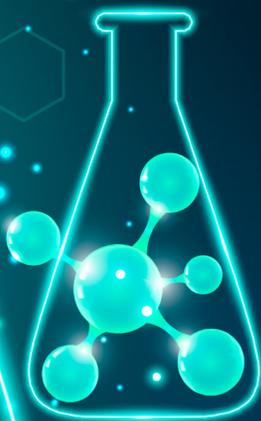


**Atena**  
Editora  
Ano 2021

# A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

**Clécio Danilo Dias da Silva  
Daniele Bezerra dos Santos  
(Organizadores)**

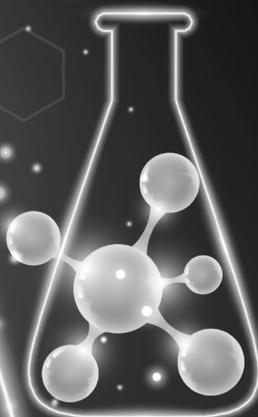
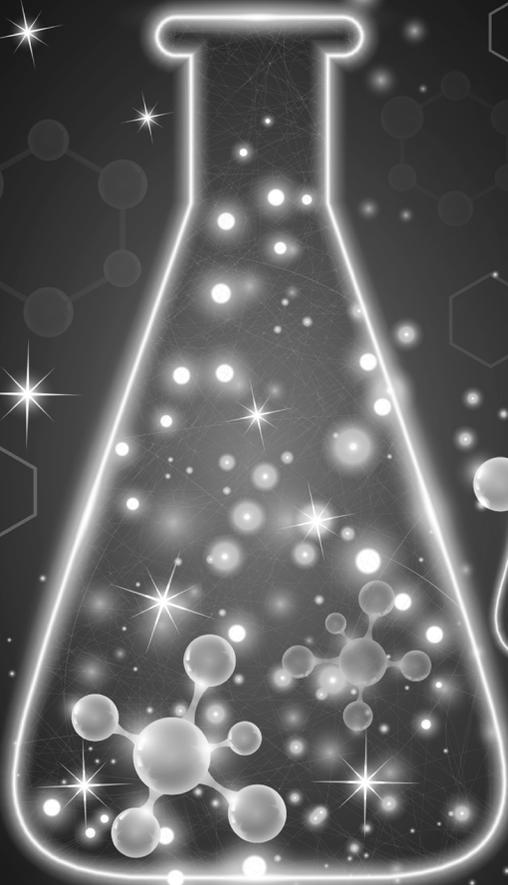


**Atena**  
Editora

Ano 2021

# **A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2**

**Clécio Danilo Dias da Silva  
Daniele Bezerra dos Santos  
(Organizadores)**



### **Editora Chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

### **Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

### **Bibliotecária**

Janaina Ramos

### **Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

### **Imagens da Capa**

Shutterstock

### **Edição de Arte**

Luiza Alves Batista

### **Revisão**

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ivone Goulart Lopes – Instituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfnas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Linguística, Letras e Artes**

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí  
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais  
Prof. Me. Alexandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar

Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein  
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará  
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social  
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia  
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR

Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo  
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
Prof<sup>a</sup> Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa  
Prof<sup>a</sup> Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba  
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Prof<sup>a</sup> Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Prof<sup>a</sup> Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof<sup>a</sup> Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
Prof<sup>a</sup> Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

## A estruturação e reconhecimento das ciências biológicas na contemporaneidade 2

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecária:** Janaina Ramos  
**Diagramação:** Maria Alice Pinheiro  
**Correção:** Mariane Aparecida Freitas  
**Edição de Arte:** Luiza Alves Batista  
**Revisão:** Os Autores  
**Organizadores:** Clécio Danilo Dias da Silva  
Daniele Bezerra dos Santos

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E82 A estruturação e reconhecimento das ciências biológicas na contemporaneidade 2 / Organizadores Clécio Danilo Dias da Silva, Daniele Bezerra dos Santos. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-954-7

