encaminhadas através do e-mail do projeto ou diretamente pelo WhatsApp e foram editadas antes da veiculação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados 8 podcasts, abordam os trabalhos inscritos. Estes foram veiculados nas mídias sociais do XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e também divulgados na plataforma de vídeos do Facebook Watch previamente ao evento. Durante a realização do Fisiopop 2022 os podcasts também foram transmitidos durante as visitas à mostra interativa.

Segundo Casares Jr. (2020), os podcasts vem sendo usado por mais de uma década por educadores, no intuito de aumentar o comprometimento dos alunos em sala de aula, apresentando aos alunos perspectivas diversificadas, amplificando mensagens, o que acaba melhorando o feedback dos alunos, e contribui para uma melhora nas notas. Desde o sua criação, o uso de podcasts no meio educacional vem crescendo muito, diversas universidades no Reino Unido, como Cambridge e a Imperial College London e nos Estados Unidos da América, como Duke e Perdue, fazem uso dessa ferramenta para elevar a experiência dos estudantes e facilitar o aprendizado (JHAM et al, 2007).

Além disso, segundo Braga (2010), a participação nos processos de produção e consumo de bens culturais sempre favorece os grupos de maior poder econômico, dessa forma o uso de podcasts e outras ferramentas virtuais no ambiente educacional pode favorecer o acesso dos grupos socialmente desfavorecidos à informação. No entanto, as desigualdades de acesso às tecnologias digitais ainda são muito grandes, e ficaram mais visíveis durante a pandemia de Covid-19, tanto alunos quanto professores das regiões rurais, por exemplo, seguem tendo acesso limitado ou total falta de acesso à Internet (BENEVIDES et al., 2020).

Em relação ao ensino de Fisiologia Vegetal, as limitações criadas pela pandemia de Covid-19 fizeram com que as instituições se adaptassem rapidamente ao universo virtual, fazendo uso de Ambientes Virtuais de Aprendizagem (AVA), como Google Meet, Formulários Google, Mapas Conceituais, YouTube, Kahoot, entre outros (BENEVIDES et al., 2020) para o ensino remoto.



4. CONCLUSÕES

O FisiPodCast teve grande aceitação pelo público. Além de contribuir para a divulgação da atividade, conseguiu aumentar o interesse e a curiosidade dos participantes do evento FisiPop 2022, estimulando a curiosidade científica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, G. C.; MENTA, E. Podcast: produções de áudio para educação de forma crítica, criativa e cidadã. **Revista de Economía Política de las Tecnologías de la Información y Comunicación**, v.IX, n.1, 2007.

BENEVIDES, J. de A. J.; SOUSA, J. L. F. de; MOURA, L. de Q. R.; COSTA, E. L. M.; LIMA FILHO, L. O. de. Implementação de Metodologia Ativas como Ferramenta Avaliativa na Disciplina de Fisiologia Vegetal em Tempos de Pandemia: Experiências e Desafioa. **HOLOS**, v. 4, p. 1–16, 2021.

BRAGA, D. B. Tecnologia e participação social no processo e consumo de bens culturais: novas possibilidades trazidas pelas práticas letradas digitais mediadas pela internet. **Trabalhos em Linguística Aplicada**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 373-391, 2010.

CASARES JR, D. R. Embracing the Podcast Era: Trends, Opportunities, & Implications for Counselors. **Journal of Creativity in Mental Health**, v.17, n.1, p.123-138, 2020.

JHAM, B. C.; DURAES, G. V.; STRASSLER, H. E.; SENSI, L. G. Joining the Podcast Revolution. **Journal of Dental Education**, v.72, n.3, p.278-281, 2007.

LENHARO, R. I.; CRISTÓVÃO, V. L. L. Poscast, Participação Social e Desenvolvimento. **Educação em Revista**, Belo Horizonte, v.32, n.01, p.307-335, 2016.



PROJETO CINE BIOTEC: UMA PROPOSTA

ALICE CALDERIPE DE LIMA; LUCIANA BICCA DODE².

¹Universidade Federal de Pelotas – calderipe.a@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lucianabicca@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A sociedade utiliza ferramentas biotecnológicas a seu favor em diversas áreas há muitos anos. Ainda que a biotecnologia esteja presente no cotidiano, não é comum associar o profissional biotecnologista ao conhecimento ou produto biotecnológico. Esse fato acontece devido à falta de entendimento da população acerca da produção científica, uma vez que a linguagem empregada muitas vezes não é acessível à realidade das pessoas.

A biotecnologia, por sua vez, é uma área da ciência que engloba técnicas moleculares, DNA recombinante e bioengenharia, entre outras abordagens, para desenvolver produtos ou processos a partir de organismos vivos, sistemas biológicos ou seus derivados (BRASIL, 2000; HELM, 2002).

Pensando nisso, a extensão universitária visa aproximar a população da produção científica e transmitir o conhecimento sem as desigualdades sociais e educacionais que ocasionam barreiras, dificultando a compreensão (DE PAULA, 2013). Os projetos de extensão, portanto, conforme Coelho (2014), seria

(...) uma estratégia de buscar ou justificar maiores investimentos e, ao mesmo tempo, promover uma legitimação do saber acadêmico na direção das demandas sociais, tornando-o mais aplicado e buscando sua validação em situações mais tangíveis (COELHO, 2014, p. 13).

Uma alternativa para relacionar o saber científico com o cotidiano em uma linguagem acessível é utilizar a mídia visual como ferramenta educacional. Os meios visuais, como o cinema, estimulam a curiosidade e geram uma maior interação dos alunos com o conteúdo (PAZZINI, 2013). Ainda, o cinema como mídia visual é um recurso educativo utilizado desde sua invenção até os dias atuais (CAMBRA-BADII, 2020). Embora seja uma abordagem que não tenha um caráter de novidade, a

prática de longa metragem como ferramenta pedagógica é eficiente no processo de aprendizagem por conseguirem relacionar noções teórico-práticas com o conteúdo das disciplinas estudadas (REIGADA, 2020).

Em sua origem, o cinema era utilizado de três principais maneiras: como forma de “informação, persuasão e entretenimento”, já que as primeiras películas eram curtas, de poucas dezenas de minutos (REIGADA, 2014, p. 26). Com o passar do tempo, contudo, estudiosos como Ricciotto Canudo preveram um novo panorama para as mídias visuais, que seria futuramente realizado, visualizando-as como “artes plásticas em movimento”, elevando-as, assim, ao título de “sétima arte”, ao lado das artes desde já tradicionais: a arquitetura, a escultura, a pintura, a música, a poesia e a dança (FIGURELLI, 2013, p. 116).

Ao assistir um filme, o telespectador experiencia sensações moldadas a partir de sua construção cultural coletiva, junto de aspectos individuais, como seus conhecimentos, sua visão de mundo e sua história de vida até o presente momento. Dessa forma, as percepções geradas a partir do contato com uma obra audiovisual podem ser mais expressivas e significativas que o contato com uma intervenção impressa (BURGARIN, 2021).

Assim, a presente proposta de projeto de extensão, denominada Cine Biotec, objetiva utilizar trechos de filmes populares para apresentar a biotecnologia, como parte do cotidiano, de uma forma simplificada e interessante a um público jovem que possivelmente não teria acesso a esse debate por outros meios.

2. METODOLOGIA

Visando divulgar o conhecimento biotecnológico para alunos do ensino Fundamental da rede pública através de mídias visuais, o seguinte projeto utilizará trechos de filmes populares que contenham cenas de cunho científico para apresentá-los à classe e fomentar discussões a respeito do tema.

A primeira etapa do projeto consiste na busca de escolas interessadas através de contato telefônico com os coordenadores pedagógicos. A seguir, será feita uma proposta de ação educativa para os alunos do ensino Fundamental. Havendo a concordância de todas as partes interessadas, será feita uma reunião com a professora responsável pela turma com a qual o projeto será realizado. Nesta

etapa será feita a escolha do filme de acordo com a idade dos alunos e o conteúdo que está sendo abordado em aula.

Caso o conteúdo estudado seja o Reino Animal, por exemplo, o filme abordado poderia ser *Jurassic Park* (1993), de Steven Spielberg, que retrata como cientistas extraem e editam genomas de animais. Outra possibilidade seria o filme *Contágio* (2011), de Steven Soderbergh, caso a matéria abordada seja agentes virais. Nesse filme, há abordagem controversa no manejo de uma situação pandêmica, que pode ser relacionada à pandemia da COVID-19.

A exibição de trechos curtos do filme será seguida por uma apresentação em slides com a explicação biotecnológica do conteúdo tratado. Após isso, será promovida uma discussão com os alunos, incentivando a formulação de perguntas por parte deles, com explicações dadas pelos participantes do projeto de extensão.

Ao final, serão indicados para a turma outros filmes que representam a temática biotecnológica através de diferentes abordagens e contextos.

3. RESULTADOS ESPERADOS

A partir do conteúdo apresentado aos alunos do ensino fundamental, espera-se que os mesmos exponham dúvidas e debates acerca da importância da Biotecnologia e do papel do biotecnologista na sociedade. Tal discussão, moderada pelos responsáveis pelo projeto de extensão, visa aguçar a curiosidade dos jovens à área, destacando a relevância — nem sempre notada — da ciência em suas vidas.

Dessa forma, com o apoio da professora responsável pela turma, é esperada uma participação e discussão relevantes, expondo aos alunos uma nova possibilidade de mercado de trabalho no futuro ou, ao menos, a consciência sobre uma área do saber possivelmente ainda inexplorada em suas vidas.

Além disso, a colaboração com a escola de ensino fundamental pública pode vir a estimular a busca dos professores e de outros alunos participantes de projetos de extensão a adentrar as salas de aula das escolas, fomentando, assim, uma maior interação e oportunidades de aprendizado por parte de jovens provenientes de um meio social que possivelmente não teriam esse contato com a ciência de outra forma.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Biotecnologia é uma área do saber e um ramo de trabalho de permeia a vida de toda a população. Sob esse ponto de vista, é importante apresentá-la à comunidade escolar que, mesmo não reconhecendo, utiliza de seus avanços, como por exemplo as vacinas, diariamente. Também espera-se que, futuramente, esses jovens considerem a possibilidade de aprofundar os estudos na área.

Assim, a presente proposta de projeto de extensão espera promover a ciência e impulsionar a curiosidade de alunos da rede de ensino público através do contato com obras visuais da cultura popular, aproximando, assim, a sociedade ao saber científico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre Diversidade Biológica**. Brasília: MMA. 2000.

BURGANI, L. D. A importância do cinema na arte-educação. **Conedu**, v. 1, 2021.

CAMBRA-BADII, I. *Cinemeducation* in clinical pharmacology: using cinema to help students learn about pharmacovigilance and adverse drug reactions. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, 2020.

COELHO, G. C. O papel pedagógico da extensão universitária. **Em Extensão**, v. 13, n. 2, 2014.

DE PAULA, J. A. A extensão universitária: história, conceito e propostas. **Interfaces - Revista de Extensão**, v. 1, n. 1, 2013.

FIGURELLI, R. C. Cinema, a sétima arte. **Extensio**, v. 10, n. 5, 2013.

HELM, R. H. Food biotechnology: is this good or bad? Implications to allergic diseases. **Annals Of Allergy, Asthma, & Immunology**. v. 90, 2003.

PAZZINI, Darlin Nalú Avila. **O uso do vídeo como ferramenta de apoio ao ensino-aprendizagem**. Artigo Científico de Conclusão do Curso de Especialização em Mídias na Educação, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

REIGADA, T. **Ensinar com a sétima arte**: o espaço do cinema na didática da história. CITCEM: Porto, 2014.



MEMBRANA DE FIBRAS ULTRAFINAS DE AMIDO DE BATATA-DOCE COM EXTRATO DA CASCA DE CEBOLA ROXA: MORFOLOGIA E MOLHABILIDADE

ELDER PACHECO DA CRUZ¹; ESTEFANI TAVARES JANSEN²;
LAURA MARTINS FONSECA³; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE⁴;
ALVARO RENATO GUERRA DIAS⁵

^{1,2,3,4,5} Universidade Federal de Pelotas – elderpachecodacruz@gmail.com;
estefani_tj@hotmail.com; laura_mfonseca@hotmail.com; elessandrad@yahoo.com.br;
alvaro.guerradias@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cebola (*Allium cepa*, L.) apresenta uma alta produção e consumo mundial e, conseqüentemente, uma quantidade considerável de subprodutos (resíduos) provenientes da cebola são depositados no planeta. Esses subprodutos, especialmente a casca, possuem 3 a 5 vezes maior quantidade de compostos fenólicos que o bulbo da cebola (LEE et al., 2014), podendo ser utilizada como fonte alternativa de compostos bioativos com propriedades antioxidante, antimicrobiana, antiobesidade, antidiabetes e anti-hipertensivos, além de apresentar efeitos na sensibilização de células cancerígenas (KUMAR et al., 2022).

Uma alternativa de extração e concentração de compostos bioativos é a produção de extratos vegetais. No entanto, os compostos bioativos encontrados nesses extratos vegetais apresentam baixa estabilidade a fatores ambientais, como calor, umidade e oxigênio, dentre outros (CRUZ et al., 2021). Assim, devem ser protegidos do ambiente externo para apresentarem alta estabilidade e eficácia. Uma possibilidade de proteção desses compostos é por meio de sua encapsulação por *electrospinning*, uma técnica que utiliza temperatura ambiente durante o processo, permitindo o encapsulamento de compostos termossensíveis em fibras (CRUZ et al., 2021), preservando sua estrutura e aumentando sua estabilidade durante o processamento e armazenamento dos alimentos nos quais as fibras são aplicadas.

Nessa técnica, o uso do amido como material de parede tem despertado interesse e vem sendo estudado por ser um polímero biodegradável (FONSECA et al., 2020). No entanto, não foram encontrados estudos que utilizassem amido de batata-doce para encapsulação, tornando necessária esta aplicação. Frente ao exposto, o objetivo do estudo foi encapsular o extrato da casca de cebola roxa em fibras ultrafinas de amido de batata-doce branca pela técnica de *electrospinning* formando uma membrana.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção de extrato da casca de cebola roxa

A preparação do extrato se deu de acordo com Lee et al. (2014), com algumas modificações. As cascas foram secas em estufa com circulação de ar forçado por 8 h à 60 °C. Após, as cascas secas foram trituradas (Cuori, CUO-3110, Itália) por 3 min. Posteriormente, foram misturadas com etanol 70% (em H₂O Milli-Q, v/v) na proporção de 1:45 (p/v), aquecidas em banho-maria à 60 °C por 3 h, com agitação manual a cada 30 min. Em seguida, a solução extratora foi inserida em um rota-evaporador (Laborota 4000eco, Heidolph, Alemanha), acoplado em banho ultra-termostático (Q214M2, Quimis, Brasil) a 60 °C e 90 rpm de agitação, até a evaporação completa do etanol. O extrato foi armazenado em ultrafreezer a -63 °C e posteriormente liofilizado (Liofilizador, Liotop K108, Brasil). O extrato liofilizado foi contido em frasco hermeticamente fechado e armazenado a -17 ± 3 °C.

2.2 Preparo das soluções poliméricas e processo de *electrospinning*

As soluções poliméricas foram preparadas utilizando 0,6 g de amido de batata-doce branca (20% p/v) em 3 mL de ácido fórmico 75% (em H₂O Milli-Q, v/v). As soluções foram agitadas em agitador magnético (VELP Scientific, F203A0177, Itália) por 20 h (FONSECA et al., 2020). Após, o extrato foi adicionado na concentração de 3% (p/p) e novamente foi agitado por 20 min, para ocorrer a homogeneização do extrato na solução polimérica para produção das fibras. Fibras ultrafinas sem extrato foram utilizadas como controle.

Posterior ao preparo das soluções poliméricas, ocorreu a encapsulação do extrato, através de uma estação horizontal de *electrospinning*. Para isso, as soluções foram adicionadas individualmente 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 0,75 mL.h⁻¹ por uma bomba de infusão de seringa (KD Scientific, Modelo 100, Holliston, Inglaterra). Foi aplicada uma tensão de 18 kV através de uma fonte de alimentação (Faíscas, Modelo FA+30kV, Brasil) e uma distância de 20 cm da ponta da agulha a placa coletora revestida com folha de alumínio (FONSECA et al., 2020). A umidade relativa foi controlada em 43 ± 5%, utilizando desumidificador (ARSEC, Modelo 160, Brasil), e em temperaturas de 16 ± 2 °C.

2.3 Avaliação da morfologia, distribuição de tamanho e molhabilidade

A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Jeol, JSM - 6610LV, EUA). Uma pequena quantidade do material foi fixada em *stubs* com fita dupla face e recobertas com ouro utilizando um metalizador (Sputtering, Denton Vacuum Desk V, EUA) e analisadas com uma aceleração de tensão de 10 kV. O diâmetro médio e a distribuição de tamanho foram obtidas pelas imagens de MEV com base na medição de 65 (sessenta e cinco) fibras selecionadas aleatoriamente, utilizando o *software ImageJ* versão 2015 (FONSECA et al., 2020).

A molhabilidade das fibras foi avaliada pelo ângulo de contato da membrana formada por fibras eletrofiadas durante 40 min, sendo coletadas em lâminas de vidro afim de formar uma membrana. Essas foram avaliadas pela

medição do ângulo de contato, utilizando um goniômetro (Labometric, LB-DX, EUA) em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) (AHMAD et al., 2015). Uma gota d'água destilada de 7 μ L foi colocada sobre a amostra. O tempo para absorção d'água foi registrado em câmera digital e uma fotografia foi registrada após 45 s em que a gota permaneceu em contato com a membrana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação morfológica verificou-se que todas as fibras se mostraram aleatórias e sem a presença de *beads*.que e que a incorporação do extrato melhorou as características morfológicas das fibras (Figura 1b), pois as sem extrato apresentaram morfologia em forma de fita e fundidas (Figura 1a). Essas características podem ser atribuídas ao baixo alongamento da solução durante o processo de eletrospinação. Todavia, as fibras com 3% de extrato (Figura 1b) apresentaram morfologias cilíndricas, homogêneas, aleatórias e sem a presença de *beads*. Características essas ideais para aplicação no setor alimentício.

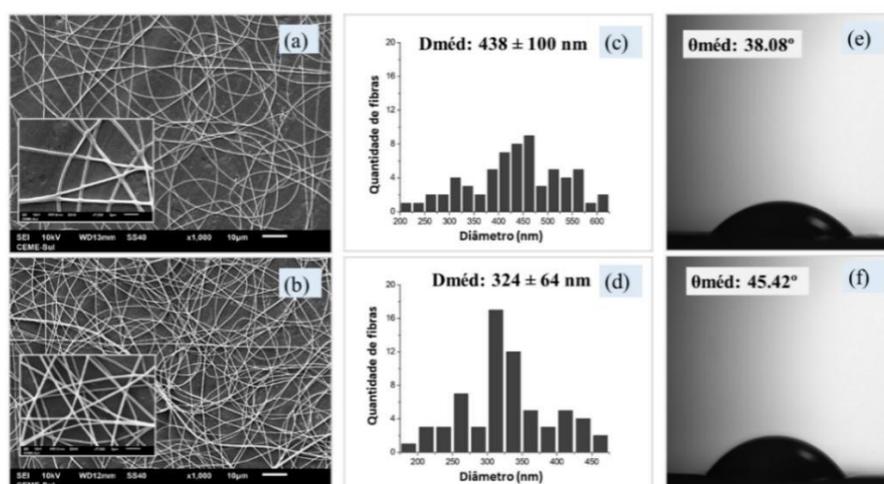


Figura 1. Morfologia (a, b), distribuição de tamanho (c, d) e ângulo de contato (e, f) das fibras de amido de batata doce com 0 e 3 % (p/p) de extrato da casca de cebola roxa encapsulado, respectivamente.

Quanto a distribuição de tamanho das fibras, estas apresentaram diâmetro médio de 324 e 438 nm, para as fibras encapsuladas com 0 e 3% de extrato, respectivamente (Figura 1c e 1d). Foi possível verificar que a incorporação do extrato propiciou uma diminuição na distribuição de tamanho das fibras. Esse comportamento pode ser atribuído a forma de fita encontrada nas micrografias das fibras com 0% de extrato (Figura 1a), as quais apresentaram maior diâmetro. Ainda, pode ter sido influenciado pela viscosidade aparente, que se mostrou maior na concentração de 0% de extrato (dados não mostrados). O diâmetro de fibras é influenciado por diferentes condições e parâmetros de eletrospinação (por exemplo, tensão aplicada, distância do coletor e fluxo), pelas condições ambientais (por exemplo, umidade e temperatura) e

pelos parâmetros das soluções poliméricas (por exemplo, viscosidade e condutividade elétrica) (FONSECA et al., 2020).

Na análise de ângulo de contato, as gotas d'água depositas sobre as fibras sem (Figura 1e) e com (Figura 1f) extrato encapsulado apresentaram aumento do seu ângulo de contato à medida que houve a encapsulação de extrato nas fibras. No entanto, ambas as fibras apresentaram ângulos de contato menores que 90°, indicando superfícies hidrofílicas conforme a classificação relatada por Ahmad et al. (2015). O amido é um polímero altamente hidrofílico e por consequência, as membranas resultantes da sua eletrificação, também o são, e muitas vezes não é possível de mensurar o ângulo de contato da gota d'água, pela rapidez com que a mesma é absorvida.

4. CONCLUSÕES

Foi possível encapsular extrato da casca de cebola roxa em fibras de amido de batata-doce pela técnica de *electrospinning*. A encapsulação do extrato promoveu uma melhora na morfologia das fibras que apresentaram características cilíndricas, homogêneas, aleatórias e sem a presença de *beads*. A incorporação de extrato de casca de cebola roxa promoveu uma redução na distribuição de tamanho das fibras e um aumento no ângulo de contato d'água na membrana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N. A.; LEO, C. P.; AHMAD, A. L.; RAMLI, W. K.W. Membranes with great hydrophobicity: A review on preparation and characterization. **Separation and Purification Reviews**, v. 44, n. 2, p. 109–134, 2015.
- CRUZ, E. P.; FONSECA, L. M.; RADÚNZ, M.; SILVA, F. T.; GANDRA, E. A.; ZAVAREZE, E. R.; BORGES, C. D. Pinhão coat extract encapsulated in starch ultrafine fibers: Thermal, antioxidant, and antimicrobial properties and *in vitro* biological digestion. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 7, p. 2886–2897, 2021.
- FONSECA, L. M.; OLIVEIRA, J. P.; CRIZEL, R. L.; SILVA, F. T.; ZAVAREZE, E. R.; BORGES, C. D. Electrospun Starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**, v. 15, n. 3, p. 355–367, 2020.
- KUMAR, M.; BARBHAI, M. D.; HASAN, M.; PUNIA, S.; DHUMAL, S.; RADHA; RAIS, N.; CHANDRAN, D.; PANDISELVAM, R.; KOTHAKOTA, A.; TOMAR, M.; SATANKAR, V.; SENAPATHY, M.; ANITHA, T. DEY, A.; SAYED, A. A.S. GADALLAH, F. M. AMAROWICZ, R. MEKHEMAR, M. Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112498, 2022.
- LEE, K. A. KIM, K. T.; KIM, H. J.; CHUNG, M. S.; CHANG, P. S.; PARK, H.; PAI, H. D. Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 615–621, 2014.

PERFIL DE TEXTURA DE OLEOGÉIS A BASE DE AMIDO DE MILHO E ARROZ INCORPORADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA

GRACIELE SARAIVA LEMOS¹; ELDER PACHECO DA CRUZ²; CAMILA DE OLIVEIRA PACHECO³; LAURA MARTINS FONSECA⁴; ALVARO RENATO GUERRA DIAS⁵; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – graciele.lemosqa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – elderpachecodacruz@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – camipachecco@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – laura_mfonseca@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – alvaro.guerradias@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – elessandrad@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A busca da população por uma alimentação mais saudável tem aumentado a cada dia. A redução ou eliminação de gorduras saturadas e *trans* dos alimentos é uma demanda crescente, uma vez que essas gorduras contribuem para um maior risco de desenvolver doenças crônicas (FOGUEL, 2021).

Dentre as várias estratégias destinadas a reduzir/substituir gorduras *trans* e gorduras saturadas em alimentos, os oleogéis são relatados como um sistema inovador de óleo estruturado usado para aplicações industriais, devido aos seus benefícios nutricionais e ambientais. Eles possuem aplicações em diversas áreas da indústria alimentícia, como de panificação, confeitaria, laticínios, produtos cárneos, dentre outras (MANZLOOR et al., 2022). O processo de formação de oleogéis requer o uso de agentes gelificantes em baixa concentração, que têm a capacidade de fornecer estrutura aos óleos, conferir um material sólido com a funcionalidade de texturização, propriedades de ligação, estabilização do óleo, de gorduras sólidas, dentre outros (BASCUAS et al., 2020).

O amido é um polímero de baixo custo, biodegradável e biocompatível, que possui capacidade de atuar como agente gelificante na estrutura de oleogéis. Os oleogéis podem atuar no carregamento de compostos bioativos lipofílicos e naturais, como por exemplo de óleos essenciais. Os óleos essenciais são oriundos do metabolismo especializado das plantas e podem apresentar distintas atividades biológicas (EVANGELHO et al., 2019). O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) apresenta atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (FRASSINETTI et al., 2011) e atividade antioxidante (TORREZ-ALVAREZ et al., 2017), ressaltando ser uma alternativa para o desenvolvimento de produtos seguros.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver oleogéis a base de amidos de milho e de arroz incorporados com óleo essencial de laranja, bem como avaliar seu perfil de textura.

2. METODOLOGIA

3.1 Material

O amido de milho Amisol® 3408 (teor de amilose de 33,4%) foi adquirido na Ingredion e o amido de arroz Motti (teor de amilose de 8,0%) foi extraído conforme Biduski et al. (2018). Cera de abelha e óleo de girassol 100% refinado (Tipo 1, Liza Especiais) foram adquiridos em comércios locais da cidade de Pelotas, RS, Brasil. As laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) da cultivar Valencia utilizadas para extração de óleo essencial de laranja foram fornecidas pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas, RS, Brasil. Os compostos majoritários do óleo essencial foram: limoneno (95,95%), β -mirceno (1,76%) e β -linalol (0,98%) de acordo com Kringel et al. (2017).

3.2 Elaboração dos oleogéis

Os oleogéis foram preparados pela emulsão do amido de milho e de arroz, óleo de girassol e cera de abelha, conforme definido em testes preliminares. Primeiramente, adicionou-se individualmente, o amido de milho ou de arroz e óleo de girassol, os quais foram misturados sob agitação a 680 rpm em agitador mecânico digital (IKA, RW20, Alemanha) e aquecimento em banho termostático (FISATOM, 550, Brasil) até atingir a temperatura de 85 °C. A cera de abelha foi adicionada e a agitação aumentada para 1260 rpm. A água destilada foi adicionada na solução, que se manteve sob agitação a 85-90 °C por 30 min, para a completa gelatinização do amido e formação dos oleogéis. Após o resfriamento, o óleo essencial de laranja foi adicionado à solução na concentração de 5% (p/p, em relação ao amido). Os oleogéis foram adicionados em placas de Petri (32,8 mm) e armazenados a 5 ± 1 °C por 24 h.

3.3 Perfil de textura dos oleogéis

O perfil de textura dos oleogéis foi avaliado utilizando um analisador de textura (TA.XTplus, StableMicro Systems, RU). Os parâmetros analisados foram: dureza (g), elasticidade e coesividade. O teste consistiu em dois ciclos de penetração da amostra com tempo de espera de 10 s entre os ciclos. Uma sonda cilíndrica redonda (20 mm de diâmetro e 56 mm de comprimento) foi utilizada para penetrar as amostras a 15 mm/s a uma profundidade de 10 mm (GIACOMOZZI; CARRÍN; PALLA, 2021).

3.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) para comparar os diferentes oleogéis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades de textura são importantes para definir a aplicação de um material. A análise do perfil de textura dos oleogéis de amidos de milho e de arroz está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de textura dos oleogéis a base de amidos de milho e de arroz, incorporados com óleo essencial de laranja.

Fonte de amido	Dureza (g)	Elasticidade	Coesividade
Milho	615,72 ± 12,50*	0,12 ± 0,04*	0,07 ± 0,02*
Arroz	76,95 ± 18,33*	0,85 ± 0,02*	0,58 ± 0,04*

*Os valores com asterisco possuem diferença significativa entre as amostras usando o teste t ($p < 0,05$).

A dureza é a medida da resistência do material a uma deformação. Em relação a esse parâmetro, o oleogel de amido de arroz apresentou menor dureza ($p < 0,05$), quando comparado ao oleogel de amido de milho. Parâmetros como estabilidade dos oleogéis, proporções de amido/óleo e concentração de cera de abelha na formulação dos oleogéis podem influenciar fortemente as propriedades mecânicas. Além disso, o teor de amilose do amido também pode influenciar as propriedades de textura dos oleogéis (SILVA et al., 2020). Amidos com menor teor de amilose tendem a apresentar géis com menor dureza.

O parâmetro de elasticidade é a taxa na qual um material deformado retorna à sua condição não deformada após a força de deformação não ser mais aplicada e, portanto, é uma medida de recuperação elástica. O oleogel de amido de milho apresentou elasticidade reduzida comparado ao oleogel de amido de arroz ($p < 0,05$). Isso se deu, devido a estrutura sólida formada nos oleogéis, visto que, o oleogel de amido de arroz se mostrou visivelmente menos sólido, quando comparado ao oleogel de amido de milho, como evidenciado no parâmetro de dureza. As interações intermoleculares, que mantém os elementos de um material juntos, determina sua coesividade, ou seja, está relacionada à resistência das ligações internas que formam o produto (SILVA et al., 2020). Assim, fortes interações entre as macromoléculas do amido (amilose e amilopectina), óleo de girassol, cera de abelha e óleo essencial de laranja garantem uma estrutura mais integrada nos oleogéis a base de amido de arroz comparadas ao amido de milho. Os oleogéis produzidos possuem potencial para serem aplicados como substituto de gordura hidrogenada em alimentos e como carreadores de compostos bioativos lipofílicos, como exemplo, óleo essencial.

4. CONCLUSÕES

Foi possível produzir oleogéis a base de amido de milho e de arroz, com possível capacidade de substituição da gordura hidrogenada em alimentos. Além disso, os oleogéis podem atuar no carregamento de compostos lipofílicos bioativos. Os parâmetros de textura avaliados demonstraram que os oleogéis apresentam diferença significativa entre si. O oleogel de amido de arroz se mostrou menos sólido/rígido quando comparado ao oleogel de amido de milho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASCUAS, S.; HERNANDO, I.; MORAGA, G.; QUILES, A. Structure and stability of edible oleogels prepared with different unsaturated oils and hydrocolloids. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 1458-1467, 2020.
- BIDUSKI, B.; SILVA, W. M. F.; COLUSSI, R.; HALAL, S. L. M.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Starch hydrogels: The influence of the amylose content and gelatinization method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 443-449, 2018.
- EVANGELHO, J. A.; DANNENBER, G. S.; BIDUSKI, B.; HALAL, S. L. M. KRINGEL, D. H.; GULARTE, M. A.; FIORENTINI, A. M.; ZAVAREZE, E. R. Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114-981, 2019.
- FOGUEL, A. **Avaliação do desempenho de oleogéis estruturados com ceras vegetais como base lipídica reduzida em ácidos graxos saturados aplicados em cream cheeses**. 2021. 123f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, Universidade de São Paulo.
- FRASSINETTI, S.; CALTAVUTURO, L.; CINI, M.; CROCE, D.; MASERTI, B. Antibacterial and antioxidante activity of assential *Citrus spp.* **Journal of Essential Oil Research**. v.23, p.27-31, 2011.
- GIACOMOZZI, A.S.; CARRÍN, M.E.; PALLA, C.A. Storage stability of oleogels made from monoglycerides and high oleic sunflower oil. **Food Biophysics**. v.16, p.306-316, 2021.
- KRINGEL, D.H.; ANTUNES, M.D.; KLEIN, B.; CRIZEL, R. L.; R. WAGNER, R.; OLIVEIRA, R.P.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Production, characterization and stability of the orange or eucalyptus essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Food Science**, v. 82, p. 2598-2605, 2017.
- MANZOOR, S.; MASOODI, F. A.; NAQASH, F.; RASHID, R. Oleogels: Promising alternatives to solid fats for food applications. **Food Hydrocolloids for Health**, v.2, p. 100058, 2022.
- SILVA, F. T.; OLIVEIRA, J. P.; FONSECA, L. M.; BRUNI, P. G.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Physically cross-linked aerogels based on germinated and non-germinated wheat starch and PEO for application as water absorbers for food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 6-13, 2020.
- TORRES, A.C.; NÚÑEZ, G.A.; RODRÍGUEZ, J.; CASTILLO, S.; LEOS, R.C.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J. G. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. **CyTA - Journal of Food**, v.15, p. 129-135, 2017.

Genes da família *FaWRKY* como potenciais alvos para o melhoramento gênico mediado por CRISPR-Cas9 em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

YAGO PIRES¹; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO ²; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ³; GEORGE WASHINGTON ALVES CARDOSO⁴; VANESSA GALLI⁵

¹Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – yagopires022@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) – audreycn97@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - christian.kun@gmail.com

⁴Graduação em Biotecnologia (UFPEL) - george.gwac37@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas– vane.galli@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch), pertencente à família Rosaceae, produz um pseudofruto que é amplamente comercializado, devido às suas características sensoriais, principalmente coloração, sabor e aroma (NEZHADAHMADI et al., 2015). Em relação a pequenos frutos, o morangueiro é a espécie mais explorada do Brasil. No entanto, sua produção é limitada por alguns fatores bióticos e abióticos, que causam perdas significativas a cada ano (WEI et al., 2016).

Nesse contexto, técnicas de edição gênica como por exemplo CRISPR/Cas tem se destacado mostrando ser uma metodologia que permite o melhoramento de diferentes plantas, inclusive visando a resistência a estresses ou estratégias de biofortificação (POLETTI, et al. 2021).

Como potencial auxiliador desses estresses temos o acúmulo de antocianinas, que são produzidas durante a maturação dos frutos, e em resposta ao estresse; portanto, entender os mecanismos envolvidos na síntese e acúmulo deste composto são de extrema importância (NASCIMENTO, et al 2018). Para que seja possível o aumento dessa antocianina é preciso definir alvos para o processo de edição gênica.

A etapa de eleger potenciais alvos para a transformação de plantas é essencial para o sucesso da transformação gênica mediada por CRISPR-Cas9. Nesse sentido, estudos anteriores mostraram a família dos fatores de transcrição WRKY está associada a processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, síntese de metabólitos secundários e resposta a fatores bióticos e abióticos; através da auto-regulação e da regulação cruzada deles mesmos e de outros genes (CHEN et al., 2015).

Além disso, as antocianinas são derivados de flavonóides e apresentam um papel importante no mundo vegetal, estando diretamente ligadas a mecanismos reprodutores, como a polinização e a dispersão de sementes (devido a suas cores vivas e intensas), apresentando, também, capacidades

anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo um alvo amplamente utilizado para pesquisas (LOPES *et al.*, 2007). Assim, o presente trabalho tem como objetivo selecionar genes *FaWRKYs* como potenciais alvos para o melhoramento gênico mediado por CRISPR-Cas9 em morango (*Fragaria xananassa* Duch.) visando o acúmulo de antocianinas para melhor enfrentamento de estresses de origem biótica e abiótica.

2. METODOLOGIA

Com base na análise de expressão *in silico* de bancos mRNA-Seq de morango anteriormente descrita pelo grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2018), foram construídas redes de interação específicas usando mineração de texto, bancos de dados, coexpressão, vizinhança, fusão gênica, coocorrência e evidências experimentais, dos genes *FaWRKY25* (*FvWRKY28*), *FaWRKY33* (*FvWRKY21*) e *FaWRKY59* (*FvWRKY6*) usando a ferramenta STRING 10 online (<https://string-db.org/>), a fim de confirmar a função desses genes e sua possível relação com o acúmulo de antocianinas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados de interatômas observamos que as *FvWRKY28* e *FvWRKY6* interagem com fatores de transcrição MYB, sendo interação de co-expressão referentes a *FvWRKY28* e co-mencionados em resumos no pubmed em ambos os genes. Essas interações que assim como as WRKY são essenciais para regular as vias envolvidos nos metabolismos primário e secundário, crescimento e desenvolvimento e estresse biótico e abiótico respostas (DUBOS *et al.*, 2010;; CHEN *et al.*, 2019). Uma dessas respostas desencadeada pelos genes MYB é referente a biossíntese de antocianinas (YAN *et al.*, 2021).

Além disso, a *FvWRKY28* está relacionada com a atuação de fitocromos, interagindo por co-expressão e co-mencionados em resumos no pubmed, enquanto *FvWRKY6* interage, também, com telomerasas (sendo mencionados em publicações no pubmed) o que confirma a participação dessa família de proteínas com os processos de germinação de sementes, crescimento e florescimento (HAN *et al.*, 2022).

FvWRKY21, por sua vez, apresenta como destaque a sua interação através de co-mencionados em resumos no pubmed, com a proteína VIP1 está envolvido na sinalização da resposta imune inata. Estudos anteriores testaram a suscetibilidade de mutante *vip1* e plantas *VIP1-SRDX* para *Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinerea*. Plantas mutantes *vip1* e *VIP1-SRDX* mostram maior suscetibilidade a *B. cinerea*, mas não a *P. syringae* infecção, sugerindo um papel para VIP1 em *B. cinerea* na sinalização para defesa da planta (LAPHAN *et al.*, 2018). Vale ressaltar, que a suscetibilidade da *B. cinerea* é dependente do ácido abscísico (ABA), que também é importante para as respostas ao estresse abiótico, nesse sentido, Laphan *et al.* (2018)

identificaram que plantas *mutantes vip1* e *VIP1-SRDX* mostram maior tolerância ao crescimento em sal, indicando um papel para *VIP1* em resposta ao estresse salino.

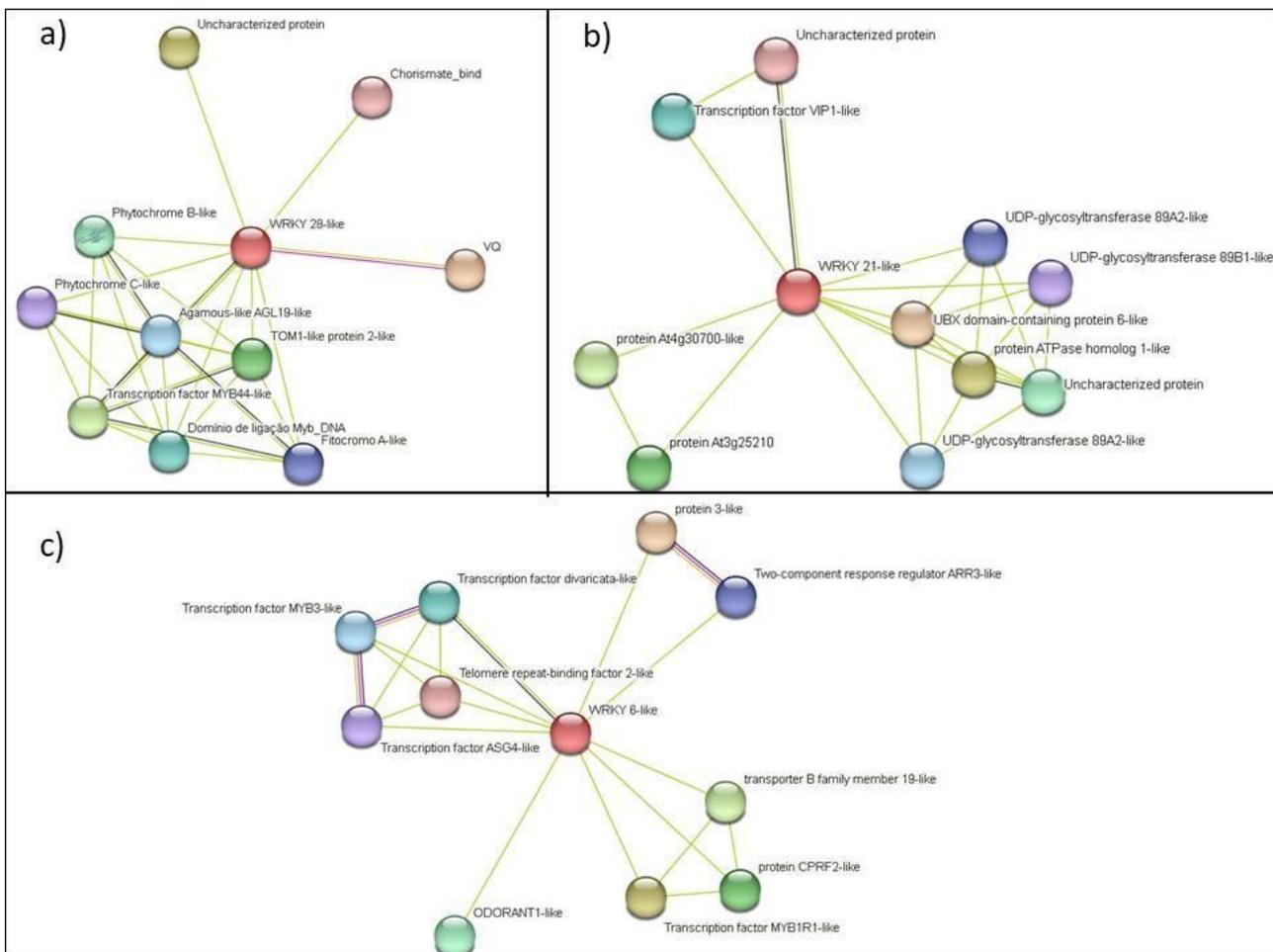


Figura 1. Redes de interação de genes da família WRKY em *Fragaria vesca*. **A.** genes *FaWRKY25* (*FvWRKY28*). **B.** *FaWRKY33* (*FvWRKY21*). **C.** *FaWRKY59* (*FvWRKY6*).

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho é parte dos resultados de um Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os resultados obtidos mostram que a *FvWRKY28* em comparação com as demais analisadas foi a única que apresentou uma indicação de estar relacionada diretamente com a biossíntese de antocianinas, portanto será utilizada como alvos em ensaios de edição gênica visando ter um morango com maior conteúdo de antocianinas



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arash Nezhadahmadi, Golam Faruq & Kamaludin Rashid (2015) Influence of Drought Stress on Leaf Traits of Different Strawberry (*Fragaria ananassa* L.) **Varieties in Natural Environment, Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 46:10, 1249-1262

Cheng Chen, Kaixuan Zhang, Muhammad Khurshid, Jinbo Li, Ming He, Milen I. Georgiev, Xinquan Zhang & Meiliang Zhou (2019): MYB Transcription Repressors Regulate Plant Secondary Metabolism, **Critical Reviews in Plant Sciences**.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends Plant Sci.** 2010 Oct;15(10):573-81.

Lapham R, Lee LY, Tsugama D, Lee S, Mengiste T, Gelvin SB. (2018) *VIP1* and Its Homologs Are Not Required for *Agrobacterium*-Mediated Transformation, but Play a Role in *Botrytis* and Salt Stress Responses. **Front Plant Sci**.

NASCIMENTO, A.C. Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) . Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2018.

POLETTI, I. EDIÇÃO GENÔMICA MEDIADA POR CRISPR/Cas NA ERA DO MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL DE PRECISÃO. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) –Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas,2020.

Wei, F., Hu, X. & Xu, X. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. **Sci Rep** 6, 22611 (2016).

Yan, H.; Pei, X.; Zhang, H.; Li, X.; Zhang, X.; Zhao, M.; Chiang, V.L.; Sederoff, R.R.; Zhao, X. (2021).MYB-Mediated Regulation of Anthocyanin Biosynthesis. **Int. J. Mol. Sci**.

Classificação de dados de metagenoma para detecção de vírus de interesse em saúde humana: monitoramento ambiental de SARS-Cov-2 como um caso de estudo

JEAN RODRIGUES OLIVEIRA DE SOUSA¹; FREDERICO SCHMITT KREMER ³

¹ Universidade Federal de Pelotas – eujean.ros@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – fred.s.kremer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O advento do sequenciamento de DNA de nova geração (*next generation sequencing*, NGS) permitiu um aumento expressivo na velocidade para obtenção de grandes volumes de dados genômicos, bem como de outras áreas das ciências ômicas, como transcriptômica e metagenômica (Liu et al., 2012). A metagenômica, também chamada “genômica ambiental”, consiste na análise em larga de escala de dados derivados de sequenciamento de DNA de amostras complexas (metagenoma), que muitas vezes apresentam uma grande variedade de microorganismo. A análise do metagenoma pode ser realizada a partir da amplificação de marcadores taxonômicos seguida do sequenciamento ou a partir de técnicas de sequenciamento *shotgun* (*whole metagenome shotgun*), que permite também a caracterização funcional de genes (Bragg & Tyson, 2014).

Após a obtenção dos dados em um estudo de metagenoma é necessário se atribuir cada sequência identificada à uma determinada unidade taxonômica operacional (*operational taxonomic unit*, OTU), que pode ser um gênero, espécie ou mesmo sub-espécie que compartilha um determinado grau de similaridade de sequência (Mande et al., 2012). Este processo é denominado *binning*, e muitas das abordagens utilizam métodos de alinhamento ou mapeamento de leituras como base (*alignment-based*), como BLAST (Altschul et al., 1990). De modo a reduzir o custo computacional, estratégias que não utilizam alinhamento de sequência (*alignment-free*). Estas estratégias podem ser utilizadas tanto para a classificação de amostras inteiras (ex: classificar o estado fisiológico de um indivíduo com base na composição da sua microbiota), como o realizado pela ferramenta DectlCO (Ding et al., 2015), como classificar as leituras que pertencem a grupos taxonômicos de interesse, como a ferramenta Seeker (Auslander et al., 2020) e classificação de função de proteínas codificadas em metagenomas, como o Carnelian (Nazeen et al., 2020).