DOI 10.22533/at.ed.547210104

1 Ciências Biológicas. I. Silva, Clécio Danilo Dias da (Organizador). II. Santos, Daniele Bezerra dos (Organizadora). III. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**

Ponta Grossa – Paraná – Brasil  
Telefone: +55 (42) 3323-5493

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

contato@atenaeditora.com.br

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

## APRESENTAÇÃO

A coleção **“A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade”** da Atena Editora é uma obra composta de dois volumes e refere-se a uma série de investigações e contribuições nas áreas das Ciências Biológicas e que se fundamentam na discussão científica e em trabalhos categorizados e interdisciplinares desenvolvidos por autores de vários segmentos, potencializando discussões e abordagens contemporâneas em temas variados das Ciências Biológicas. Assim, a coleção é para todos os profissionais pertencentes às Ciências Biológicas e suas áreas afins, especialmente aqueles com atuação no ambiente acadêmico e/ou profissional. Cada volume foi organizado de modo a permitir que sua leitura seja conduzida de forma simples e com destaque por área da Biologia, onde os capítulos podem ser lidos na ordem que você desejar e de acordo com sua necessidade.

O **Volume I – “Meio Ambiente e Biodiversidade”**, através dos seus 16 capítulos aborda a heterogeneidade e aplicação de conceitos nas áreas de meio ambiente, ecologia, sustentabilidade, botânica, micologia e zoologia, como levantamentos/inventários e discussões sobre a importância da biodiversidade e do conhecimento popular sobre as espécies. As temáticas exploradas neste volume são de grande relevância, pois apesar da preocupação com a biodiversidade e com o estado do meio ambiente não ser recente, sabe-se que foi nas últimas décadas do século XX que essa temática entrou definitivamente no discurso dos cidadãos, na sociedade civil, na agenda dos governos, na imprensa e ganhou as ruas. No entanto, se observa que essa preocupação ainda não se transformou efetivamente em práticas educativas, administrativas e operacionais efetivas, o que coloca em risco todos os seres vivos e recursos naturais. Desta forma, o volume I procura auxiliar a realização de trabalhos nestas áreas e no entendimento e desenvolvimento de práticas que podem ser adotadas no âmbito da educação, em espaços formais e não formais de ensino, para o meio ambiente e manutenção da biodiversidade de forma de compreender, refletir, responder e/ou minimizar os graves problemas ambientais.

O **Volume II – “Saúde e Biotecnologia”**, reúne 18 capítulos que apresenta de forma categorizada discussões e estudos desenvolvidos em diversas instituições de ensino e pesquisa do país, que apresentam resultados bem fundamentados de trabalhos de experimentos laboratoriais, de campo e de revisão de literatura realizados por diversos professores, pesquisadores, graduandos, e pós-graduandos, cujas pesquisas serão apresentadas de maneira objetiva e didática. A produção científica no campo da Saúde e da Biotecnologia é ampla, complexa e interdisciplinar. Portanto, os capítulos que compõem este volume refletem essa diversidade de olhares.

Assim, o resultado dessa experiência, que se traduz nos dois volumes organizados, objetiva apresentar ao leitor a complexidade e a diversidade de questões e dimensões inerentes as áreas de Meio Ambiente, Biodiversidade, Saúde e Biotecnologia, como pilares

estruturantes das Ciências Biológicas na contemporaneidade. Por fim, esperamos que a leitura aqui proposta possa disseminar e apoiar a construção novos estudos, saberes e práticas pautadas no reconhecimento da importância dos seres vivos e dos recursos naturais, com uma visão multidimensional para a saúde planetária e para o enriquecimento de novas atitudes e práticas multiprofissionais nas Ciências Biológicas.

Boa leitura!

Clécio Danilo Dias da Silva  
Daniele Bezerra dos Santos

# SAÚDE E BIOTECNOLOGIA

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

#### **AVALIAÇÃO DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO *ASPERGILLUS ACULEATUS***

Amanda Farias de Vasconcelos  
Michel Nasser Corrêa Lima Chamy  
Ana Beatriz Pereira Lelis da Costa  
Bianca Kynseng Barbosa da Silva Costa  
Uatyla de Oliveira Lima  
Alexandre Coli Dal Prá  
Renato dos Santos Reis  
Ricardo Gomes de Brito

**DOI 10.22533/at.ed.5472101041**

### **CAPÍTULO 2..... 14**

#### **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SOLVENTE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE LARVAS DE *TOXOCARA CANIS***

Débora Carvalho Rodrigues  
Débora Liliane Walcher  
Carolina Neto Oliveira da Cunha  
Gabriela Torres Mattos  
Nicholas Frota Gonçalves Correia de Souza  
Luciana Farias da Costa de Avila  
Daniela Fernandes Ramos  
Carlos James Scaini

**DOI 10.22533/at.ed.5472101042**

### **CAPÍTULO 3..... 19**

#### **AÇÕES DA EXPOSIÇÃO AO BISFENOL-A SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS NA PÓS-MENOPAUSA ALIMENTADAS COM DIETA NORMO OU HIPERLIPÍDICA**

Janaina de Oliveira Chaves  
Kênia Moreno de Oliveira  
Letícia de Souza Figueiredo  
Gésily de Souza Aguiar  
Israelle Netto Freitas  
Cremilda do Amaral Roso de Oliveira  
Vanessa Kiill Rios  
Rosane Aparecida Ribeiro  
Helene Nara Henriques Blanc

**DOI 10.22533/at.ed.5472101043**

**CAPÍTULO 4.....33**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE VITEX AGNUS-CASTUS L. (LAMIACEAE)**

Regiane Gonçalves  
Vanessa Farias dos Santos Ayres  
Carlos Eduardo de Carvalho  
Maria Gorete Mendes de Souza  
Anderson Cavalcante Guimarães  
Geone Maia Corrêa  
Carlos Henrique Gomes Martins  
Renata Takeara  
Eliane de Oliveira Silva  
Antônio Eduardo Miller Crotti

**DOI 10.22533/at.ed.5472101044**

**CAPÍTULO 5.....44**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Salmonella* spp. NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS**

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva  
Vanessa Silva Miranda  
Nayane Lopes Ferreira  
Laressa Dacle Tomaz  
Vitor Simão da Silva  
Karina Santos Silva

**DOI 10.22533/at.ed.5472101045**

**CAPÍTULO 6.....55**

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO *CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING* NA CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS**

Nicole Dalonso

**DOI 10.22533/at.ed.5472101046**

**CAPÍTULO 7.....67**

**ANÁLISE DA CITOGENOTOXICIDADE DAS INFUSÕES DE *ARTEMISIA VULGARIS* L. UTILIZANDO O BIOENSAIO *ALLIUM* CEPA**

Claudia de Faria Leal  
Lília Rosário Ribeiro  
Daiane Maria de Almeida

**DOI 10.22533/at.ed.5472101047**

**CAPÍTULO 8.....74**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *PSEUDOBOMBAX MARGINATUM* (A.ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS**

Nathália Amorim Madeiro dos Santos  
Juciana Freitas da Silva  
Tiago Pinheiro de Souza  
Heryka Myrna Maia Ramalho

**DOI 10.22533/at.ed.5472101048**

**CAPÍTULO 9..... 84**

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HIF-1 $\alpha$  EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL**

Beatriz da Silva Vimercati  
Sara de Oliveira Evaristo  
Maria Eliza Soares Queiroz  
Mayara Mota de Oliveira  
Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis  
Aline Ribeiro Borçoi  
Rafael Pereira de Souza  
Anderson Barros Archanjo  
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

**DOI 10.22533/at.ed.5472101049**

**CAPÍTULO 10..... 93**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE NOVOS ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AHR), COM POTENCIAL EFICÁCIA ATEROPROTETORA EM FUMANTES**

Isaque Antonio Galindo Francischini  
Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.54721010410**