No contexto da pandemia de COVID19, Fongaro *et al* reportaram a presença de SARS-Cov2, agente etiológico da doença, em águas de esgoto coletadas no estado de Santa Catarina em Novembro de 2019, antes dos primeiros casos da doença serem oficialmente reportados na China, país onde a pandemia se iniciou (Fongaro et al., 2020). O monitoramento de água de esgoto para coronavírus, bem como outras doenças, vem sendo discutido em outros

países, como os Estados Unidos, onde o *Center for Disease Control* (CDC) tem iniciado iniciativas como o *National Wastewater Surveillance System* (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/wastewater-surveillance.html>). A utilização de técnicas de metagenômica para a análise em larga escala de microorganismos presentes em amostras de esgoto para fins de vigilância epidemiológica vem sendo discutida, sobretudo tendo em vista as possibilidades na detecção de vírus (Nieuwenhuijse et al., 2020) e genes de resistência à antibióticos (Hendriksen et al., 2019), possibilitando assim maior agilidade na detecção de surtos.

Neste contexto, no presente trabalho foi avaliada uma abordagem *alignment-free* baseada em vetorização de texto e aprendizado de máquina para classificação de dados derivados de análise metagenômica de modo a se identificar patógenos em amostras ambientais como as de monitoramento epidemiológico de esgoto, sendo usado como modelo de estudo o SARS-Cov-2.

2. METODOLOGIA

Dados de sequenciamento de viroma de esgoto foram obtidos do banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI a partir do código de acesso, sendo o download realizado com a ferramenta *fastq-dump* do pacote SRA-Toolkit (<https://github.com/ncbi/sra-tools>). O genoma completo de SARS-Cov-2 foi obtido do Genbank a partir, sendo usado como base para a produção de leituras sintéticas similares à plataforma Illumina HiSeq com uso da ferramenta *InSilicoSeq* (<https://github.com/HadrienG/InSilicoSeq>). Ambos os conjuntos de dados foram utilizados como base para a produção de *subsets* de leituras positivas (simuladas) e negativas (de viroma de esgoto) tanto para treino quanto para validação do modelo preditivo. Além disso, um *subset* de leituras foi extraído dos dados de viroma ambiental para o treinamento de um modelo de vetorização de texto. Para o treinamento e validação dos modelos, em ambos os casos, foram utilizadas 10.000 leituras de cada classe. A vetorização de texto foi realizada com o algoritmo *FastText* (<https://fasttext.cc/>) que foi treinado a partir de uma representação das leituras de sequenciamento na forma de sequências de *k-mers* sobreponíveis ($k=11$, $vector_size=100$). Após o treinamento do modelo de vetorização, as leituras de treino e teste do modelo foram convertidas em sequências de *k-mers* e então vetorizadas. Então, um modelo de aprendizado de máquina baseado em *gradient-boosting* de árvores de decisão foi treinado usando a biblioteca *XGBoost* (<https://xgboost.readthedocs.io/en/stable/>). O modelo foi então avaliado utilizando as métricas *acurácia* e *recall* a partir do relatório de classificação gerado pela função *classification_report* do pacote *Scikit-Learn*.

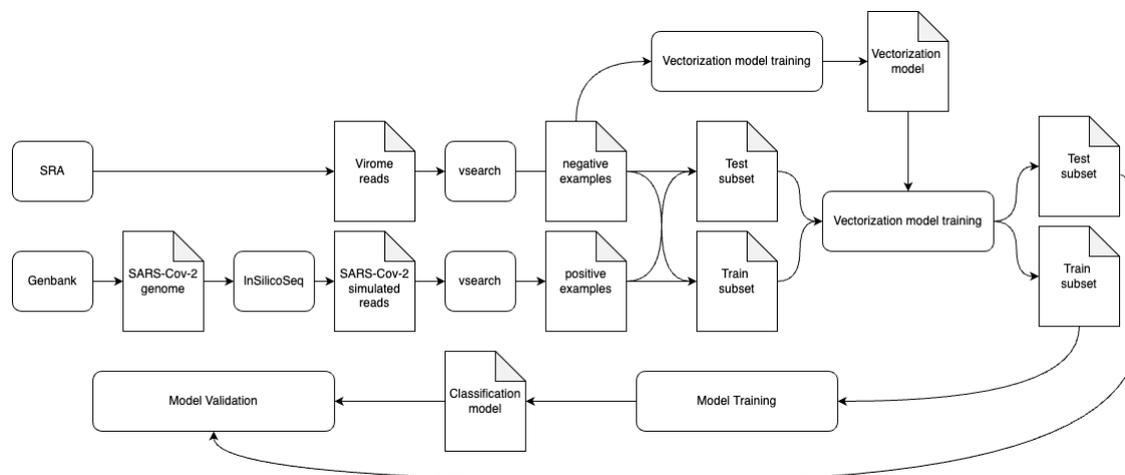


Figura 1. Resumo da metodologia adotada no presente trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das representações geradas para as leituras de sequenciamento e do modelo de aprendizado de máquina produzido, foi possível se obter uma acurácia de 98% e um *recall* de 97% para a classe positiva na classificação, indicando com métodos de aprendizado de máquina podem ser uma alternativa na detecção de organismos patogênicos, como o vírus SARS-Cov-2, em amostras ambientais. Estes resultados vão de encontro com resultados de outros grupos, como Adjuik *et al* (2022), que demonstram que vetores de palavras podem ser usados para a classificação de proteínas deste vírus, mas estendem o escopo de aplicação para o uso de dados brutos de sequenciamento, sem necessidade de montagem ou anotação do genoma, tornando assim a detecção destes organismos mais ágil.

4. CONCLUSÕES

Com base na metodologia utilizada, foi possível demonstrar que técnicas de vectorização de texto e aprendizado de máquina podem ser utilizadas para a produção de modelos preditivos capazes de auxiliar na detecção de organismos patogênicos de interesse. O código contendo as análises descritas neste trabalho está disponível no notebook do Google Colab e pode ser acessado através do link <https://colab.research.google.com/drive/1VRpQ62AdtnBSWApAWPiC1npgB-x16xvG?usp=sharing>.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjuik, T. A & Ananey-Obiri, D. (2022). Word2vec neural model-based technique to generate protein vectors for combating COVID-19: a machine learning approach. *International Journal of Information Technology*.



Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.

Auslander, N., Gussow, A. B., Benler, S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2020). Seeker: alignment-free identification of bacteriophage genomes by deep learning. *Nucleic Acids Research*, 1.

Bragg, L., & Tyson, G. W. (2014). Metagenomics using next-generation sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1096, 183–201.

Ding, X., Cheng, F., Cao, C., & Sun, X. (2015). DectICO: An alignment-free supervised metagenomic classification method based on feature extraction and dynamic selection. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 323.

Fongaro, G., Stoco, P. H., Souza, D. S. M., Grisard, E. C., Magri, M. E., Rogovski, P., Schorner, M. A., Barazzetti, F. H., Christoff, A. P., Oliveira, L. F. V. de, Bazzo, M. L., Wagner, G., Hernandez, M., & Rodriguez-Lazaro, D. (2020). SARS-CoV-2 in human sewage in Santa Catalina, Brazil, November 2019. *MedRxiv*, 2020.06.26.20140731.

Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M. G. M., Zuidema, T., de Roda Husman, A. M., Rasmussen, S., Petersen, B., ... Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1–12.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 251364.

Nazeen, S., Yu, Y. W., & Berger, B. (2020). Carnelian uncovers hidden functional patterns across diverse study populations from whole metagenome sequencing reads. *Genome Biology*, 21(1), 47.

PROSPECÇÃO DE CIRC RNAS PUTATIVOS EM BANCOS DE RNASEQ DE MORANGO (*Fragaria x ananassa*) SUBMETIDOS A ESTRESSES OSMÓTICOS

GEORGE WASHINGTON ALVES CARDOSO¹; CHRISTIAN DOMINGUES
SANCHEZ²; YAGO PIRES³; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO ⁴;
VANESSA GALLI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – george.gwac37@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – christian.kun@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - yagopires022@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - audreycn97@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), é um pseudofruto pertencente à família das Rosaceae e tem como principais características a sua coloração vermelha, aroma e sabor, juntamente com a presença de compostos antioxidantes. Sendo chamado popularmente de fruto pela população em geral, tem-se que os frutos verdadeiros do morango são os aquênios.

Os estresses causados por seca e pelo sal (aqui chamados de estresses osmóticos) são conhecidos por resultar em redução no rendimento da colheita e, conseqüentemente, por reduzir a produção de alimentos, o que inclui a cultura do morango (GALLI et al., 2016; REJEB; PASTOR; MAUCH-MANI, 2014). No Brasil, solos salinos e sódicos ocorrem no Rio Grande do Sul, na região do Pantanal Matogrossense e, com predomínio na região semiárida do Nordeste, ocupando 160.000 km² (MELO et al., 2009).

Para combater esses estresses, as plantas apresentam inúmeras respostas bioquímicas e moleculares, incluindo assim, respostas a nível pós transcricional. Dentre as moléculas que se destacam nessa etapa de regulação pós transcricional, estão os CircRNAs que são uma classe de RNAs não codantes formados a partir de reações back-splicing. A exemplo disso, temos circRNAs que foram identificados de maneira abrangente em algumas espécies, incluindo *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, algodão e tomate (CHEN et al., 2017; LU, 2020; WANG et al., 2017; XIANG et al., 2018; YIN et al., 2018). Em trigo, foram identificados seis circRNAs diferencialmente expressos em resposta ao processo de desidratação e através de análise de bioinformática foi previsto que estes desempenham um papel como esponjas de miRNA (WANG et al., 2017).

Assim, devido a este efeito esponja, circRNAs específicos podem ser projetados para avaliar a função de miRNAs nas células (ZHANG et al., 2020). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a predição de circRNAs presentes em bancos de mRNaseq de frutos de morango submetidos a estresses osmóticos, utilizando-se de análises de bioinformática.

2. METODOLOGIA

Bibliotecas de RNA-Seq e Genoma do Morango

Neste estudo, foi utilizado um conjunto de bibliotecas de RNA-Seq para predição *in silico* de circRNAs. As amostras de frutos do morango foram submetidas a tratamentos de estresse salino e déficit hídrico, descritos no artigo de GALLI et al., (2018), número de acesso do SRA SRP148865. O genoma utilizado como referência para o mapeamento e alinhamento das leituras de RNA-Seq de morango, foi obtido em: [Genome Database For Rosaceae \(GDR\)](#). Esse genoma corresponde a um genoma quase completo de uma espécie de morango octaplóide, em escala cromossômica, *Fragaria x ananassa* Camarosa.

O conjunto Estresse Salino/Déficit Hídrico de RNA-Seq foi obtido por análises experimentais realizadas pelo próprio grupo de pesquisa. O estresse salino, 50 mL de NaCl 400 mM, foi aplicado uma vez por semana desde o início do florescimento (105 dias após o transplante) até o final da cultura (190 dias após o transplante) em *Fragaria x ananassa* cultivar Camarosa. Para o estresse hídrico, as plantas foram irrigadas com 50% da água aplicada no controle (Tabela 1). O RNA foi extraído dos frutos submetidos a esses estresses, e sequenciado através da plataforma Illumina.

Tabela 1. Condições e grupos experimentais do Conjunto de estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq.

Grupos/Amostras	Tratamento	Tamanho (Gigabytes)
GEK-137 (Controle)	Morango tratado com água, colhido 190 dias após o transplante	11.278
GEK-138 (Estresse Hídrico)	Morango tratado com 50% do volume de água do controle, colhido 190 dias após o transplante	9.941
GEK-139 (Estresse Salino)	Morango tratado com NaCl 400 mM, colhido 190 dias após o transplante	9.477

Foi utilizada a ferramenta `find_circ` (https://github.com/marvin-jens/find_circ) como algoritmo de predição *in silico* de prováveis candidatos de circRNAs. Esse algoritmo é escrito na linguagem de programação Python e usa a metodologia de identificação de Back-splicing junctions, utiliza também o alinhador bowtie2 para o mapeamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o alinhamento com o genoma e mapeamento utilizando a ferramenta bowtie2, foram obtidos através do preditor find_circ os prováveis candidatos de circRNAs a partir de bibliotecas de RNA-Seq de *Fragaria x ananassa*. Esses circRNAs preditos são todos de origem exômica, visto que a amostra provém de bancos de RNA-Seq. A partir destes resultados foi realizada uma filtragem inicial, onde obtivemos somente os categorizados como CIRCULAR. Desta forma, foi possível obter o número de circRNAs para cada banco: sendo GEK-137 (Controle) com 50, GEK-138 (déficit hídrico) com 50 e GEK-139 (estresse salino) com 39. Posteriormente a essa filtragem, foi realizada uma nova utilizando Python e buscando comparações diretas com a relação das sequências nos bancos de anotação disponíveis. Com isso, o número de circRNAs preditos foi reduzido para 9 em GEK-137, 13 em GEK-138, e 12 em GEK-139. Para demonstração dos dados, os 3 primeiros circRNAs de cada banco foram inseridos na tabela 2 para melhor visualização.

Tabela 2. CircRNAs identificados nos três bancos de RNA-Seq de morango (GEK137 - controle, GEK138 - déficit hídrico, e GEK139 - estresse salino).

Circ_Name	Número de Reads	Banco RNA-Seq
frag_test1_circ_000004	5	GEK-137
frag_test1_circ_000006	7	GEK-137
frag_test1_circ_000029	6	GEK-137
frag_test1_circ_000002	3	GEK-138
frag_test1_circ_000005	4	GEK-138
frag_test1_circ_000006	6	GEK-138
frag_test1_circ_000001	3	GEK-139
frag_test1_circ_000003	2	GEK-139
frag_test1_circ_000030	11	GEK-139

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que através da análise *in silico* utilizada neste estudo identificou-se 35 circRNAs em morango. Atualmente, as funções dos circRNAs na maioria das plantas ainda são desconhecidas, principalmente em resposta a estresses. Nossos resultados fornecem algumas referências para estudos futuros e para o melhoramento do morangueiro nesta era de mudanças climáticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, L.-L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 475–490, ago. 2020.

GALLI, V. et al. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum Wiley**, 28 nov. 2018.

GALLI, V. et al. Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT**, v. 73, p. 693–699, nov. 2016.

LU, M. Circular RNA: functions, applications and prospects. **ExRNA**, v. 2, n. 1, p. 1, dez. 2020.

MELO, VANDER DE FREITAS. Química e mineralogia do solo: conceitos básicos e aplicações. . Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2019 Acesso em: 30 out. 2022.

REJEB, I.; PASTOR, V.; MAUCH-MANI, B. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. **Plants**, v. 3, n. 4, p. 458–475, 15 out. 2014.

WANG, Z. et al. Identification of Circular RNAs in Kiwifruit and Their Species-Specific Response to Bacterial Canker Pathogen Invasion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 27 mar. 2017.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

XIANG, L. et al. Identification of circularRNAs and their targets in *Gossypium* under *Verticillium* wilt stress based on RNA-seq. **PeerJ**, v. 6, p. e4500, 16 mar. 2018.

YIN, J. et al. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 136, p. 90–98, fev. 2018.

ZHANG, T. et al. RNAseq profiling of circRNA expression in radiation-treated A549 cells and bioinformatics analysis of radiation-related circRNA-miRNA networks. **Oncology Letters**, v. 20, n. 2, p. 1557–1566, 5 jun. 2020.

EFEITO DE DOSES DE CARVÃO ATIVADO NA MICROPROPAGAÇÃO DE AMORA, CV. TUPY

GABRIELA BEHREND NEITZKE¹; MARIA CRISTINA WILLE²; GUILHERME DA SILVA SILVEIRA³; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE⁴; DAIANE DE PINHO BENEMANN⁵

¹Estagiária da empresa BioPlant Tech, Pelotas, RS - gabrielabneitzke@gmail.com

²Estagiária da empresa BioPlant Tech, Pelotas, RS - criswille@yahoo.com

³Técnico de laboratório da empresa BioPlant Tech, Pelotas, RS - guilhermesilvasilveira2015@gmail.com

⁴Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ - Lwillianpacheco@gmail.com

⁵Sócia proprietária da empresa BioPlant Tech, Pelotas, RS - daiane_bio@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes práticas em cultura de tecidos, uma das mais utilizadas é a micropropagação de plantas *in vitro*, atualmente grande responsável pela produção de mudas de várias espécies para fins comerciais, tendo como vantagens a produção de mudas em menor tempo, a obtenção de várias plantas a partir de um exemplar (OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2019), sadias, isentas de vírus e outros microrganismos causadores de doenças (MENEZES et al., 2012).

A biofábrica é uma fábrica que necessita do uso biotecnológico para a produção de mudas em larga escala, na qual seus processos precisam ser bem definidos, podendo chegar a desenvolver milhares de mudas por ano (LEE et al., 2007). O progresso de uma biofábricas e a produção de mudas com uma alta qualidade, está intimamente relacionada a sua elaboração e direcionamento quanto a seus materiais de consumo e equipamentos. É necessário que haja cautela com relação ao ambiente, impedindo que poeira, microrganismos, entre outros, entrem em contato com a área que serão realizados os processos (TEIXEIRA et al., 2012).

CARVALHO et al., (2013) afirma que é crescente o número de empresas que cada dia mais optam por essa tecnologia, buscando abranger a demanda de um material propagativo de alta qualidade e conservação gênica de importantes culturas como as flores e plantas ornamentais, frutíferas, silviculturas, entre outros.

Atualmente a biofábrica BioPlant Tech, sediada em Pelotas, trabalha com micropropagação *in vitro* de plantas ornamentais e frutíferas. As mudas multiplicadas *in vitro* são acondicionadas em frascos de vidro, porém para redução de custos está sendo utilizado frascos de plástico (polipropileno). Foi observado que o desenvolvimento dos explantes acondicionados em frascos de plástico apresentava-se inferior aos de vidro em algumas espécies. Frente a isso, para solucionar esse problema foi realizado um experimento com amora, cv. Tupy, em frascos de plástico, modificando o meio de cultivo para melhor desenvolvimento das mesmas.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido na empresa BioPlant Tech, situada na cidade de Pelotas, RS.

Para a indução de multibrotações *in vitro*, utilizaram-se como explantes, segmentos nodais isolados de plântulas de amora, cv. Tupy, germinadas *in vitro*. O meio nutritivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de diferentes doses de carvão ativado (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L⁻¹), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), sendo o pH ajustado para 6,0 antes da inclusão do ágar (7 g L⁻¹). Em seguida, os meios foram distribuídos em potes plásticos (polipropileno) de 250 ml e autoclavados durante 20 minutos a uma temperatura de 121°C. Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻²s⁻¹, provida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e fotoperíodo de 16 horas .

O delineamento experimental utilizado para testar o efeito do carvão ativado, foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo que cada repetição continha 20 explantes, totalizando 120 explantes por tratamento. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), seguido da comparação entre as médias dos tratamentos (Tukey) ao nível de 5% de probabilidade de erro e a construção dos gráficos foram conduzidas no ambiente de programação estatística R Ver.4.2.1 (R TEAM CORE, 2020), utilizando os seguintes pacotes: Agricolae Ver.1.3-5 (MENDIBURU; YSEEN et al., 2020) e ggplot2 (WICHHAM et al., 2016). Após 45 dias foram analisados: altura média dos explantes por broto (cm), número médio de brotos, número médio de explantes por broto e presença de raiz.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados para multiplicação do material, segmentos nodais de plântulas obtidas *in vitro*.

Com base nas características avaliadas, foi possível observar diferença nas respostas ao tratamento com ou sem suplementação do meio de cultura com carvão ativado e no padrão de crescimento de plantas de amora na fase de multiplicação *in vitro* aos 45 dias (Figura 1).



Figura 1. Efeito das dosagens de carvão ativado em meio de cultivo de amora, cv. Tupy. A- 0 mg L⁻¹; B- 0,5 mg L⁻¹; C- 1,0 mg L⁻¹; D- 1,5 mg L⁻¹; E- 2,0 mg L⁻¹ de carvão ativado.

Em relação a altura média dos explantes, foi observado que nas maiores doses de carvão ativado na ocorreram diferença estatística (1,55 e 1,55 respectivamente), diferindo das demais doses (Figura 2). Dependendo da espécie, do tipo de explante ou da fase de cultivo a ser propagada, a adição de um antioxidante (carvão ativado e PVP) ao meio de cultura pode ter efeitos positivos (PANKAJ et al., 2014), como observado no estudo *in vitro* da cultura da espécie em estudo.

O tratamento com melhor resultado em relação ao número médio de brotos foi verificado na ausência de carvão ativado (2,39), diferindo estatisticamente das demais doses. O aumento da concentração de carvão ativado pode ser prejudicial ao meio de cultura, pois GALDIANO-JÚNIOR et al. (2010), mencionam que o uso de carvão ativado pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como, por exemplo, os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo *in vitro*. Essa circunstância, pode servir como justificativa para a diminuição do número de brotações à medida que as doses de carvão ativado suplementadas ao meio de cultura aumentaram.

O efeito da suplementação com carvão ativado não inferiu significativamente as características morfológicas estudadas na multiplicação *in vitro* de amora, cv. Tupy.

A suplementação com carvão ativado aos 45 dias de cultivo para multiplicação *in vitro* de amora proporcionou o maior número de explantes por brotos na concentração de 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ (3,70 e 4,09 respectivamente), diferindo estatisticamente dos demais (Figura 2).

A adição de carvão ativado ao meio de cultivo aumenta a adsorção de substâncias que inibem o desenvolvimento vegetal, assim como minimiza a toxicidade de reguladores vegetais ou de substâncias exógenas com efeito nocivo, o que contribuiu para um maior crescimento *in vitro* do explante.

Não houve fase de enraizamento, ou seja, as raízes foram emitidas espontaneamente não necessitando da adição de auxina para a indução das mesmas, porém verificou-se que as maiores dosagens de carvão ativado contribuíram para o aumento da indução de raízes, sendo a dose de 1,0 mgL⁻¹ a que induziu maior média de explantes com raízes (Figura 2).

Segundo SILVA et al., (2017) o carvão simula a condição de escuro na qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, além de possuir efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio, absorvendo compostos fenólicos inibidores do enraizamento.

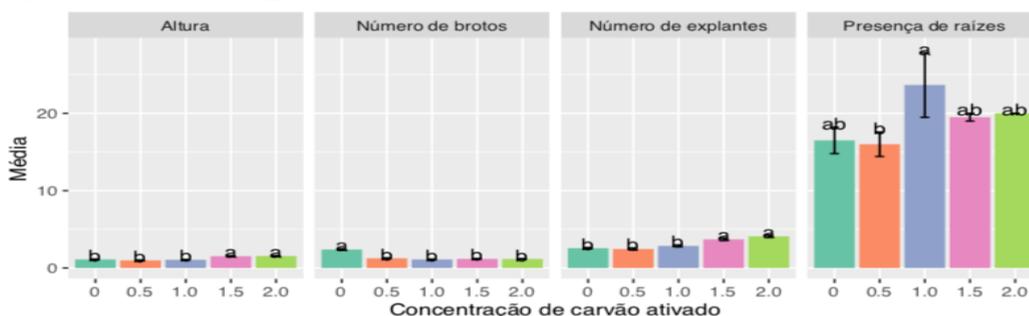




Figura 2. Efeito da adição do carvão ativado sobre o número médio da altura dos explantes (cm), número médio de brotos, de explantes por broto e presença de raiz, em plantas de amora, cv. Tupy.

4. CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultura MS com carvão ativado nas concentrações de 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ registrou os melhores resultados para a multiplicação de amora, cv. Tupy, pois induziu maior número de explantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, A.C.P P.; TOMBOLATO, A.F.C.; RODRIGUES, A.A de J. Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. **Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2013.
- LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A.; CORRÊA DA SILVA, A.D.; LEE, L.L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 2002-2010, 2007.
- MENDIBURU, F.; MUHAMMAD YASEEN (2020). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.R package version 1.4.0*, <https://myaseen208.github.io/agricolae/https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- MENEZES, T. P.; GOMES, W. A.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. (2012). Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha. **Bioscience Journal**, 28(6). <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13986/11095>
- MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15:473-97, 1962.
- OLIVEIRA, A.D.; ANTUNES, L.E.C.; SCHUCH, M.W. Caracterização morfológica de cultivares de oliveira em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. **Informe agropecuário**, 27(231), 55-62, 2006.
- R CORE TEAM (2020). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available in: <https://www.R-project.org>
- SANTOS, J. D.; PINHEIRO, M. V. M.; FONTANA, D. C.; SCHIMIDT, D.; PRETTO, M. M. **Estabelecimento in vitro de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki'**. *Ciência Florestal*, 29(2), 2019.
- TEIXEIRA, K.C dos S. et al. Produção comercial de mudas micropropagadas em Sergipe. In: **CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS**, 3., 2012, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2012.
- WICKHAM, H. (2016). **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DAS PROTEÍNAS DA SUPERFAMÍLIA AP2/ERF NO GENOMA DA OLIVEIRA

VINICIUS FLORES DE SOUZA¹; ANDRES CHACÓN-ORTIZ²; LARISSA NEY
BASSINI³; LUCIANO CARLOS DA MAIA⁴; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA⁵;
CAMILA PEGORARO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – viniciusflores68@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – aecortiz@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – larissanbassini@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – lucianoc.maia@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – acostol@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) é uma das espécies mais difundidas e socioeconomicamente importantes na Bacia do Mediterrâneo. A domesticação da oliveira ocorreu no Oriente Próximo cerca de 4.000 a 6.000 anos atrás, e atualmente é cultivada em mais de 40 países, incluindo o Brasil. Além da importância dessa cultura na agricultura e na economia, destaca-se os benefícios do azeite na saúde (WU et al. 2022).

A maioria das cultivares de azeitona são antigas. O melhoramento genético via cruzamentos iniciou na metade do século XX e representa a estratégia mais promissora para disponibilizar novas cultivares adaptadas às demandas de plantio nos diferentes países. Ferramentas de biotecnologia podem ser utilizadas para reduzir o tempo necessário para desenvolver novas cultivares (RALLO et al. 2018). Nessa perspectiva, o entendimento das informações contidas no genoma da oliveira pode auxiliar o melhoramento genético na obtenção de novas variedades.

Os fatores de transcrição (FT) se ligam em sequências específicas de DNA (elementos *cis*) presentes nos promotores dos genes de eucariotos. Com isso, FT regulam a expressão dos genes alvo em intensidade específica no tempo e no espaço, controlando o crescimento e desenvolvimento das plantas e a resposta ao ambiente. De acordo com o domínio de ligação no DNA e motivos conservados, os FT são divididos em famílias gênicas, como o AP2/ERF (XIE et al., 2022).

Em plantas, as proteínas codificadas pela superfamília gênica AP2/ERF (*APETALA2/ethylene-responsive factor*) apresentam o domínio AP2/ERF composto de 60-70 aminoácidos conservados. De acordo com os domínios conservados, os FTs AP2/ERF são divididos em quatro famílias: AP2 (*APETALA2*), ERF (*ethylene reaction element binding factor*), RAV (*AP2 related to ABI3/VP1*) e Soloist. A família ERF possui um domínio AP2/ERF, e de acordo com elemento *cis* que se liga é dividida nas subfamílias ERF (se liga em AGCCGCC) e CBF/DREB (se ligam em A/GCCGAC). A família AP2 apresenta dois domínios AP2/ERF, enquanto que RAV, além do domínio AP2/ERF apresenta os domínios VP1/ABI3 (XIE et al., 2022).

Os FTs AP2/ERF estão envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos, na regulação do crescimento e desenvolvimento e na transdução de sinais (XIE et al., 2022), sendo candidatos potenciais no desenvolvimento de novas variedades de

plantas. Nesse sentido, o objetivo dessa pesquisa foi fazer um estudo preliminar da superfamília AP2/ERF no genoma de *Olea europaea* subsp. *europaea* L.

2. METODOLOGIA

2.1. Identificação de proteínas AP2/ERF em oliveira

A sequência do proteoma da oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) foi baixada do banco de dados de OliveTreeDB - Olive Genome Database (<https://genomaolivar.dipujaen.es/db/index.php>). Inicialmente, para obter os peptídeos candidatos foram identificadas as 10 proteínas da família AP2/ERF registradas em oliveiras no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente, foi feita a busca dessas proteínas em *Arabidopsis thaliana* (PlantRegMap/PlantTFDB v5.0), espécie usada como modelo para realizar comparações com oliveira.

Foi utilizado o BLASTp Local-Linux para pesquisa de identidade e similaridade nas proteínas anotadas na oliveira, utilizando como padrão proteínas da *A. thaliana*, com limite máximo do *e-value* $1E^{-10}$. Foram selecionadas aquelas sequências proteicas com no mínimo 70% de identidade e 75% de similaridade. O modelo do domínio AP2/ERF (IPR001471) foi baixado de Pfam (<http://pfam.xfam.org>). A presença desse domínio foi examinada em todas as proteínas utilizando a ferramenta Batch CD-Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>).

2.2. Alinhamento múltiplo e análise de filogenia de proteínas AP2/ERF

Foi construída uma árvore filogenética para classificar as proteínas da superfamília AP2/ERF na oliveira. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado com o software ClustalX 2.1 usando parâmetros padrão. A árvore filogenética foi construída usando o software MEGA 11 (TAMURA et al., 2021), com o método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*).

2.3. Expressão dos genes codificadores de proteínas AP2/ERF

O local de expressão de cada gene codificador de proteínas da família AP2/ERF foi previsto usando o programa de alinhamento rápido HISAT-3N (ZHANG et al., 2021). Foram utilizados dados de RNA-seq de diferentes órgãos da planta da oliveira (folha, flor, fruto, tecido meristemático, tronco e raiz), pertencentes ao bioprojeto PRJNA590386 do NCBI. As sequências foram alinhadas com o proteoma de referência obtido de OliveTreeDB.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários fatores de transcrição como AP2/ERF, bHLH e WRKY desempenham um papel essencial na resposta a estresses em oliveira. Por isso, a identificação funcional de genes candidatos necessita de mais atenção, o que poderá constituir uma referência para o melhoramento genético para tolerância na oliveira (NIU et al., 2022).

Com base na nomenclatura da superfamília AP2/ERF (IPR001471) foi possível identificar preliminarmente um total de 200 fatores de transcrição AP2/ERFs na oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.). Resultados similares foram observados



em *Arabidopsis*, videira, álamo e arroz, com 145, 132, 200 e 163 genes *AP2/ERFs*, respectivamente (RASHID et al., 2012). Em oliveira o tamanho dos peptídeos variaram de 126 aminoácidos (aa) (CAA2998492.1) a 915 aa (XP_022861742.1).

As 200 sequências de proteínas *AP2/ERF* de oliveira foram categorizadas 9 grupos (Figura 1).

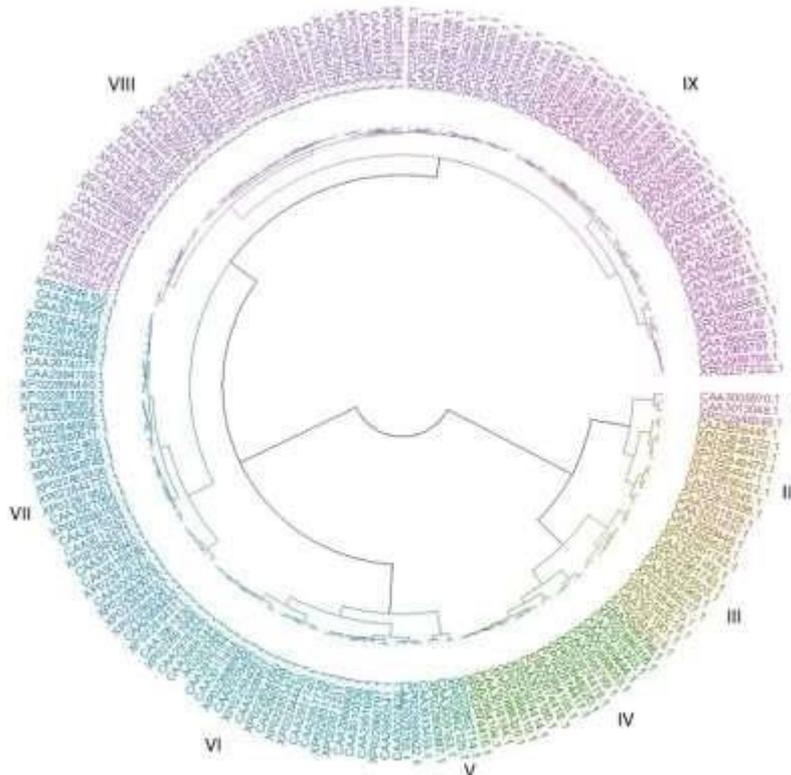


Figura 1. Relações filogenéticas e estruturais das proteínas da superfamília *AP2/ERF* nas oliveiras (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.)

O grupo I (3) foi o menor grupo formado. Na sequência aparecem grupo II (12), grupo III (10), grupo IV (18), grupo V (4), grupo VI (29), grupo VII (34) grupo VIII (55) e o grupo IX (35). Os resultados mostram domínios conservados entre proteínas relacionadas de tipo “*AP2/ERF_dom*” (IPR001471), “Ethylene responsive element binding protein signature” (PR00367), “*AP2/ERF domain profile*” (PS51032), “*AP2 domain*” (PF00847) e “*rav1_2*” (SM00380) e “*AP2*” (cd00018). O tipo, ordem e número de motivos são semelhantes entre grupos, diferindo das proteínas de outros grupos. O número de proteínas da família *AP2/ERF* diferem dos registrados na base de dados iTAK (<http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/index.cgi>), sendo *AP2/ERF-RAV* (7), *AP2/ERF-AP2* (38) e *AP2/ERF-ERF* (328) (ZHENG et al. 2016).

Os transcritos da maioria dos genes que codificam as proteínas *AP2/ERF* (67%) foram encontradas em todos os órgãos da planta. De maneira geral, as flores (16%) e frutos (15%) são os órgãos que apresentaram o maior número de transcritos exclusivos, e as folhas mostraram o menor número de genes *AP2/ERFs* (0,7%). A expressão de genes *AP2/ERF* em todos órgãos da planta de oliveira está de acordo com estudos realizados em outras espécies vegetais, que demonstraram que genes da família *AP2* e *RAV* estão envolvidos no crescimento da planta e desenvolvimento da

flor, e membros da família *ERF/DREB* apresentam papel importante na resposta a estresses bióticos e abióticos, resistência a doenças, e sinalização cruzada entre etileno, ácido abscísico e metil jasmonato (YAMADA et al. 2020).

4. CONCLUSÕES

De maneira preliminar, o genoma da oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) contém ao menos 200 sequências proteicas da família AP2/ERF e a maioria dos genes codificadores dessas proteínas se expressa em todos os órgãos da planta. A diversidade da família sugere uma evolução constante, o que pode estar relacionado com a resposta aos estresses na planta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NIU, E.; GAO, S.; YU, X.; SOLEIMANI, A.; ZHU, S. Comprehensive evaluation of the response to aluminum stress in olive tree (*Olea europaea* L.). **Frontiers in Plant Science**. v.13, 2022
- RALLO, L.; BARRANCO, D.; DÍEZ, C.M.; RALLO, P.; SUÁREZ, M.P.; TRAPERO, C.; PLIEGO-ALFARO, P. Strategies for Olive (*Olea europaea* L.) Breeding: Cultivated Genetic Resources and Crossbreeding. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (eds) **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. Springer, Cham. 2018. Cap. 14, p. 535–600.
- RASHID, M.; GUANGYUAN, H.; GUANGXIAO, Y.; HUSSAIN, J.; XU, Y. AP2/ERF Transcription Factor in Rice: Genome-Wide Canvas and Syntenic Relationships between Monocots and Eudicots. **Evolutionary Bioinformatics**. v. 8, p. 321-55. 2012.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. v. 38, n. 7, p. 3022–3027. 2021.
- XIE, W.; DING, C.; HU, H.; DONG, G.; ZHANG, G.; QIAN, Q.; REN, D. Molecular Events of Rice AP2/ERF Transcription Factors. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 12013. 2022.
- YAMADA, Y.; NISHIDA, S.; SHITAN, N.; SATO, F. Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factor-encoding genes in California poppy (*Eschscholzia californica*) and their expression profiles in response to methyl jasmonate. **Scientific Reports**. v. 10, n. 18066. 2020.
- WU, T.; MA, T.; XU, T.; PAN, L.; ZHANG, Y.; LI, Y.; NING D. The De Novo Genome Assembly of *Olea europaea* subsp. *cuspidate*, a Widely Distributed Olive Close Relative. **Frontiers in Genetics**. v. 13, n. 868540, 2022.
- ZHANG, Y.; PARK, P.; BENNETT, B. THORNTON, M.; KIM, D. Rapid and accurate alignment of nucleotide conversion sequencing reads with HISAT-3N. **Genome Research**. v. 31, 1290–1295. 2021.
- ZHENG, Y.; JIAO, C.; SUN, H.; ROSLI, H.; POMBO, M.; ZHANG, P.; BANF, M.; DAI, X.; MARTIN, G.; GIOVANNONI, J.; ZHAO, P.; RHEE, S.; FEI, Z. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. **Molecular Plant**. v.9, p.1667-1670.2016.

ESTUDOS PRELIMINARES DE SUBSTRATO PARA MICROVERDES DE ALFACE MIMOSA

MARIA CHRISTINA WILLE¹; LUCIANA BICCA DODE²; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA³; VERA LUCIA BOBROWSKI⁴;

¹Universidade Federal de Pelotas – chriswille@yahoo.com

²Universidade Federal de Pelotas – lucianabicca@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - biahgr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- vera.bobrowski@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os microverdes são um novo e emergente sistema de produção de plantas que vêm ganhando popularidade mundialmente (XIAO et al., 2012). Os microverdes são vegetais comestíveis nos estágios iniciais do desenvolvimento das plântulas após o período de germinação. Plantas jovens, com tamanhos que variam entre 5 e 10 cm de altura, radícula, eixo caulinar central, folhas cotiledonares e o primeiro par de folhas verdadeiras.

Por se tratarem de plantas de pequeno porte, e por serem de fácil cultivo, os microverdes devem ser produzidos com substratos de fácil manejo. O substrato escolhido deve possuir condições físicas, químicas e biológicas favoráveis ao desenvolvimento das plantas (SANTOS et al, 2020), uma vez que ele influencia na manutenção do sistema radicular da planta, no fornecimento de água e nutrientes e nas trocas gasosas entre as raízes e o ar exterior. Além disso, o substrato deve ser composto por materiais de baixo custo, fácil aquisição e preferencialmente reciclável. Em outras palavras, um bom substrato para microverdes tem o propósito de assegurar o crescimento da planta em um curto período de tempo e com baixo custo (FILGUEIRA, 2003).

Ainda existem poucos estudos sobre a utilização de substratos específicos para o cultivo de microverdes e os seus efeitos sobre a produção. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a influência dos diferentes substratos nas características fisiológicas de microverdes de Alface da qualidade Mimosa Prado.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas, utilizando-se de sementes de Alface Mimosa Prado, livre de agrotóxicos, do fabricante Isla Sementes, adquiridas no comércio local. Foram utilizados 5 substratos diferentes, sendo eles: casca de arroz carbonizado, vermiculita, fibra de casca de coco, perlita expandida e substrato comercial. Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições. Foram utilizadas 40 g de

substrato para cada repetição. O material pesado foi hidratado com água, durante 3 horas, lavado 3 vezes com água, e distribuído em potes plásticos perfurados. Após, 0,5 gramas de sementes de Alface Mimosa Prado foram semeadas. Os potes foram então colocados em bandejas plásticas, e incubados em sala de crescimento, sem controle de temperatura e fotoperíodo, imitando o processo doméstico de cultivo sendo a irrigação feita por capilaridade. Foram analisados o início da germinação e as medidas de parte aérea e radícula aos 14 dias. O comprimento da parte aérea e radícula das plântulas de Alface Mimosa Prado foi medido através da coleta aleatória de 10 plântulas aos 14 dias após a implementação do experimento, utilizando-se de régua milimetrada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da germinação aconteceu aos 2 dias após a instalação do experimento para todos os substratos utilizados. Observou-se visualmente que no substrato perlita expandida havia um menor número de sementes germinadas, em comparação aos outros substratos utilizados. Isto pode ter ocorrido devido a característica irregular da superfície do substrato perlita expandida, e também devido às suas características químicas.

As médias destas medidas são apresentadas no Gráfico 1. Onde podemos observar que as plântulas tiveram maior desenvolvimento com os substratos de casca de arroz carbonizada, com média de 3,72 cm e com substrato comercial, com média de 3,70 cm. Os outros substratos apresentaram médias de 3,17 cm para vermiculita e fibra de casca de coco e de 2,45 cm para perlita expandida.

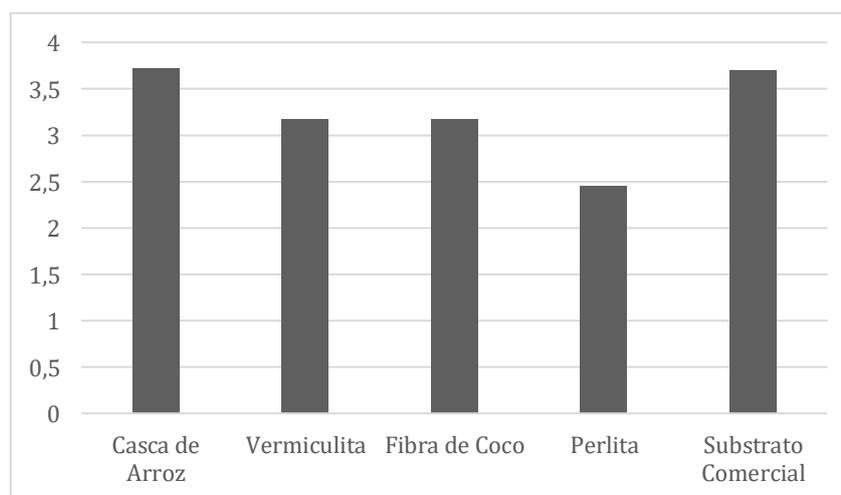


Gráfico 1 – Tamanho Médio de Parte Aérea de Plântulas de Alface Mimosa Prado aos 14 dias.

As médias do comprimento das radículas das plântulas de Alface Mimosa Prado são apresentadas no Gráfico 2. Onde podemos observar que as radículas das plântulas de Alface Mimosa Prado tiveram maior desenvolvimento com os substratos de casca de arroz carbonizada e com vermiculita, apresentando média de 2,23 cm. Os outros substratos, fibra de casca de coco teve média de 1,71 cm, perlita expandida teve média de 1,93 e o substrato comercial teve média de 1,54 cm, sendo a menor observada no experimento.

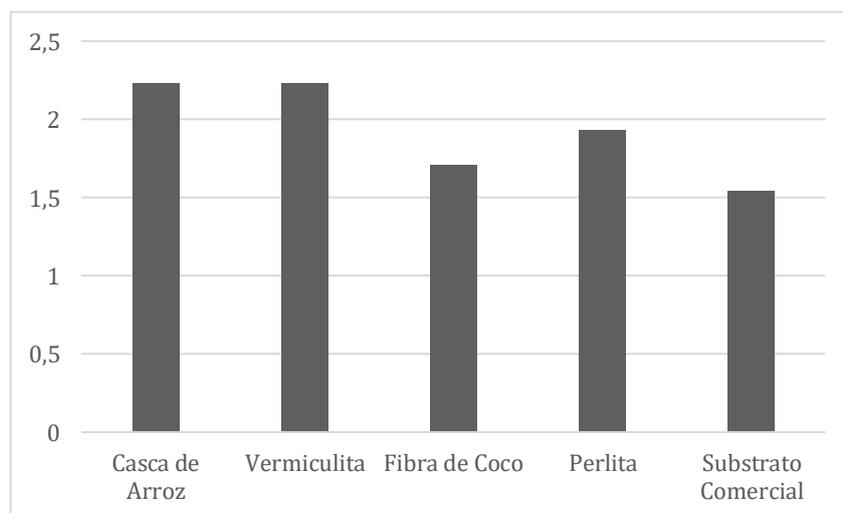


Gráfico 2 – Tamanho Médio das Radículas de Plântulas de Alface Mimosa Prado aos 14 dias.

Santos et al (2020) encontraram resultados parecidos comparando humus de minhoca, com substrato de fibra de coco no desenvolvimento de microverdes de beterraba. Diferentemente, Bonato et al (2022), em experimento com microverdes de rúcula, cenoura e beterraba, identificou que o substrato comercial Carolina Soil® foi mais adequado em comparação ao substrato de fibra de coco. Resultado parecido foi encontrado em estudo com microverdes de rúcula, comparando os substratos Carolina Soil® e vermiculita, onde o substrato comercial também obteve melhores resultados (WIETH et al, 2018).

4. CONCLUSÕES

A sustentabilidade do sistema de cultivo é um ponto crítico da produção de microverdes, que pode ser melhorado pela otimização dos fatores de produção, como disponibilidade de água, tipo de substrato utilizado e iluminação. Além do impacto econômico e ambiental, o substrato influencia a produtividade, então, estudos adicionais podem ser necessários para avaliar o efeito desses substratos sobre as características de produção e qualidade dos microverdes.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONATO, A.; LEMOS, G. R.; CALLEGARO, G. M.; NAGEL, J. C.; SOMMER, L. R. Substratos e qualidade de luz na produção de microverdes. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, pag. 1-8, 2022.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 402p.

SANTOS, F. L. dos; COSTA, E. S. da; LIMA, C. S. M. Diferentes substratos no desenvolvimento e na pós-colheita de microverdes de beterraba (*Beta vulgaris* L.). **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, vol. 21, núm. 2, 2020.

XIAO, Z., LESTER, G. E., LUO, Y., & WANG, Q. Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 60, p. 7644– 7651, 2012.

WIETH, A. R.; PINHEIRO, W. D.; DUARTE, T. da S.; SILVA, M. A. S. da; PEIL, R. M. N. Produção de microgreens em diferentes substratos e concentrações de solução nutritiva. **ENCONTRO BRASILEIRO DE HIDROPONIA**, 12. Florianópolis, 2018. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2018. p. 109-112. 2018.

Isolamento de uma levedura selvagem *Saccharomyces cerevisiae* com potencial para produção de cerveja
GUSTAVO RETZLAF MAAS¹; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ²; NEIDA CONRAD²; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹ Universidade Federal de Pelotas – gustavo.retzlaf@gmail.com

² Universidade Federal de pelotas - renanbiotec@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - vitoriasgon@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - conradneida@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade de microrganismos existentes nos ecossistemas é vasta. Estima-se que a maioria dos microrganismos viáveis ainda não foi isolada, existindo um grande interesse por parte da indústria no isolamento desses organismos para utilização em diversas áreas, como na indústria alimentícia, saúde, biocombustíveis, bebidas entre muitas outras áreas (Poli et al., 2017). As leveduras, fungos unicelulares, são encontradas em inúmeros ambientes, sendo frequentemente isoladas de fontes ricas em carboidratos, como bagas de frutas e exsudatos de plantas, contudo o solo e alguns insetos também apresentam um grande número de leveduras associadas (RAO et al., 2008; TIKKA et al., 2013)

No Brasil vem sendo observado um crescimento significativo no número de cervejarias ao longo dos últimos anos. Em 2021 o Brasil teve um crescimento de 12% em relação ao ano anterior (MAPA, 2021). Avaliando o crescimento anual do mercado cervejeiro, observa-se uma demanda crescente por novosestilos de cerveja por parte de consumidores nos últimos anos, impulsionado principalmente pelo surgimento da comunidade cervejeira artesanal. Com o aumento da concorrência nos mercados de cerveja, toda a indústria foi forçada a reconsiderar sua abordagem e diversificação de seus portfólios de bebidas (Lengeler et al. 2020), buscando por exemplo produtos inovadores e de origem local. Baseado nisso, nosso trabalho utilizou diferentes técnicas de microbiologia e biologia molecular para obter um novo isolado de levedura, com o objetivo de isolar uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de seu ambiente natural e caracterizá-la para futura utilização em processos fermentativos na indústria cervejeira.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil localizada entre a Latitude: 31° 46' 34" Sul, Longitude: 52° 21' 34" Oeste, possuindo um clima temperado. As amostras foram obtidas a partir da extração de partes das frutas e plantas, ou por meio de raspagem da superfície com swabs estéreis. Os mesmos foram inoculados em meio seletivo YPM8E5 (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 80 g/L maltose, 5% etanol (v/v), 50 µg/mL canamicina, 50 µg/mL cloranfenicol), meio preparado e disponível pelo (Laboratório de microbiologia do centro de desenvolvimento tecnológico de pelotas). As amostras foram incubadas por 48h, a 28 °C, em agitador orbital a 150 rpm. As amostras que apresentaram turbidez no meio de cultura foram replicadas, por técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo YM (*Yeast and Malt extract*) ágar.

Para avaliar a capacidade de fermentação dos isolados presentes na tabela 1, foi utilizado mosto cervejeiro sintético composto por 400 ml de extrato de malte (Dry Brew, Liotecnica, Brazil), com densidade de 11 °Brix ou 1044 g/cm³, pH 5.0), esterilizado em autoclave por 15 minutos a temperatura de 121°C. Iso- α -ácidos 30% extraído de lúpulo (*Humulus lupulus*, Hopsteiner, Germany) em uma concentração de 15 IBU (International Bitterness Units) foram adicionados após a esterilização. Após o período de fermentação (10 dias), foi avaliada a atenuação (capacidade de consumir os carboidratos) realizada por cada um dos isolados.

Diversos testes foram realizados para avaliar a capacidade de crescimento dos isolados em diferentes condições de cultivo como: pH e temperaturas diferentes de incubação, tolerância ao estresse iônico, capacidade de absorção de carboidratos diferentes como maltose e glicose 20% (p/v), resistência a concentração de 5% de álcool etílico, e também a tolerância ao ácido lático. Ainda, foi realizado um teste para verificar a capacidade dos isolados em tolerar os ácidos (α e β) provenientes de *lúpulo*., segundo protocolo descrito por Samanfar et al., (2017).

Após visualização de forma macro e micro morfológicamente das colônias dos isolados e da fermentação primária, os isolados foram selecionados e identificados a nível molecular. O DNA genômico total de cada isolado foi extraído a partir do protocolo descrito por Preiss et al. (2018). A identificação a nível de espécies foi realizada através da técnica de PCR utilizando os primers ITS1 e ITS4, que amplificam a região que compreende o gene nuclear 5.8S do rRNA e as regiões flangeadoras do ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

O produto da amplificação por PCR foi purificado, e enviado para sequenciamento na empresa ACTGene® Análises Moleculares. O resultado do sequenciamento foi submetido à ferramenta online Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e analisado quanto a similaridade com sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando meios de cultivo seletivos para o crescimento de leveduras, foi possível obter uma coleção de isolados com diferenças macro e micro morfológicas em suas colônias e/ou células visualizadas em microscópio ótico. O isolamento das leveduras foi beneficiado também por meio de diversas passagens por esgotamento em meio de cultura sólido, uma vez que havia a necessidade da obtenção de culturas puras. Todas as fontes de isolamento apresentaram leveduras, contudo alguns fungos filamentosos e bactérias também puderam ser observados, havendo a necessidade do cuidado para que esses não mantivessem a contaminação das culturas isoladas.

A partir do teste de fermentação observamos que 75% das leveduras isoladas não possuíam a capacidade de atenuar de maneira eficaz os açúcares presentes no extrato de malte, mantendo níveis de atenuação entre 11% a 13% (Tabela 1). A extração de DNA a partir do protocolo com micropérolas de vidro foi uma forma eficaz de se obter DNA puro e com grande concentração (>1 ug/uL), favorecendo as etapas seguintes de PCR. Os primers ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar a região repetitiva de rDNA, que inclui o gene 5.8S rRNA e duas regiões não-codificantes designadas como espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), já descritos por White et al. (1990). Os produtos da amplificação por PCR foram utilizados na ferramenta Blast N, a qual possibilitou a identificação de 3 espécies diferentes. A identificação de cada isolado, a partir da comparação da sequência amplificada com o banco de dados do NCBI, está apresentada na Tabela 1.

Um dos isolados, a levedura identificada como *S. cerevisiae* BERG004 desperta o interesse em sua utilização em processos fermentativos pela sua capacidade de consumir açúcares mais complexos como a maltose (Duval et al., 2010), o que pôde ser observado também em nosso trabalho, em que esse isolado apresentou percentual de atenuação de 67%. Visto que o pH da cerveja se mantém em torno de 4.0 (Anna Dysvik et al, 2020), essa também foi uma característica avaliada após a fermentação. Todos os isolados foram responsáveis por pHs finais do mosto similares aos encontrados em cervejas, variando entre 4.07 a 4.33. Os resultados observados para o isolado BERG004 foram muito similares ao controle *S. cerevisiae* WLP001, uma levedura comumente utilizada por diversos cervejeiros (Berner, T.S et al., 2013).

Tabela 1 - Resultado dos testes de fermentação com mosto sintético utilizando os isolados e WLP001.

Isolado	Espécie	Atenuação aparente	pH Final	Biofilme	Notas sensoriais
BERG004	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.0%	4.15	-	Gasoso, álcool, esterificado
WLP001 (cepa comercial)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50.0%	4.45	-	Gasoso, álcool
BAN001	<i>Meyerozyma carphila/caribbica</i>	13.6%	4.07	-	Fenólico, picante
CAQ001	<i>Pichia kudriavzevii</i>	13.6%	4.18	+	Solvente, frutado
CAF001	<i>Pichia kudriavzevii</i>	11.3%	4.33	+	Solvente, frutado

Os testes realizados em relação as condições de cultivo, demonstraram a capacidade do isolado BERG004 em tolerar a concentração de 5% de etanol em seu meio, também teve a temperatura de 28°C como ideal para seu crescimento e seu consumo por maltose, ilustrou a sua competência em consumir esse carboidrato, todos resultados superiores a cepa comercial WLP001 (Dados não ilustrados).

Após o teste de tolerância aos α -ácidos dos lúpulos, sugere-se que a levedura *S. cerevisiae* BERG004 suporta as concentrações de 50 e 100 ppm impostas no teste (Fig 1), assim como observado para a cepa controle (WLP001). Esse teste é importante pois o lúpulo exerce um contrabalanço no sabor adocicado da cerveja, além de proteger a bebida contra a contaminação por bactérias Gram-positivas devido sua atividade antibacteriana (Ambra et al., 2021).

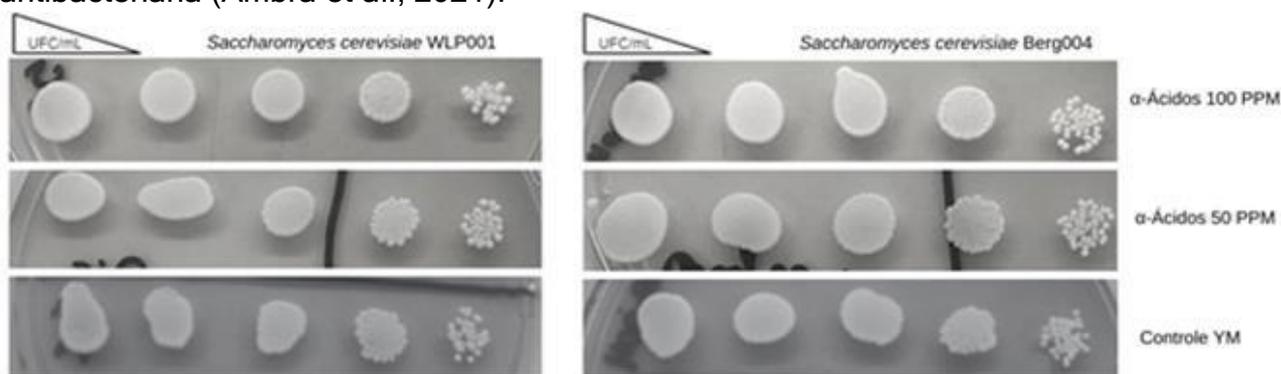


Figura 1 - Capacidade de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* BERG004 (isolado) e WLP001 (cepa comercial) sob diferentes concentrações de α -ácidos de lúpulo.

Leveduras *S. cerevisiae* selvagens vêm sendo isoladas de diferentes fontes, como frutas, flores e até insetos, sendo aplicadas com sucesso na produção de cervejas ao redor do mundo (Klaus B. Lengeler et al., 2020), representando uma ferramenta para produção de cervejas com terroir local, bem como para obtenção de novos flavors e microrganismos com características únicas (White e Zainasheff, 2010).

4. CONCLUSÕES

Concluimos que foi possível obter um isolado selvagem de *S. cerevisiae* a partir de fontes da natureza. Por apresentar um alto percentual de atenuação e tolerar condições encontradas durante a fermentação de cerveja, sugerimos que o isolado BERG004 possa ser aplicado em estudos futuros para produção de cerveja em escala industrial, uma vez que *S. cerevisiae* BERG004 apresentou características similares, até superiores, à cepa comercial WLP001, e essa levedura também poderá ser disponibilizada tanto como uma alternativa para aplicação em processos biotecnológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- POLI, A.; FINORE, I.; ROMANO, I.; GIOIELLO, A.; LAMA, L.; NICOLAUS, B. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. **Microorganisms** 2017, 5, 25.
- RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation, and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology** 2008, v.47, n. 1, p. 19-24.
- TIKKA, C. et al. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. **Bioinformation**, v. 9, n. 8, p. 421-425, 30 abr. 2013.
- Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2021). **Anuário da cerveja no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/arquivos/anuario-da-cerveja-2021.pdf>>. Acesso em: 30 de outubro de 2020.
- LENGELER KB, STOVICEK V, FENNESSY RT, KATZ M AND FÖRSTER J (2020) Never Change a Brewing Yeast? Why Not, There Are Plenty to Choose From. **Front. Genet.** 11:582789.
- SAMANFAR B, SHOSTAK K, MOTESHAREIE H, et al (2017) The sensitivity of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to acetic acid is influenced by DOM34 and RPL36A. **PeerJ** 2017:1-18.
- PREISS R, TYRAWA C, KROGERUS K, GARSHOL LM AND VAN DER MERWE G (2018) Traditional Norwegian Kveik Are a Genetically Distinct Group of Domesticated *Saccharomyces cerevisiae* Brewing Yeasts. **Front. Microbiol.** 9:2137.
- DUVAL EH, ALVES SL JR, DUNN B, SHERLOCK G, STAMBUK BU. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **J Appl Microbiol.** 2010 Jul;109(1):248-59.
- DYSVIK A, LA ROSA SL, DE ROUCK G, RUKKE EO, WESTERENG B, WICKLUND T. Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. **Appl Environ Microbiol.** 2020 Jul 2;86(14): e00566-20.
- BERNER, T.S., JACOBSEN, S. & ARNEBORG, N. The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. **BMC Microbiol** 13, 215 (2013).
- AMBRA R, PASTORE G, LUCCHETTI S. The Role of Bioactive Phenolic Compounds on the Impact of Beer on Health. **Molecules.** 2021 Jan 18;26(2):486.
- White, C., and Zainasheff, J. (2010). **Yeast: The practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers Publications.

EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES PARA RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE SÊMEN NA SEGREGAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS SEMINAIS DE BOVINOS

JULIA NOBRE BLANK CAMOZZATO¹, ANA LAURA DA SILVA FEIJÓ², CÉSAR AUGUSTO OSORIO PINZÓN², JOSÉ LUIZ RIGO RODRIGUES³, MARCELO BERTOLINI³

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul – julia.camozzato@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – sf.analaura@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – capinzono@unal.edu.co

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – joseluiz.rodrigues@ufrgs.br

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – mbertolini@ymail.com

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma prática muito comum na pecuária mundial, sendo amplamente utilizada na espécie bovina e em diversas outras espécies (THIBIER, 2002; WABERSKI, 2018). Embora a técnica de IA permita o uso de sêmen fresco, refrigerado ou congelado, foi com a criopreservação de sêmen que essa biotécnica se estabeleceu no mercado, já que possibilitou o armazenamento de sêmen de maneira indefinida, facilitado a disseminação de genética pelo mundo (VISHWANATH, 2003).

Para a criopreservação de sêmen é necessário o uso de diluentes que permitam que o sêmen resista à congelação (BUSTANI, 2021). Para um diluidor proteger adequadamente o sêmen, é necessária a utilização de protetores de membrana, geralmente compostos por gema de ovo e/ou leite desnatado, que protegem os espermatozoides de choques térmicos e osmóticos; e o uso de crioprotetores permeáveis, como o glicerol, que diminuem a formação de cristais de gelo no interior das células (BARBAS, 2009).

Dentre a principal limitação da IA está o melhoramento parcial da genética, já que essa técnica permite apenas o melhoramento por parte dos reprodutores machos. Outras biotécnicas, como a fecundação *in vitro* (FIV) e a clonagem animal, permitem a seleção de gametas masculinos e femininos ou então a produção de um animal idêntico ao clonado, respectivamente (EDWARDS, 2003; FERRÉ, 2020; PARRISH, 1991). Todavia, na produção animal, a FIV e principalmente a clonagem, são menos presentes e apresentam uma utilização mais pontual quando comparadas com a IA, devido principalmente a um maior custo, taxas de sucesso inferiores, maior dificuldade técnica e a uma menor eficácia (EDWARDS, 2003; FERRÉ, 2020).

Embora o principal interesse na criopreservação do sêmen seja a preservação dos espermatozoides, células somáticas presentes nos ejaculados também acabam por serem conservadas (NEL-THEMAAT, 2008). A presença dessas células somáticas seminais (CSS) possibilita a produção *in vitro* (PIV) de embriões pela clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (KATO, 2000; NEL-THEMAAT, 2008). Desse modo, amostras criopreservadas de sêmen de animais vivos, mortos ou inclusive extintos podem ser usadas para a recuperação de animais

de alto valor zootécnico que tenham vindo a óbito, o resgate de grupos genéticos com populações restritas ou não mais existentes, e preservação de espécies em risco de extinção (EDWARDS, 2003; GOMÉZ, 2008; NEL-THEMAAT, 2008).

Por fim, esse trabalho consiste na avaliação de diferentes diluentes em um protocolo modificado que permita a segregação dupla dos espermatozoides, que podem ser utilizados a FIV e das CSS, que podem ser utilizadas para clonagem por TNCS.

2. METODOLOGIA

Coletaram-se ejaculados de quatro touros Brangus, todos adultos férteis, por eletroejaculação. Um ejaculado de cada macho foi dividido em oito grupos, de acordo com o diluente utilizado: (a) sêmen fresco; (b) três grupos de diluente sem glicerol para refrigeração por 24 h, constituídos de Tris-Gema (TG), Citrato-Gema (CG) e Lactose-Gema (LG); e (c) quatro grupos de diluente com glicerol para congelação, incluindo Tris-Gema-Glicerol (TGG), Citrato-Gema-Glicerol (CGG), Lactose-Gema-Glicerol (LGG) e diluente comercial BotuBOV®.

O perfil de segregação das CSS foi realizado com sêmen fresco após a coleta ($t=-3$ h), com o sêmen diluído em equilíbrio a 5°C ($t=0$ h) e pós-resfriamento ou congelamento ($t=24$ h). As amostras foram submetidas à centrifugação a 400 G por 20 min em gradiente de 20/50/90% de Percoll®. Coletaram-se quatro frações totais de cada amostra: fração superficial de 20% (FTI), entre 20% e 50% (FTII), remanescente de 50% (FTIII) e *pellet* do 90% (FTIV).

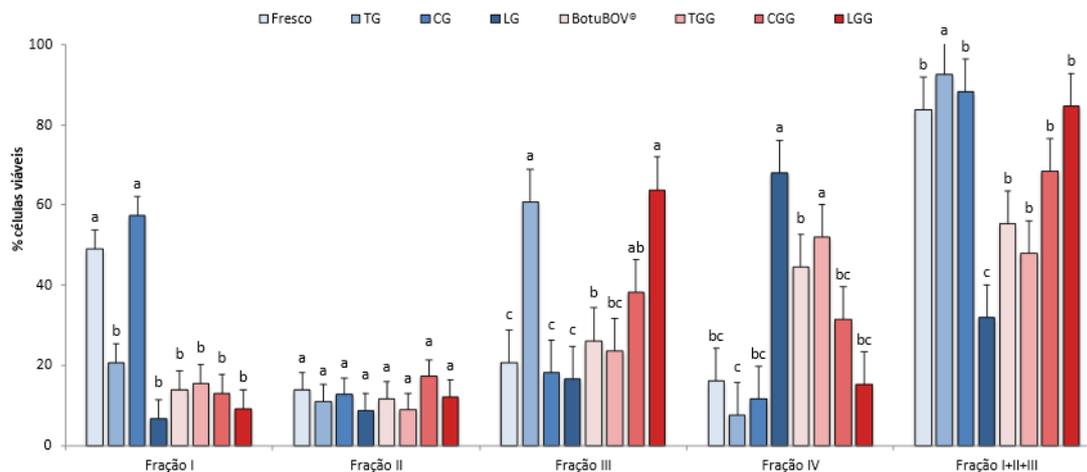
Foi realizada a avaliação citológica das CSS, viabilidade celular com corante Azul de Tripiano e motilidade e vigor dos espermatozoides na FTIV. Os dados foram analisados por análise de variância com comparações pareadas pelo teste de Tukey, pelos testes de Kruskal-Wallis e X^2 , e por correlação simples de Pearson ($P<0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen fresco (-3 h) e o diluente CG concentraram as CSS na FTI (49,1 e 57,5%), enquanto os diluentes TG e LG concentraram as CSS na FTIII (TG, 60,7%) e FTIV (LG, 68,0%). A adição de glicerol alterou o perfil de migração do TGG para a fração FTIV (52,1%) e do LGG para a FTIII (63,9%), enquanto o diluente comercial segregou as CSS nas frações FTIII (31,1%) e FTIV (44,6%), e o diluente CGG na FTIII no $t=0$ h (46,7%) e na FTIV após a congelação (42,0%). Houve diferença entre os diluentes quanto à segregação de CSS nas frações de Percoll®, indicando uma migração celular distinta entre os diluentes, e com ou sem a presença de glicerol (Figura 1).

Não houve perdas nos parâmetros de motilidade e vigor dos espermatozoides pré- e pós-Percoll®. Contudo, houve redução nesses parâmetros na maioria dos diluentes na avaliação de 24 h quando comparado ao tempo. Independente da qualidade seminal, foi possível a segregação das CSS viáveis em altas proporções, variando de 98,5 a 100%.

Figura 1. Porcentagem de células somáticas seminais por frações e diluentes.



4. CONCLUSÕES

Concluimos que a migração das células somáticas seminais se manteve semelhante entre os animais. Todavia, a proporção dessas células, utilizando o gradiente de Percoll®, foi influenciada pela composição do diluente, principalmente pela presença ou não de glicerol nos diluentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS, J. P. & MASCARENHAS, R. D. **Cryopreservation of domestic animal sperm cells**. Cell and Tissue Banking, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BUSTANI, G. S. & BAIEE, F. H. **Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders**. Veterinary World, v. 14, n. 5, p. 1220, 2021.
- EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCracken, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G. & DAVIES, C. J. **Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer**. American Journal of Reproductive Immunology, v. 50, n. 2, p. 113-123, 2003.
- FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STRØBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; & ROSS, P. J. **Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods**. Animal, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020.

GÓMEZ, M. C.; POPE, C. E.; RICKS, D. M.; LYONS, J.; DUMAS, C. & DRESSER, B. L. **Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer.** *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, n. 1, p. 76-82, 2008.

KATO, Y.; TANI, T., & TSUNODA, Y. **Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, n. 2, p. 231-238, 2000.

NEL-THEMAAT, L.; GÓMEZ, M. C.; POPE, C. E.; LOPEZ, M.; WIRTU, G.; COLE, A.; DRESSER B. L.; LYONS L. A.; BONDIOLI K. R. & GODKE, R. A. **Cloned embryos from semen. Part 1: in vitro proliferation of epithelial cells on embryonic fibroblasts after isolation from semen by gradient centrifugation.** *Cloning and Stem Cells*, v. 10, n. 1, p. 143-160, 2008.

PARRISH, J.J., FIRST, N.L. **Bovine in Vitro Fertilization.** In: DUNBAR, B.S., O'RAND, M.G. (eds) *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, 1991, p. 351-361.

THIBIER, M.; WAGNER, H.G. **World statistics for artificial insemination in cattle.** *Livestock Production Science*, v. 74, n. 2, p. 203-212, 2002.

VISHWANATH, R. **Artificial insemination: the state of the art.** *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 571-584, 2003.

WABERSKI, D. **Artificial Insemination in Domestic and Wild Animal Species.** In: NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. (eds) *Animal Biotechnology 1*, 2018, p. 37-64.

BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA

LIVIA FRATICELLI NEVES¹; JÉSSICA LEAL BATISTA²; CLEITON BITTENCOURT DA PORCIÚNCULA³

¹Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – liviafraticelli@hotmail.com

²Universidade de Santa Cruz do Sul – batista@biotradeambiental.com.br

³Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – cleiton-porciuncula@uergs.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, países do mundo todo começaram a se preocupar sobre o destino dos efluentes industriais. A poluição ambiental é um problema que vem se agravando aos longos dos anos, sendo os efluentes atualmente uma das principais causas. Nesse sentido, um dos problemas relacionados ao tratamento de efluentes é a degradação da celulose e seus derivados. Efluentes gerados por indústrias de celulose ou fábricas de papel geram alto volume de efluentes, conseqüentemente carrega consigo grande quantidade de carga orgânica, poluentes tóxicos, coloração escura da qual afeta a penetração da luz no meio, compostos orgânicos halogenados (AOXs), compostos lignínicos (CL), extrativos e alta demanda de oxigênio, além disso, sua matéria orgânica é biorrecalcitrante pelo uso da madeira (FURLEY, 2015; PEITZ et al., 2019). Toda essa variedade de compostos e características deste tipo de efluente resulta em grandes efeitos adversos ao meio ambiente, possuindo por conseqüência, um grande potencial poluidor (FURLEY et al., 2015). Para minimizar esses efeitos adversos aos sistemas naturais, diversos tipos de tratamento podem ser aplicados aos efluentes, sendo a biorremediação uma excelente opção, pois, é uma técnica sustentável da qual é utilizado as enzimas com atividade celulolítica (celulases) ao meio sem causar danos excedentes ao ambiente (BAILÓN-SALAS et al., 2017; GHRIBI et al., 2016).

As bactérias do gênero *Bacillus* são muito eficazes pela sua alta capacidade de biodegradação, além de ter uma ótima tolerância em ambientes extremos como pH elevado, temperaturas altas e fácil adaptação ambiental, isso se deve ao fato da sua capacidade em formar esporos (KAMALI et al., 2015). O uso de microrganismos em processos industriais permitem a produção de moléculas com características químicas específicas, e a sua substituição reduz os impactos ambientais. O crescimento e a utilização da celulose por microrganismos para a produção de celulases podem se dar por meio da fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (Fsm) (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Considerando a eficácia da biorremediação, o maior desafio é o de selecionar espécies de bactéria que sejam eficazes na degradação de matéria orgânica e outros compostos deste efluente, diminuindo o seu potencial poluidor (BAILÓN-SALAS et al., 2017; GHRIBI et al., 2016). A prospecção de agentes produtores de enzimas é um dos campos mais promissores, sendo, os microrganismos os mais explorados por sua

alta capacidade de gerar bioprodutos e participar de processos biotecnológicos(OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

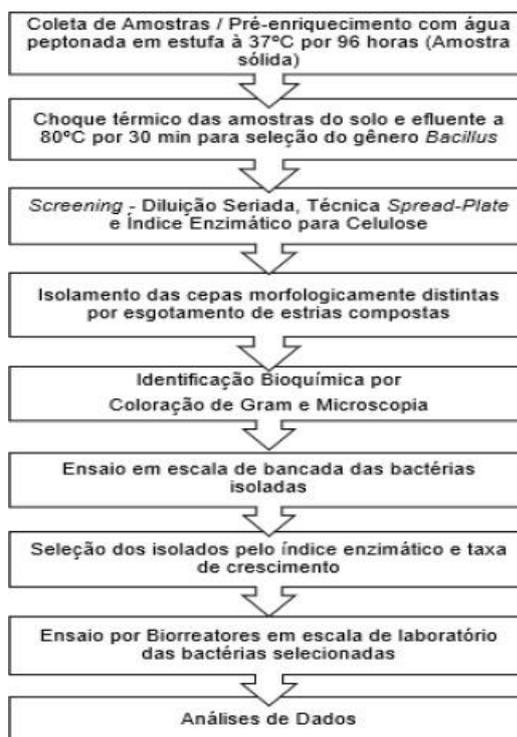
O objetivo desta pesquisa foi realizar a bioprospecção de microrganismos com potencial biotecnológico a partir do isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* com atividade celulósica, localizadas em solos e efluentes. Identificar morfologia e bioquímica das bactérias isoladas. Selecionar a(s) bactéria(s) com maior potencial biotecnológico. Avaliar taxas de crescimento, degradação e esporulação da(s) bactéria(s) selecionadas em biorreatores em escala de bancada e de laboratório.

2. METODOLOGIA

As atividades realizadas neste trabalho foram conduzidas na empresa de biotecnologia, BRBAC Produtos Biológicos Ltda, localizada no município de Santa Cruz do Sul no Estado do Rio Grande do Sul.

Foram coletadas três amostras de locais diferentes, sendo duas amostras de ambientes próximos do solo com árvores em processo de degradação, e uma amostra do ambiente líquido retirado do efluente de uma indústria de tabaco onde tinha a presença de tanino e lignina. A figura 1 ilustra um fluxograma com o resumo do procedimento experimental adotado ao longo do trabalho desenvolvido.

Figura 1 — Diagrama esquemático resumido das atividades realizadas



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram isoladas cinco espécies de bactéria do gênero *Bacillus*, porém, uma delas não apresentou crescimento com atividade celulósica, portanto, foi descartada. Nas etapas consecutivas deram continuidades apenas 4 bactérias, sendo uma isolada de árvore de eucalipto e as outras três isoladas do efluente.

Todas as amostras realizaram o ensaio fermentativo em escala de bancada e de laboratório, obtendo as variáveis de resposta, índice enzimático para celulose, contagem de células totais por UFC mL⁻¹. Na primeira etapa após os resultados foram selecionadas apenas duas para realizar o ensaio em escala de laboratório sendo as duas selecionadas a cepa A e cepa E. O crescimento de células totais para o isolado A foi de $3,63 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ e do isolado E foi de $1,55 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹. Em relação aos valores de índices enzimáticos para celulose, a bactéria A se manteve com valores mais elevados com índice enzimático(IE) de 1,16 e a bactéria E com IE= 0,87 cm. Ambas se demonstraram com grande potencial biotecnológico e poderão ter a sua produção otimizada por meio da adequação das condições de cultivo para trabalhos futuros.

4. CONCLUSÕES

De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de *screening* para seleção de bactérias do gênero *Bacillus*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da bioprospecção de novas linhagens de microrganismos produtores de celulasas. Os microrganismos são muito importantes por apresentarem grandes habilidades de produção de biomoléculas, especialmente enzimas celulolíticas e grande potencial em degradar celulose. Diversos aspectos devem ser avaliados em relação ao seu rendimento e produtividade, bem como o custo de meio de cultivo e otimização dos parâmetros operacionais.

Portanto, diante dos resultados obtidos até o momento, há grandes estímulos para dar continuidade em experimentos futuros com as duas bactérias. Ambas se demonstraram com grande potencial em dar continuidade de novos ensaios e logo poderão ter a sua produção otimizada por meio da adequação das condições de cultivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILÓN-SALAS, A. M. *et al.* Review of molecular techniques for the identification of bacterial communities in biological effluent treatment facilities at pulp and paper mills. **Bio Resources**. v. 12, n. 2, p. 43844409, 2017.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. J. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial wastes. Rio de Janeiro: **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

FURLEY, T. *et al.* PRINCIPAIS FONTES E IMPACTOS DA ECOTOXICIDADE DE EFLUENTES DE CELULOSE E PAPEL. **O PAPEL**, vol. 76, num. 3, MAR 2015.

GHRIBI, M.; MEDDEBOUELI, F.; BEAUREGARD, M. Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications. **Springer Plus**. v. 5, 2016.

KAMALI, M.; KHODAPARAST, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. **Ecotoxicology Environmental Safe**. v. 114, p. 326342, 2015.

OLIVEIRA RFD, CEREDA MP, OLIVEIRA CED (2012) Leveduras com atividade de fermentação em caldo de cana, isoladas sob estresse, de frutos do Cerrado. Universidade Católica Dom Bosco – UCDB.

PEITZ, C., Schroeder L.H., Xavier C.R. AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE CELULOSE KRAFT PELA TÉCNICA DE FT-IR. **O PAPEL**, Paraná, Brasil, v. vol. 80, num. 05, p. 84 - 91, maio 2019.

Estudo prévio da biodegradação de P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum* RS corados com cúrcuma e urucum.

KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS¹; MARIA LUIZA DE OLIVEIRA ZANINI²;
CAMILA RIOS PIECHA³, EUGÊNIA FURHMANN DA SILVA⁴, CAROLINE DE
PAULA LOPES CORRÊA⁵ ; PATRICIA SILVA DIAZ⁶

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – rieffelketnen@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – luizaznn@gmail.com

³Universidade Federal De Pelotas - :camilapiecha@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - eugeniabiotec@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - carol.lopesd@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O plástico petroquímico causa grandes impactos aos ecossistemas, desse modo, novas alternativas têm sido pesquisadas e desenvolvidas para substituir esse material. Dentre elas, destacam-se os biopolímeros, materiais que possuem alta biodegradação com a ação de microrganismos, sendo considerado uma alternativa para diminuir o impacto do plástico (Atlas do plástico, 2020).

Dentre os biopolímeros estudados, destaca-se o Poli-(3-hidroxi-butarato) [P(3HB)], sintetizado por muitos microrganismos como fonte de reserva de carbono e energia (DE AGUIAR et al., 2021). O P(3HB) possui uma rápida biodegradação quando em ambientes microbiologicamente ativos, ao contrário do plástico petroquímico, que pode chegar até 400 anos para sua completa degradação. Também, os plásticos petroquímicos podem gerar fragmentos chamados microplásticos, que apresentam tamanhos inferiores a 5mm, que podem ser carregados pela água e ar, e acumulam-se em órgãos como pulmões (JONES, 2019).

O P(3HB) tem uma ampla aplicação, já tendo sido empregado em materiais como tampas, copos e rótulos, bem como, em diversas áreas, a exemplo da área médica, já que é biocompatível e é absorvido pelo organismo (LOUREIRO, 2021). Quando aplicado em embalagens, é interessante que o mesmo seja corado, pois existem estudos como de Sousa *et. al.* (2016) que mostram que a intenção de compra dos consumidores aumenta quando estes produtos possuem cor e *design*.

Devido à diversidade de aplicações do P(3HB), este trabalho tem como objetivo avaliar a adição de corantes naturais urucum e hibisco na biodegradação de filmes de P(3HB), em solo simulado.

2. METODOLOGIA

2.1. Etapa de crescimento celular e produção do P(3HB)

O microrganismo *Ralstonia solanacearum* RS foi reativado em meio de cultivo YM em agitador orbital a 32 °C, 150 rpm, durante 24 horas. Posteriormente, o cultivo foi adicionado em *Erlenmeyers* aletados contendo meio YM, mantido em em agitador orbital por 32°C, 150 rpm durante 24 horas. Após, o cultivo foi centrifugado e o *pellet* celular mantido em estufa de secagem a 56 °C por 48 horas ou até peso constante.

A extração do P(3HB) a partir do *pellet* celular foi realizada em tubos de ensaio com adição de clorofórmio como solvente. Os tubos foram mantidos sob aquecimento e agitação durante 30 minutos. A secagem dos filmes de P(3HB) foi realizada em placas de Petri, de acordo com a metodologia de *casting* (MACAGNAN et al. 2017).

Os filmes de P(3HB) foram ressolubilizados em tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 0,30 g do biopolímero e 0,15 g dos corantes naturais cúrcuma e urucum. Em seguida foi adicionado clorofórmio nos tubos de ensaio. O processo de aquecimento e ressolubilização do polímero seguem as mesmas condições descritas anteriormente (MACAGNAN et al. 2017).

2.2 Teste de biodegradação dos filmes de P(3HB) coloridos

Os filmes de P(3HB) foram cortados em triângulos, com dimensões aproximadas entre 2 cm e 2,6 cm e pesados em balança de precisão. Os corpos de prova foram acondicionados nas sementeiras plásticas, contendo terra enriquecida com matéria prima de *pinus* bioestabilizado e umedecida com água destilada. O experimento foi realizado por 120 dias, mantido em temperatura de 20°C e adicionado 1 litro de água conforme a necessidade, para manter a umidade do solo. As amostras foram coletadas a cada 30 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante os 120 dias de experimento estão apresentados na figura 1. É possível visualizar em 30 dias, fragmentação semelhante em todos os filmes de P(3HB). Já em 60 dias, as amostras do grupo controle apresentaram maior fragmentação, em relação aos filmes corados. Ao final do experimento, percebe-se a fragmentação total do grupo controle quando em comparação com as amostras coradas com cúrcuma e urucum.

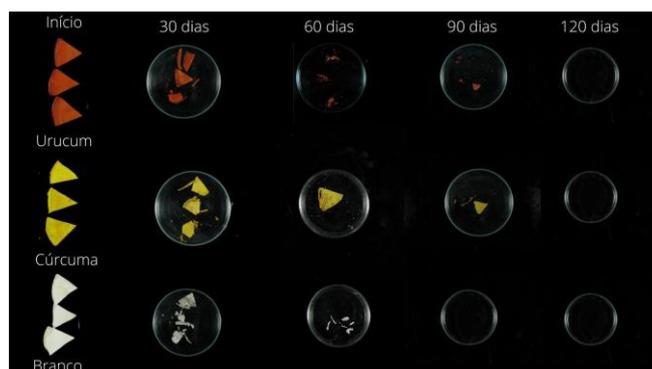


Figura 1. Amostras dos polímeros durante 120 dias.

Após 120 dias de análise, observa-se que todas as amostras sofreram fragmentação completa (figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, a exemplo de TORRES et al. (2020), em que o biopolímero P(3HB) produzido pela cepa *Ralstonia solanacearum* RS apresentou degradação total em cerca de 100 dias.

Todas as amostras apresentaram fragmentação completa em 120 dias, sendo que os filmes corados com urucum e cúrcuma tiveram fragmentação em tempo maior do que o grupo controle.

Em relação ao corante cúrcuma, Campos *et.al.* (2017) relata que a adição de curcumina a filmes biodegradáveis de TPS/BPAT, faz com que estes apresentem maior potencial antioxidante e antimicrobiano, podendo ser usado na fabricação de embalagens ativas que prolongam a vida útil dos alimentos. Sugere-se que esse efeito protetor também possa ter influenciado na fragmentação do biopolímero, que ocorreu em tempo maior, se comparado com o grupo controle, porém, serão necessários mais estudos para comprovar os efeitos da curcumina quando aplicada na coloração do biopolímero.

O corante urucum é utilizado na indústria têxtil, alimentícia e farmacêutica (Vilar et al, 2016), devido ao seu potencial como corante natural, e também, apresenta efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Essas características do corante podem ser responsáveis pela fragmentação mais lenta dos filmes de P(3HB) corados com urucum, quando comparados ao branco até 90 dias.

Na figura 2, são apresentados os dados de degradação em porcentagem obtidos pela diferença entre o peso inicial e final das amostras. Percebe-se que não houve diferença estatística entre a biodegradação do grupo controle e dos filmes corados, o que corrobora com os resultados de TORRES *et al.* (2020).

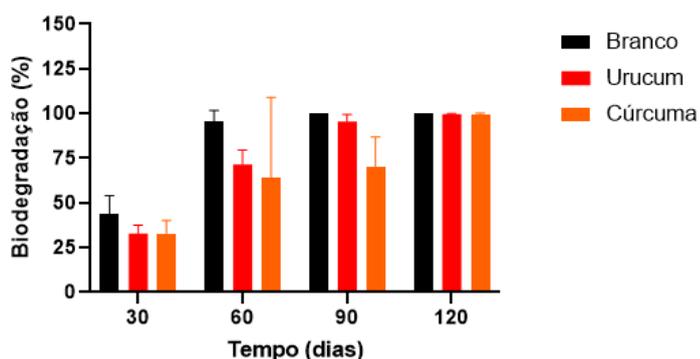


Figura 2. Porcentagem de degradação de P(3HB) grupo controle (branco) e corados com cúrcuma e urucum.

Desse modo, acredita-se que a aplicação dos corantes não tiveram influência sobre o tempo de biodegradação do P(3HB), e, por isso podem ter a

mesma aplicabilidade daqueles sem adição de cor, como em blendas para embalagens bioativas (OLIVEIRA, 2022).

4. CONCLUSÕES

Os filmes de P(3HB) adicionados dos corantes naturais cúrcuma e urucum não apresentaram diferença estatística no processo de biodegradação quando comparados ao grupo controle, com isso conclui-se que os corantes não tem influência sobre o tempo de biodegradação dos biopolímeros produzidos pela *Ralstonia solanacearum* RS. Logo, demonstrando aplicabilidade para produção de embalagens e outros materiais que necessitem de biopolímeros coloridos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS DO PLÁSTICO. [S. l.: s. n.], 2020-. Disponível em: <https://br.boell.org/sites/default/files/2020-11/Atlas%20do%20PI%C3%A1stico%20-%20vers%C3%A3o%20digital%20-%2030%20de%20novembro%20de%202020.pdf>. Acesso em: 24 out. 2022.
- CAMPOS, SABRINA SILVA DE. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ATIVOS DE TPS/PBAT ADICIONADOS DE CURCUMINA POR EXTRUSÃO REATIVA**. 2017. TCC (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, [S. l.], 2017
- DE AGUIAR, Luana Orlandi et al. Avaliação das propriedades do biopolímero polihidroxibutirato (PHB) extraído por vermes de Zophobas morio Fabricius. **Revista matéria**, [S. l.], 26 jan. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/vp65zDKRRb5VzvVcQXtcK7D/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 18 out. 2022.
- JONES, Frances. A ameaça dos microplásticos. **Pesquisa FAPESP**, [S. l.], jul. 2019. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/a-ameaca-dos-microplasticos/>. Acesso em: 11 out. 2022.
- LOUREIRO, Amanda Oriani. **BIOPLÁSTICOS E PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS: revisão bibliográfica dos principais materiais e seus impactos ambientais**. 2021. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos) - Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/15259>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- OLIVEIRA, Pamela Rosa. **Modificação de nanopartículas do grupo caulim com óleos essenciais e aplicação em embalagens ativas à base de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/236228/PNAN0002-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 31 out. 2022.
- SOUSA, Yonne Silva e. **Embalagem como ferramenta de marketing: análise do "P" promoção sob a ótica das cores e do design dos produtos**. 2016. 29 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Logística, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2016.2022. Vilar, D. A.; Vilar, M. S. A.; Lima e Moura, T. F. A.; Raffin, F. N.; Oliveira, M. R.; Franco, C. F. O.; Athayde-Filho, P. F.; Diniz, M. F. F. M.; Barbosa-Filho, J. M. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. *The Scientific World Journal*, v. 2014, Article ID 857292, 1 p., 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857292> Acesso em 21/10/2022

Microencapsulação de *Lacticaseibacillus casei* CSL3 por *spray drying* aplicado à simulação do trato gastrointestinal

SARAH KALLI SILVA DA SILVA¹; GUILHERME DA SILVA MENEGAZZI²;
GABRIELA DE QUADROS DA LUZ³; EDUARDO SILVEIRA RIBEIRO⁴;
PATRÍCIA SILVA DIAZ⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – kallisarah01@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ql.gabi@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – guilherme_menegazzi@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – eduardosilveiraribeiro@yahoo.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de produtos que ofereçam uma melhor qualidade de vida e bem-estar às pessoas têm ganhado cada vez mais destaque. Esta intensificação está associada com o aumento da conscientização da população em relação aos alimentos funcionais e seus benefícios à saúde (ZAFAR; PING, 2020). Probióticos são microorganismos vivos capazes de propiciar efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, quando administrado corretamente. Os benefícios incluem desde uma melhora generalizada do sistema imune até evitar e melhorar sintomas específicos de diversas doenças, distúrbios autoimunes e etc. (KANG; IM, 2015).

Dentro desse mercado, um dos maiores desafios com relação a ingestão de probióticos está em garantir uma viabilidade celular acima de 6 log UFC g⁻¹, visando preservar o efeito probiótico do micro-organismo em questão (LIAO et al., 2017). Dentre as alternativas existentes, técnicas como a microencapsulação de bactérias probióticas tem sido empregada com êxito no que se refere à capacidade de proteger e promover o desenvolvimento celular e funcional das células em ambientes diversos (GUL, 2017; SURNIS et al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho visa desenvolver microcápsulas a base de soro de queijo, frutooligossacarídeos e goma xantana a partir da técnica de *spray drying* para a encapsulação do probiótico *Lacticaseibacillus casei* CSL3, assim como analisar a eficiência desses carreadores através da exposição a simulação dos fluidos gastrointestinais.

2. METODOLOGIA

2.1 Condições de cultivo do *L. casei* CSL3

O cultivo de *L. casei* CSL3 foi realizado de acordo com Rosolen et al. (2019). A reativação do micro-organismo ocorreu em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe), a 100 rpm, 37 °C por 24 h em condições anaeróbicas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2370g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado foi

lavado e ressuspenso em água peptonada 0,1% e mantido sob refrigeração a 4 °C.

2.2 Produção de microcápsulas

As microcápsulas foram produzidas utilizando 27% (m/v) de soro de queijo e 3% (m/v) de frutooligossacarídeos ou 27% (m/v) de soro de queijo, 1,5% (m/v) de frutooligossacarídeos e 1,5% (m/v) de goma xantana. Ambas composições foram dissolvidas em água destilada, adicionadas das células do *L. casei* CSL3 e homogeneizadas em agitador térmico. Posteriormente as soluções foram submetidas ao processo de secagem por *spray drying* (LabMaq - MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se como parâmetros operacionais a temperatura de entrada de 100 °C, temperatura do ar de saída de 68 °C, vazão de alimentação de 0,25 L/h e vazão de ar de secagem de 3 m³/min.

2.3 Simulação do trato gastrointestinal

A simulação do trato gastrointestinal foi feito de acordo com Rosolen et al. (2019), avaliando a viabilidade celular durante 60 minutos de exposição aos fluidos gástricos e 240 minutos aos fluidos intestinais. O suco gástrico simulado foi preparado usando 3 mg mL⁻¹ de pepsina da mucosa gástrica suína (Chem Supply, Australia) e solução salina 0,5% (m/v), com pH ajustado com HCl para 2, 2,5 e 3. Para o suco intestinal foi utilizado 1 mg mL⁻¹ de pancreatina (Sigma-Aldrich, EUA), e solução salina 0,5% (m/v), com pH ajustado para 8 utilizando bile bovina (0,5%). Todas as análises foram realizadas em triplicata e as alíquotas foram coletadas para a contagem de células viáveis a partir de diluição seriada e plaqueada em ágar MRS incubadas a 37 °C por 48 h em anaerobiose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da simulação da exposição das microcápsulas aos fluidos do trato gastrointestinal foi possível constatar que as diferentes composições de microcápsulas tiveram desempenhos distintos com relação à preservação da viabilidade celular dos probióticos. A microcápsula feita apenas a partir de soro de queijo e frutooligossacarídeos após simulação dos fluidos gástricos e intestinais não mostrou diferença significativa na viabilidade celular do probiótico *L. casei* CSL3, mantendo sua concentração inicial de 8,6±0,01 log UFC g⁻¹, em todas as soluções testadas. Entretanto, a microcápsula feita a partir dos mesmos constituintes, porém com a adição de goma xantana mostrou comportamento distinto nas diferentes soluções testadas (Tabela 1).

Este resultado pode ser atribuído a presença da goma xantana, que é um polímero polianiónico, principalmente, devido aos resíduos de ácido glicurônico apresentarem pKa~2,9. Logo, no pH do fluido intestinal (8) ocorre a desprotonação dos grupos carboxílicos presentes nestes resíduos, resultando na formação de (COO)⁻ (SANDFORD et al., 1978; SMITH et al., 1981). Essa formação acarreta em uma repulsão eletrostática das cadeias poliméricas e, conseqüentemente pode ter auxiliado na difusão do fluido intestinal para o interior da microcápsula, logo o comprometimento da estrutura da microcápsula acarretou na redução da viabilidade celular comparada a microcápsula formulada sem a goma xantana. Por outro lado, a adição de sais é capaz de

diminuir a repulsão eletrostática entre esses grupos, estabilizando a conformação ordenada da goma xantana, mostrando um melhor desempenho das microcápsulas no fluido intestinal simulado com a presença dos sais biliares. A exposição a altas temperaturas (> 50 °C) é capaz de aumentar a estrutura desordenada e a reatividade da goma xantana, pela aparição de novas interações moleculares, como repulsões eletrostáticas ou interações não específicas (Brunchi et al., 2019). Sendo assim, capaz de explicar de uma maneira geral o menor desempenho das microcápsulas formuladas com goma xantana, devido a exposição às altas temperaturas (100 °C) do processo de *spray drying*, que apesar de possuir como vantagem o baixo tempo de retenção sob essas condições, o mesmo pode ter sido suficiente para acarretar essa mudança conformacional.

	Viabilidade celular	Fluidos gástricos			Fluídos intestinais	
		pH 2	pH 2,5	pH 3	-	sais biliares
SF	8,6±0,01	8,65±0,07	8,65±0,07	8,6	8,59±0,16	8,5±0,28
SFX	8±0,03	6,24±0,33	7,15±0,21	6,62±0,21	6,92±0,1	8

Tabela 1: Viabilidade celular expressa em log UFC g⁻¹ de *L. casei* CSL3 microencapsulado com soro de queijo e frutooligosacarídeos (FS) e soro de queijo, frutooligosacarídeo e goma xantana (FSX) expostos a simulação dos fluidos do trato gastrointestinal.

A nível de comparação Vitola et al. (2020) utilizou uma metodologia semelhante de simulação do trato gastrointestinal para verificar a viabilidade celular do probiótico *L. casei* CSL3 de forma livre, mostrando uma redução da viabilidade celular de 25%, partindo de 10 log UFC g⁻¹ e atingindo 7,54±0,71 log UFC g⁻¹. É importante destacar, que a microcápsula confeccionada apenas com soro de queijo e frutooligosacarídeos foi capaz de preservar a viabilidade celular após a simulação dos fluidos gástricos e intestinais acima de 6 log UFC g⁻¹, sendo essa a mínima necessária para se preservar o efeito probiótico do microorganismo (LIAO et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

Dentre as composições testadas nesse trabalho as microcápsulas compostas a partir de soro de queijo e frutooligosacarídeos obtiveram um desempenho melhor com relação a preservação da viabilidade celular do probiótico *L. casei* CSL3. Como perspectivas futuras, visa-se a caracterização de outros parâmetros relacionados às microcápsulas, assim como sua aplicação em diversas matrizes alimentícias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNCHI, C.; AVADANEI, M.; BERCEA, M.; MORARIU, S. Chain conformation of in solution as influenced by temperature and salt addition. **Journal of Molecular Liquids**. V. 287, p. 111008, 2019.

GUL, O. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.41, n.5, e13198, 2017.

KANG, HJ; IM, SH. Probiotics as an Immune Modulator. **Probiotics**, p. S103-S105, 2015.

LIAO, L.K., WEI, X.Y., GONG, X., Li, J.H., HUANG, T.; XIONG, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 82-89, 2017.

ROSOLEN, M. D.; BORDINI, F. W.; DE OLIVEIRA, P. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; POHNDORF, R. S.; FIORENTINI, A. M.; DA SILVA, W. P.; PIENIZ, S. Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.115, p.108411, 2019.

SANDFORD, P.; PITTSLEY, J. E.; A KNUTSON, A, C.; WATSON, P. R.; CADMUS, C. M. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of Xanthan Products of Differing Pyruvic Acid Content. **Extracellular Microbial Polysaccharides**, v. 45, p. 192-210, 1978.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J.; MORRIS. E. R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.

SURNIS, M. S. A.; HUPARIKAR, M. K. B.; KAMBLE, M. P. A.; MULLA, M. M. I. Microencapsulation of Probiotics (*Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium Longum*) in Pineapple Jam by Spray Drying and its Comparitive Study. **International Journal of Engineering Research**, v.5, n.03, 2016.

VITOLA, H. R. S. et al. *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in Petit Suisse cheese and passage through gastrointestinal transit in vitro. **LWT - Food Science and Technology**, v.127, p.109381, 2020.

ZAFAR, M. U.; PING, Q. Consumers'attitude and preferences of functional food: a qualitative case study. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v.57, n.1, 2020.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE OXADIAZOL *IN VITRO*

ANA PAULA BONATO WILLE¹; CAREN ALINE RAMSON DA FONSECA²;
LUIZA BLOTA CORRÊA³; NELSON LUÍS DE CAMPOS DOMINGUES⁴;
CRISTIANE LUCHESE⁵; ETHEL A. WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – anapaulabonatowille@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – blottaluiza@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – carenramson@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Grande Dourados – nelsondomingues@ufgd.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas (ER) são moléculas instáveis que fazem parte do metabolismo em diversas reações bioquímicas. Quando se encontram em excesso no organismo, as ER causam desequilíbrio na homeostase redox, levando a danos irreversíveis a diversas macromoléculas (LUO et al. 2020).

Nesse contexto, tem se intensificado a busca por novas substâncias que possam minimizar os danos oxidativos decorrentes da superprodução de ER e assim combater/prevenir as patologias envolvidas nesse processo. Os oxadiazóis, importante classe de compostos heterocíclicos, exercem diversas propriedades biológicas, dentre elas antioxidante, anti-inflamatória (EL-DIN et al. 2015), antituberculose e antibacteriana (AHSAN et al. 2011).

Diante disso, considerando os benefícios biológicos dos derivados de oxadiazol e a necessidade de abordagens terapêuticas inovadoras para o combate e prevenção dos danos oxidativos, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antioxidante *in vitro* dos compostos 4-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-ilmetil)anilina (BA12) e 2-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-iltio)anilina (BA13).

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese dos compostos

Os compostos BA12 e BA13 (Figura 1) foram sintetizados pelo Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise da Universidade Federal de Grandes Dourados (UFGD).

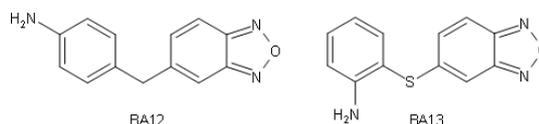


Figura 1. Estrutura química dos compostos 4-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-ilmetil)anilina (BA12) e 2-(benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-iltio)anilina (BA13).

2.2 Atividade *scavenger* do radical 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazil (DPPH)

O método descrito por CHOI et al. (2002) consiste em avaliar a capacidade *scavenger* dos compostos de interesse sobre o radical livre sintético DPPH, através da doação de elétrons e/ou hidrogênio. Para a realização do

ensaio, adicionou-se 1 mL de uma solução de DPPH diluída em etanol a uma alíquota de 10 μ L do composto em diferentes concentrações (1, 5, 10, 50, 100, 200 e 500 μ M). Para o grupo controle, foi utilizado 10 μ L de água destilada. A solução foi incubada durante 30 minutos na ausência de luz. Após esse tempo, a leitura foi realizada espectrofotometricamente a 517 nm e os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

2.3 Atividade *scavenger* do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺)

O ensaio do radical ABTS⁺ foi realizado de acordo com RE et al. (1999). Com este ensaio buscou-se avaliar a capacidade dos compostos em neutralizar o radical livre ABTS⁺ por meio da doação de hidrogênio. Para a realização da técnica, um volume de 1 mL da solução de ABTS⁺ previamente diluída em tampão fosfato de potássio (TFK) foi adicionado a uma alíquota de 10 μ L do composto em diferentes concentrações (1, 5, 10, 50, 100, 200 e 500 μ M). A solução foi incubada durante 30 minutos na ausência de luz. Em seguida, a leitura foi realizada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 734 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

2.4 Níveis de espécies reativas (ER)

Os níveis de ER foram determinados de acordo com LOETCHUTINAT et al. (2005) com intuito de avaliar a capacidade antioxidante dos compostos de interesse. Para a realização do ensaio, adicionou-se a uma alíquota de 10 μ L dos compostos, em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100, 200 e 500 μ M), 50 μ L de homogenato (tecido hepático de camundongos), 2910 μ L do tampão Tris HCl 10 mM, 30 μ L de azida de sódio e 5 μ L de diclorofluoresceína (DCFH). A solução foi incubada a temperatura ambiente, durante 60 minutos, na ausência de luz. A leitura foi realizada fluorimetricamente, sendo a emissão da intensidade de fluorescência registrada em 525 nm e a extinção em 488 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle de fluorescência.

2.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do Software GraphPad Prism 8. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de normalidade omnibus de D'Agostino e Pearson, e os dados foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 revelaram que os compostos BA12 e BA13 não apresentaram atividade *scavenger* do radical DPPH. De fato, ambos os compostos apresentaram absorvância semelhante ao controle em todas as concentrações testadas. Em relação ao radical ABTS⁺, o composto BA12 exerceu atividade sequestrante do radical ABTS⁺ em

concentrações iguais ou superiores a 10 μM , com uma inibição radicalar máxima ($I_{\text{máx}}$) de 87%. Por sua vez, o composto BA13 apresentou atividade sequestradora deste radical nas concentrações de 100 e 200 μM , com $I_{\text{máx}}$ de 59,4%.

Para reforçar as propriedades antioxidantes dos compostos, o ensaio de ER foi realizado. Os resultados demonstraram que ambos os compostos foram eficazes em reduzir os níveis hepáticos de ER a partir da concentração de 1 μM , quando comparados ao grupo controle (Tabelas 1 e 2).

Os ensaios *in vitro* realizados neste estudo são complementares, uma vez que, avaliam a transferência de elétrons, hidrogênio e a capacidade dos compostos em reduzir a produção de ER em tecidos. Sendo assim, por meio destes resultados foi possível ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na ação antioxidante destas moléculas.

Tabela 1. Efeito *in vitro* do composto BA12 na eliminação dos radicais DPPH e ABTS e na formação de ER induzidas por azida de sódio no fígado de camundongos.

Composto BA12			
	DPPH	ABTS	ER
Controle	107,4 \pm 6,0	109,6 \pm 2,2	100 \pm 0,58
Induzido	-	-	117,6 \pm 1,2*
1 μM	100,9 \pm 4,6	108,2 \pm 3,1	94,8 \pm 4,6##
5 μM	105,7 \pm 4,8	97,3 \pm 3,0	-
10 μM	99,6 \pm 3,0	89,4 \pm 2,7**	91,4 \pm 1,7##
50 μM	98,6 \pm 3,3	49,5 \pm 2,2****	89,5 \pm 4,0##
100 μM	99,5 \pm 3,1	33,3 \pm 5,8****	71,7 \pm 4,5****###
200 μM	101,4 \pm 4,6	14,4 \pm 1,8****	55,7 \pm 5,4****###
500 μM	99,1 \pm 3,4	27,8 \pm 2,1****	-
$I_{\text{máx}}$ (%)	-	86,9 \pm 1,8	52,6 \pm 5,4
IC ₅₀ (μM)	-	28,5	88,1

Os dados foram expressos em porcentagem do controle, como média \pm E.P.M para três experimentos independentes, realizados em dias diferentes. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (****) $p < 0.0001$, (**) $p < 0.01$ (*) $p < 0.05$. Hashtags denotam níveis de significância quando comparados ao grupo induzido: (#####) $p < 0.0001$ e (##) $p < 0.01$. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. $I_{\text{máx}}$ = % de inibição máxima. IC₅₀ = concentração (μM) para diminuir 50% da formação do radical DPPH e ABTS⁺.

Tabela 2. Efeito *in vitro* do composto BA13 na eliminação dos radicais DPPH e ABTS⁺ e na formação de ER induzidas por azida de sódio no fígado de camundongos.

Composto BA13			
	DPPH	ABTS	ER
Controle	101,0 \pm 3,5	108,0 \pm 3,7	100,0 \pm 0,58
Induzido	-	-	115,8 \pm 2,3*
1 μM	101,3 \pm 4,0	108,0 \pm 3,8	98,5 \pm 1,3##

5 µM	101,8 ± 4,1	108,6 ± 1,5	-
10 µM	102,4 ± 3,6	102,3 ± 1,3	96,6 ± 1,9##
50 µM	100,8 ± 1,5	73,8 ± 0,9	93,8 ± 1,9##
100 µM	100,1 ± 1,5	55,2 ± 0,9*	82,4 ± 4,2**####
200 µM	100,9 ± 5,0	43,8 ± 1,1**	48,6 ± 4,7***####
500 µM	87,4 ± 12,2	121,2 ± 28,5	-
I_{máx} (%)	-	59,4 ± 1,1	58,0 ± 4,7
IC₅₀ (µM)	-	10,8	111,7

Os dados foram expressos em percentagem do controle, como média ± E.P.M para três experimentos independentes realizados em dias diferentes. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparado ao controle: (****) $p < 0.0001$, (**) $p < 0.01$ (*) $p < 0.05$.

Hashtags denotam níveis de significância quando comparado ao grupo induzido: (####) $p < 0.0001$ e (##) $p < 0.01$. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. I_{máx} = % de inibição máxima. IC₅₀ = concentração (µM) para diminuir 50% da formação do radical DPPH e ABTS⁺.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, pode-se concluir que os compostos BA12 e BA13, em diferentes concentrações, apresentaram atividade *scavenger* do radical ABTS⁺, apesar de não terem sido eficazes no ensaio do radical DPPH. Além disso, os compostos foram capazes de reduzir a geração de ER induzidas pela azida de sódio, a partir da concentração de 1 µM. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar outros mecanismos envolvidos na ação antioxidante desses compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHSAN, M. J.; et al. Molecular properties prediction and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole analogues as potent antimicrobial and antitubercular agent. **Bioinorg. and Med. Chem. Libr.**, v.21, p. 7246, 2011.
- BUBOLS, G.B.; et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini-Rev. in Med. Chem.**, v. 13, p. 318, 2013.
- 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.153, p.1161, 2002.
- EL-DIN, M. M. G.; Synthesis and in vitro antiproliferative activity of new 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing sulfonamide moiety. **Europ. Jour. of Med. Chem.**, v.90, p. 45, 2015.
- LOETCHUTINAT, C.; et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2,7-DCFH assay. **Radiat. Phys. Chem.**, v.72, p. 323, 2005.
- LUO, J.; et al. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next?. **Ageing res. Rev.**, v. 57, p. 100982, 2020.
- RE, R.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

EFEITO DO TRATAMENTO COM TIAZOLIDINONA SOBRE O CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

TAYNÁ AMARAL VELEDA¹; FERNANDO LOPEZ ALVEZ²;
MAYARA SOARES DE AGUIAR³; DANIEL SCHUCH DA SILVA⁴; WILSON CUNICO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – taynaaveleda@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – wicunico@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação pode ser definida como uma resposta celular do sistema nervoso central (SNC) (STEVENSON et al., 2020) frente a injúrias agudas, como traumas, e também em condições crônicas, como nas doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA). O processo neuroinflamatório é mediado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e outros fatores liberados pelas células da glia, em especial astrócitos e micróglia (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017; STEVENSON et al., 2020).

Além de a neuroinflamação ser um evento presente nas doenças neurodegenerativas, é observado a perda de peso pelos indivíduos acometidos por essas patologias, o que contribui para morbidade e mortalidade desses pacientes. Embora seja um evento multifatorial, a perda de peso tem como fatores principais os efeitos adversos aos medicamentos, a perda de cognição ou coordenação motora e, relacionado diretamente à neuroinflamação devido aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias que induzem tanto um aumento do catabolismo quanto uma redução do consumo alimentar (AZIZ et al., 2008). Logo, é necessária a prospecção de compostos que permitam conduzir essa resposta, protegendo de alterações indesejadas, associadas a perda de peso na neuroinflamação (WELCOME, 2020).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido presente nas membranas de bactérias gram-negativas com capacidade de, seja administrado centralmente ou periféricamente, danificar a barreira cérebro-sangue e induzir um estado de neuroinflamação ao ligar-se ao receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (WHITFIELD; WILLIAMS; KELLY, 2020). Devido à sua capacidade de induzir a neuroinflamação em modelos *in vivo* bem como provocar outros efeitos observados nas doenças neurodegenerativas, como a anorexia, o LPS é um

agente confiável para o estudo dessa resposta do SNC (BATISTA et al., 2019; OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006).

As tiazolidinonas são uma classe de compostos sintéticos que apresentam um grupo farmacóforo de um anel heterocíclico contendo enxofre, nitrogênio e cetona (KAUR MANJAL et al., 2017). Previamente, compostos derivados de tiazolidin-4-ona apresentaram uma capacidade de atenuar a neuroinflamação por LPS em modelo *in vitro* (ALVEZ et al., 2022) e também em modelo *in vivo* de amnésia por escopolamina (DA SILVA et al., 2021). O presente trabalho, portanto, objetivou avaliar os efeitos do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona (DS12) no consumo alimentar e ganho de peso de camundongos expostos ao LPS.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos e protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA 038629/2021-13). O composto DS12 foi sintetizado de acordo com (DA SILVA et al., 2016) e estrutura foi confirmada por CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C. O LPS (10 mg, O55:B5) foi adquirido da SigmaAldrich.

Para o protocolo, foram utilizados camundongos Swiss de 60 dias, mantidos a temperatura de 22 ±1 °C, ciclo de luz/escuro de 12/12 h e umidade 50 a 60%. Os animais foram divididos em quatro grupos, tratados por 7 dias consecutivos: Controle (solução salina via intraperitoneal (i.p.) e óleo de canola via gavagem (gv.)); LPS (250 µg/kg via i.p. e canola via gv.); DS12 5 mg/kg (LPS 250 µg/kg via i.p. e DS12 5 mg/kg via gv.); e DS12 10 mg/kg (LPS 250 µg/kg via i.p. e DS12 10 mg/kg via gv.). O peso de cada animal foi aferido no dia anterior aos tratamentos (dia 0), no 3º dia e no último dia dos tratamentos. Para o consumo alimentar, era anotada o valor de ração presente na caixa e, no dia seguinte, em mesmo horário, era pesada a ração presente. A diferença resultante era ajustada pelo número de animais na caixa. A variação do ganho de peso foi estimada pela diferença do peso corporal do dia 0 e último dia de tratamento. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni no software GraphPad. Uma significância estatística foi considerada quando P<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo alimentar do grupo LPS foi significativamente reduzido, em relação ao consumo do grupo controle (P<0,001). Essa redução foi observada nos grupos tratados (Figura 1A). A diminuição na alimentação corrobora a anorexia provocada pelo LPS descrita na literatura (OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006).

Como demonstrado na Figura 1B, os animais que receberam LPS apresentaram uma perda de peso já no dia seguinte da primeira administração

do LPS. E ao final do tratamento, pode-se observar uma redução significativa do ganho de peso corporal no grupo LPS em relação ao grupo controle ($P < 0.01$). E o tratamento com a DS12 não foi capaz de proteger contra essa perda de peso ($P > 0.05$) (Figura 1C). O LPS liga-se ao TLR4, induzindo a anorexia e expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1β (IL- 1β), que media a produção de leptina, responsável pela saciedade do animal (FAGGIONI et al., 1998; OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006). É possível que o período de anorexia seja um fator preponderante e, reduzindo os níveis de leptina, o animal retorne os níveis de consumo alimentar.

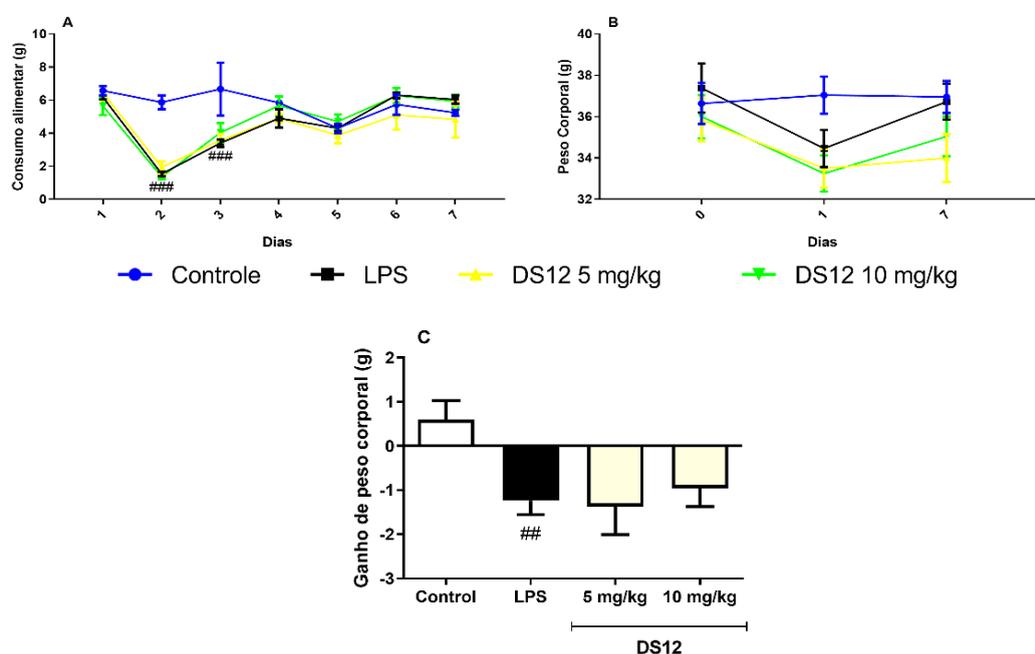


Figura 1. Valores da média de consumo alimentar, média de peso corporal e ganho de peso corporal total de camundongos controle, tratados com LPS e tratados com LPS e DS12 (N = 6 animais). ##, ### Estatisticamente diferente do grupo controle ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se o papel de uma tiazolidin-4-ona, a DS12, em um modelo de neuroinflamação *in vivo* por LPS. Em trabalhos prévios, o composto teve resultados positivos em modelo de perda de memória (DA SILVA et al., 2021), um sintoma característico da DA. Entretanto, ainda não haviam sido avaliados os efeitos dessa molécula sobre a alimentação e o ganho de peso em nenhum modelo animal.

Apesar de os presentes resultados não indicarem uma reversão dos efeitos causados pelo LPS, eles não indicam que o tratamento piore o quadro de perda de peso. Dessa forma, o composto ainda sustenta um potencial uso

na terapêutica da neuroinflamação, embora estudos mais direcionados possam elucidar se o composto afeta de algum modo o consumo energético corporal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEZ, F. L. et al. Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide—Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. n/a, n. n/a, 15 jan. 2022.
- AZIZ, N. A. et al. Weight loss in neurodegenerative disorders. **Journal of Neurology**, v. 255, n. 12, p. 1872–1880, 2008.
- BATISTA, C. R. A. et al. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.
- DA SILVA, D. S. et al. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 574–582, 2016.
- DA SILVA, D. S. et al. Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1554–1566, 2021.
- FAGGIONI, R. et al. Il-1 β mediates leptin induction during inflammation. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 1 43-1, p. 204–208, 1998.
- KAUR MANJAL, S. et al. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 406–423, 2017.
- OGIMOTO, K.; HARRIS, M. K.; WISSE, B. E. MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β . **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4445–4453, 2006.
- STEVENSON, R. et al. Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. August, p.1–23, 2020.
- WELCOME, M. O. Neuroinflammation in CNS diseases: Molecular mechanisms and the therapeutic potential of plant derived bioactive molecules. **PharmaNutrition**, v. 11, p. 100176, 2020.
- WHITFIELD, C.; WILLIAMS, D. M.; KELLY, S. D. Lipopolysaccharide O-antigens-bacterial glycans made to measure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 31, p. 10593–10609, 2020.

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE *Iridea cordata* NA FASE CISTOCÁRPICA DE DESENVOLVIMENTO CONTRA *Trichomonas vaginalis*

HENRIQUE GONÇALVES PEGORARO¹; TALLYSON NOGUEIRA BARBOSA²;
ÂNGELA SENA-LOPES³; CLÁUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁴; SIBELE
BORSUK⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – henrique.pegoraro2@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tallyson_n_b@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angelasena@ymail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças sexualmente transmissíveis não-virais, a tricomoníase, destaca-se por possuir uma alta taxa de transmissão (ALVES et al, 2020), tendo como agente, o *Trichomonas vaginalis*, um protozoário unicelular flagelado que infecta a região urogenital, aderindo-se as células epiteliais genitais (MERCER; JOHNSON, 2018). Em mulheres, esta doença apresenta diversos sintomas, tais como vaginite, cervicite, infertilidade e suscetibilidade a infecção por HIV. Por sua vez, em homens, esta doença apresenta-se majoritariamente assintomática, mas quando sintomáticos, observa-se a presença de prostatite e inflamação na uretra (EDWARDS et al, 2016).

O principal tratamento empregado para esta enfermidade, é a utilização do metronidazol (MTZ), um composto pertencente à família dos 5-nitroimidazol, que atua no material genético do parasito (MENDES et al, 2020). Apesar de possuir eficácia comprovada, efeitos colaterais, como inchaço, febre, reações alérgicas e eritema já foram observados em indivíduos utilizando este medicamento (SINGH et al, 2019), além do surgimento de isolados resistentes a este composto (OZPINAR et al, 2019).

Visto isso, é necessário a busca por novos produtos para o tratamento da tricomoníase, neste cenário, destacam-se as macroalgas. Organismos fontes de bioativos que já demonstraram ser candidatos promissores para pesquisa científica (MEKINIĆ et al, 2019). A capacidade das macroalgas de se desenvolverem nos mais diferentes tipos de ambientes (HO, 2020), colabora para o desenvolvimento de compostos moleculares complexos, com capacidade de interagir com diversos receptores celulares dos organismos vivos, inibindo ou promovendo certos efeitos biológicos, competindo pela ligação de receptores celulares e interferindo com macromoléculas (BESEDNOVA et al, 2021). Fazendo com que estes organismos sejam considerados excelentes fontes de compostos bioativos para a síntese de biofármacos.

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade tricomonocida do extrato lipídico de *Iridea cordata*, uma macroalga subantártica, em sua fase cistocárpica de desenvolvimento na inibição do *Trichomonas vaginalis*.

2. METODOLOGIA

A coleta de amostras de *Iridea cordata* foi efetuada de forma manual na região de Punta Arena (Latitude: $-53,1667$, Longitude: $-70,9333$ $53^{\circ} 10' 0''$ Sul, $70^{\circ} 55' 60''$ Oeste).

A extração dos ácidos graxos das amostras foi efetuada pelo método relatado por Bligh e Dyer (B&D). Uma mistura com 20 mL de etanol, 10 mL de clorofórmio, 10 mL de 1,5% solução aquosa de sulfato de sódio e 1 g de biomassa foram agitadas constantemente a temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras então foram colocadas em tubos e centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos, e a camada mais baixa de fase orgânica foi coletada e secada sob pressão reduzida.

Os isolados de *T. vaginalis* foram cultivados em meio triptona – extrato de levedura – maltose (TYM) sem ágar e suplementados com soro bovino adulto estéril 10% (SBS) e incubados a 37°C .

A ação anti-*T. vaginalis* induzida pela fase cistocárpica (IFC) do extrato lipídico foi avaliado de acordo com SENA-LOPES et al (2017). O extrato foi considerado para uso com uma viabilidade de 95%, baseando-se na análise da motilidade, morfologia, e um teste de exclusão com azul de trypan (0,4%) por microscopia ótica. Para avaliar o MIC (concentração mínima inibitória) e IC50 (50% de concentração inibitória), o teste foi efetutado em placas de 96 poços. Os parasitos foram inseridos a uma densidade inicial de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/mL de TYM e incubado com IFC diluído em DMSO (0,6%). Os extratos lipídicos foram então avaliados em concentrações de 600 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ e 37,5 $\mu\text{g/mL}$. Três controles foram utilizados: controle negativo (somente trofozoítos), controle positivo (100 μM MTZ) e controle para o veículo utilizado para a solubilização do extrato de IFC (DMSO 0,6%). As placas foram então incubadas a 37°C em 5% CO_2 por 24 h. Após incubação, foi realizado a contagem dos trofozoítos através da análise pelo azul de trypan (0,4%) em câmara de Neubauer para determinar o MIC e IC50, considerando motilidade, morfologia e viabilidade dos trofozoítos.

Os parasitos tratados com o extrato em concentração de MIC, assim como os controles, foram usados no ensaio para avaliar a curva cinética de crescimento dos trofozoítos. As amostras foram então incubadas em eppendorfs contendo 1,5 mL de meio TYM com SBS e antibióticos a 37°C , e a contagem foi efetuada em câmara de Neubauer a 1, 6, 12, 24, 48, 72, e 96 h pelo teste de exclusão com azul de trypan (0,4%).

Todos os ensaios foram realizados independentemente três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como o percentual de parasitos viáveis em comparação com parasitos não viáveis. Os resultados foram analisados estatisticamente usando análise de variância unidirecional (ANOVA) com valor de $p < 0,05$ sendo considerado estatisticamente significativo. Tukey's foi aplicado para comparar as viabilidades médias de diferentes tratamentos. O programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 para O Windows (GraphPad Software, EUA) será usado para a análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato lipídico IFC a uma concentração de 600 µg/mL reduziu a viabilidade dos trofozoítos em 97% após 24 h de exposição (Figura 1), sendo considerado como o MIC do extrato.

O valor de IC50 ficou estabelecido a uma concentração de 300 µg/mL. No controle negativo e de 0,6% DMSO os trofozoítos possuíam motilidade e não coraram com azul de trypan. O controle positivo com MTZ, por outro lado, diminuiu a viabilidade dos parasitos, demonstrando perda de motilidade e coloração efetiva com azul de trypan após 24h de exposição (Figura 1).

Na curva cinética se foi observado que uma concentração de 600 µg/mL de IFC reduziu o crescimento dos trofozoítos em 45% em 12 h de exposição, sem diferença significativa comparada com o controle positivo de MTZ após 24 h (Figura 2).

Figura 1. Determinação dos valores de MIC e IC50 do IFC contra *T. vaginalis*.

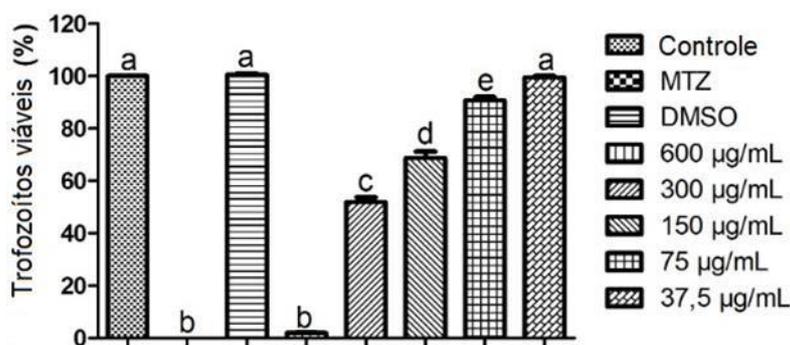
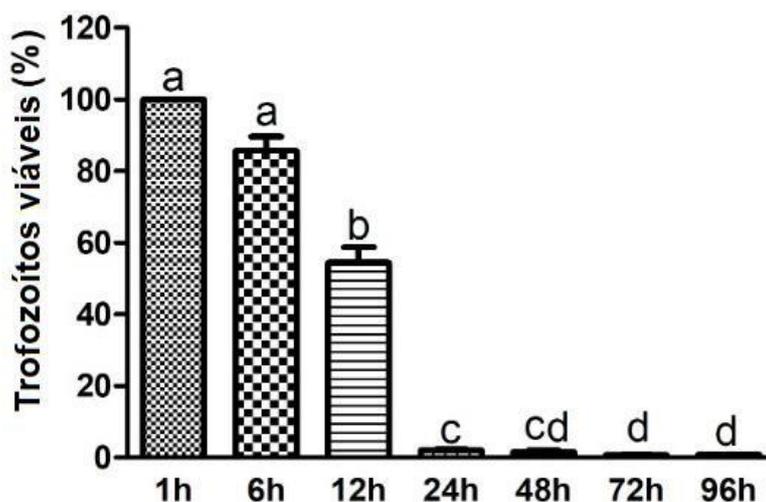


Figura 2. Curva cinética de *T. vaginalis* com 600 µg/mL de IFC



A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível que impacta significativamente a saúde pública global, fazendo com que, haja uma necessidade de se investigar novas fontes promissoras no combate a esta infecção parasitária. Os resultados aqui apresentados, indicaram uma atividade antiparasitária do extrato

de *Irídea cordata*, significativa quando comparado ao grupo tratado com MTZ, fármaco comercialmente disponível para o tratamento desta doença.

Os efeitos antiparasitários de fontes naturais já foram relatados na literatura. O óleo de *Polyalthia longifolia*, também conhecido como árvore mastro, já demonstrou uma inibição de 80,8% do protozoário *Toxoplasma gondii* (ATOLANI et al, 2019). Além disso, extratos de esponjas marinhas mostraram ação inibitória contra espécies de *Leishmania* por inibir as formas amastigota e promastigota deste parasito (MAYER et al., 2021), o que corrobora com os resultados aqui observados, prospectando assim o desenvolvimento de bioprodutos, para o controle das infecções parasitárias tais como a tricomoníase.

4. CONCLUSÕES

O extrato de *Irídea cordata* na fase cistocárpica de desenvolvimento demonstrou atividade antiparasitária considerável comparado aos controles, podendo ser empregado em produtos farmacológicos oriundos de fontes naturais oferecendo novas perspectivas sobre extratos naturais de fontes marinhas como opções viáveis para o tratamento da tricomoníase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, M. S. D. et al. Antiparasitic activity of furanylN-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: In vitro and in silico analyses. **Parasites and Vectors**, v.13, p.1–13, 2020.
2. AQUINO, M. F. K. de, HINDERFELD, A. S. & Simoes-Barbosa, A. *Trichomonas vaginalis*. **Trends Parasitol**, v.36, p.646–647, 2020.
3. ATOLANI, O. et al. Chemical composition, antioxidant, anti-lipoxygenase, antimicrobial, anti-parasite and cytotoxic activities of *Polyalthia longifolia* seed oil. **Med. Chem. Res**, v.28, p.515–527, 2019.
4. BESEDNOVA, N. N. et al. Antiparasitic effects of sulfated polysaccharides from marine hydrobionts. **Mar. Drugs**, v.19, p.1–25, 2021.
5. EDWARDS, T., BURKE, P., SMALLEY, H., & HOBBS, G. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical reviews in microbiology**, v.42, p.406-417, 2016.
6. HO, C. L. Comparative genomics reveals differences in algal galactan biosynthesis and related pathways in early and late diverging red algae. **Genomics**, v.112, p.1536–1544, 2020.
7. LEITSCH, D. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. **Parasitology**, p.1167-1178, 2019.
8. MAYER, A., GUERRERO, A. J., RODRÍGUEZ, A. D., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., NAKAMURA, F., & FUSETANI, N. Marine Pharmacology in 2016-2017: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine drugs**, v.19, p.49, 2021.
9. MEKINIĆ, I. G. et al. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. **Biomolecules**, v.9, 2019.

Efeitos moleculares da exposição de *Odontesthes humensis* (de Buen, 1953) frente a exposição à herbicida a base de glifosato

LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS¹; MARIANA NASCIMENTO CAVALCANTI²; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – luanafvreis@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – marianabiotech@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – laisdsantosg@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – williamwwe@yahoo.com.br

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – amandaweege98@gmail.com

³Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A preocupação da sociedade com a poluição ambiental vem crescendo no decorrer do século 21, em especial pelo ambiente aquático, devido a sua exposição a substâncias como agrotóxicos, compostos orgânicos, metais pesados, entre outros (BURGOS-ACEVES et al., 2018).

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de agrotóxicos no mundo, além disso, nos últimos dez anos o mercado brasileiro de agrotóxicos aumentou em 190% (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018; INCA, 2018). Os herbicidas à base de glifosato são amplamente utilizados devido a sua alta eficiência, atualmente, a formulação mais conhecida é o Roundup Transorb® (RDT) (Monsanto, Saint Louis, MO, EUA). Ecossistemas aquáticos podem ser expostos ao RDT durante o processo de pulverização das plantações, fazendo com que as substâncias se depositem na superfície do solo e, conseqüentemente, atinja corpos d'água pelo processo de lixiviação (WAGNER et al., 2013).

A espécie *Odontesthes humensis* (*O. humensis*) habita em abundância as lagoas costeiras do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, e é de extrema relevância para a economia dessas regiões, devido à comercialização, produção de carne e pesca esportiva (ZEBRAL et al., 2017) Além disso, a espécie vem despertando o interesse de diversos pesquisadores, pois possui características que a torna um excelente biomodelo para análises sobre a qualidade aquática (SILVEIRA et al., 2018; 2019). Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da exposição do RDT sobre a expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo por PCR em tempo real em tecido branquial de *O. humensis*.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta dos animais, desenho experimental e coleta de tecidos

Para este experimento foram coletados ovos da natureza do peixe da espécie *Odontesthes humensis* (Arroio Grande, Brasil). Os espécimes nasceram em cativeiro e tinham 1,5 ano de idade no início do experimento. Após quatro semanas de aclimação, os peixes foram divididos em quatro grupos experimentais expostos ao RDT durante 24 horas em diferentes concentrações, de 2 e 4 mg.L⁻¹ e um grupo

controle, sem a exposição ao herbicida. No final do período de exposição os peixes foram anestesiados e eutanasiados e em seguida os tecidos de interesse foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal na Universidade Federal de Pelotas (CEEA UFPel 23110.007018/2015-85).

2.2. Extração de RNA, síntese de cDNA, clonagem molecular e sequenciamento

A extração de RNA do tecido das brânquias foi realizada utilizando o kit comercial RNEasy (Qiagen, EUA), seguido da síntese de DNA complementar (cDNA) e por fim, estocadas a -20°C .

Os genes escolhidos e analisados neste experimento foram: superóxido dismutase (*sod1*), anidrase carbônica (*ca1*); glutationa peroxidase (*gpx1*); subunidade 2 da NADH desidrogenase (*nd2*); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) e catalase (*cat*). A clonagem molecular por meio de PCR convencional foi realizada utilizando *primers* desenhados com base na sequência nucleotídica dos genes de interesse em espécies filogeneticamente próximas a *O. humensis*. Uma vez amplificados, os fragmentos dos genes de interesse foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger automatizado (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer®, Life Technologies, EUA) no Laboratório de Genômica Estrutural - Biotecnologia UFPel.

2.3. Análise da expressão gênica e análise estatística

A análise de expressão dos genes de interesse foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). O método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ foi utilizado para identificar a modulação da expressão dos genes e o gene Histona (*h3a*) foi utilizado como normalizador. Os parâmetros avaliados, que apresentaram distribuição normal e variância homogênea, foram avaliados por ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Clonagem e sequenciamento molecular

A clonagem do fragmento dos genes *ca1*, *cat*, *gpx1*, *nd2* e *sod1* foi realizada com sucesso. O sequenciamento possibilitou o depósito das sequências gênicas no banco de dados do GenBank® sob número de acesso, respectivamente, KX035017, KX184718.1, KX060036, KX184716.1 e KX184717.1.

3.2. Análise de expressão gênica nas brânquias

A concentração real de glifosato na água com RDT (expressa em GAE) foi medida a partir das amostras de água coletadas de cada tanque. Os animais expostos a $3,68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (GAE) de RDT exibiram maior expressão do RNA mensageiro (mRNA) *ca1* nas brânquias ($p < 0,05$) em comparação com os animais do grupo controle (Fig. 1A). A expressão relativa de mRNA de *cat*, *gpx1b* e *sod1*

nas brânquias dos peixes expostos a 2,07 e 3,68 mg L⁻¹ (GAE) de RDT também foi maior ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (Fig. 1B, C e E). A expressão do *nd2* nas brânquias foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos peixes expostos a 2,07 mg L⁻¹ (GAE) de RDT (Fig. 1D).

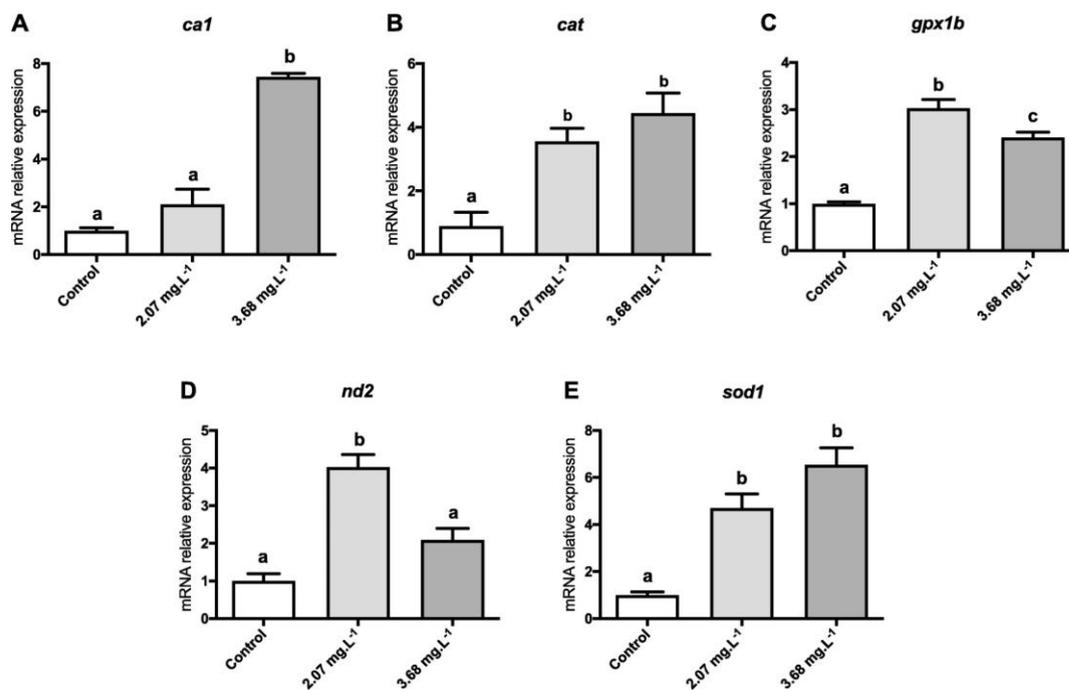


Figura 1 - Expressões gênicas em brânquias de *O. humensis* mantidas em condições de controle e expostas a 2,07 e 3,68mg.L⁻¹ (GAE) de RDT por 24 h. A expressão relativa de mRNA de *ca1* (A); *cat* (B); *gpx1* (C); *nd2* (D) e *sod1* (E) avaliados por qPCR e normalizado com o gene *h3a*. Os valores são expressos como a média e o erro padrão da média (Média \pm SEM). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (ANOVA one-way; $n = 8$; $p < 0,05$).

Nos peixes, as brânquias são um órgão multifuncional de extrema importância, principalmente porque é o primeiro órgão a entrar em contato direto com os poluentes aquáticos e filtrá-los (PANDEY et al., 2008). Entendendo isso, a expressão relativa dos genes *ca1* e *gpx1* estavam aumentados e esse resultado corrobora dados da literatura, em que ocorre um aumento da expressão destes genes nas brânquias de carpa comum, após a exposição por glifosato com formulações contendo POEA. Podendo ainda, esse parâmetro ser uma resposta de estresse induzido pelo agrotóxico, uma vez que essas enzimas *cat* e *gpx1* são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio (O₂) (MA et al., 2019). O aumento da expressão relativa dos gene *ca1* e a diminuição da expressão relativa do gene *nd2* pode ser um indicativo de estresse causado pela exposição aguda ao RDT, porque estudo recentes sugerem que o *ca1* desempenha um mecanismo de importância contra danos oxidativos (SCANDALIOS, 2005; VELASQUES et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, as exposições ao agrotóxico RDT causaram alterações biológicas, mesmo na menor concentração exposta aos peixes, como estresse oxidativo e a modulação de genes do sistema antioxidante enzimático. Esse resultado é extremamente importante e preocupante, isto porque a presença deste herbicida em corpos d' água é constante na região sul, devido ao uso indiscriminado desses agrotóxicos em monoculturas de arroz e soja, que por ventura acabam afetando negativamente todo um ecossistema aquático.

Com isso, este trabalho proporciona o desenvolvimento de teste de toxicidade e a atuação desses genes como biomarcadores de toxicidade para assim estabelecer limites permitidos para o uso desses agroquímicos e a avaliação dos seus efeitos em toda a fauna exposta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURGOS-ACEVES, M. A. et al. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 995–1000, fev. 2018.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Nota pública acerca do posicionamento do Instituto Nacional de Câncer sobre o Projeto de Lei nº 6.299/2002**. INCA, Rio de Janeiro, 11 mai, 2018. Acessado em 28 Out. 2022. Online. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/nota-publica-inca-pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.

MA, Junguo et al. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. **Environmental pollution**, v. 252, p. 1288-1300, 2019.

PANDEY, Suwarna et al. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-biological interactions**, v. 174, n. 3, p. 183-192, 2008.

SILVEIRA, Tony et al. Roundup® herbicide decreases quality parameters of spermatozoa of silversides *Odontesthes humensis*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 1, p. 1-6, 2019.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

VELASQUES, Robson Rabelo; SANDRINI, Juliana Zomer; DA ROSA, Carlos Eduardo. Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. **Zebrafish**, v. 13, n. 5, p. 432-441, 2016.

WAGNER, Norman et al. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1688-1700, 2013.

ZEBRAL, Yuri Dornelles et al. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**, v. 185, p. 860-867, 2017.