**CAPÍTULO 11..... 109**

**IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM GEL DE ALGINATO E PECTINA**

Layla de Fátima Gonçalves  
Sabrina de Ávila Rodrigues

**DOI 10.22533/at.ed.54721010411**

**CAPÍTULO 12..... 115**

**CONTRACEPTIVOS ORAIS COMBINADOS E A BIOLOGIA DA INSULINA**

Janaina de Oliveira Chaves  
Cremilda do Amaral Roso de Oliveira  
Helene Nara Henriques Blanc  
Rosane Aparecida Ribeiro

**DOI 10.22533/at.ed.54721010412**

**CAPÍTULO 13..... 133**

**CONDIÇÕES TÉRMICAS E SANITÁRIAS EM ILHAS DE REFRIGERAÇÃO DE SUPERMERCADOS E O RISCO DE TRANSMISSÃO DE SALMONELOSE**

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva  
Daniely Souza Paz  
Kimberly Soares Brito Bratífich  
Letícia das Graças Silva  
Rogério Alves Rodrigues

**DOI 10.22533/at.ed.54721010413**

**CAPÍTULO 14..... 143**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS EM COSMÉTICOS**

Giovanna Amaral Filipe

Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

**DOI 10.22533/at.ed.54721010414**

**CAPÍTULO 15..... 154**

**A RELEVÂNCIA E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA COMO TERAPÊUTICA ESTÉTICA**

Lília Maria Nobre Mendonça de Aguiar

Lulucha de Fátima Lima da Silva

Silvia Sousa da Silva

Gicilene Meneses dos Santos

Domingas Machado da Silva

Antenor Matos de Carvalho Junior

Rodrigo Ruan Costa de Matos

Joyce Freitas Barbosa Monteiro

Jocireudo de Jesus Carneiro de Aguiar

**DOI 10.22533/at.ed.54721010415**

**CAPÍTULO 16..... 166**

**UTILIZAÇÃO DE VETORES VIRAIS NA TERAPIA GÊNICA**

Edmilson Pereira Barroso

Synara Suellen Lebre Félix

Anna Júlia Lebre Félix

Maria Júlia Enes Lebre Félix

Gustavo Henrique Sinhoin

Ylêdo Fernandes de Menezes Júnior

Abigail Gonçalves da Silva

Joscleildo Pereira Ferreira

Eder Ferreira de Arruda

Adem Nagibe dos Santos Geber Filho

**DOI 10.22533/at.ed.54721010416**

**CAPÍTULO 17..... 177**

**EXPANSION OF SCHISTOSOMIASIS IN A LOCALITY IN SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRAZIL**

Aline de Jesus Lustosa Nogueira

Renato Juvino de Aragão Mendes

Adalberto Alves Pereira Filho

Leandro Schalcher Aguiar

Iramar Borba de Carvalho Nogueira

Alexandre Nava Fabri

Halana Tereza Marques de Jesus Ambrósio

Karla Regina Freitas Araújo

Ivone Garros Rosa

**DOI 10.22533/at.ed.54721010417**

<b>CAPÍTULO 18.....</b>	<b>188</b>
<b>MONITORAMENTO MICROCONTROLADO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO DE <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i></b>	
Letícia Pinto	
Andréia Anschau	
DOI 10.22533/at.ed.54721010418	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES .....</b>	<b>198</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO.....</b>	<b>199</b>

# CAPÍTULO 6

## ADAPTAÇÃO DO MÉTODO *CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING* NA CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 04/01/2021

**Nicole Dalonso**

Sociedade Educacional de Santa Catarina –  
Unisociesc  
Joinville – SC  
<http://lattes.cnpq.br/2341587952304052>

**RESUMO:** A modificação genética de microrganismos tem despertado interesse dos pesquisadores por permitir a viabilidade de certos processos biotecnológicos. Visando aumentar o rendimento de produtos de interesse farmacêutico, medicinal, cosmético, ambiental, biotecnológico, entre outros, diversos métodos de fusão de fragmentos de DNA já foram estudados, porém ainda existem certas dificuldades processuais quanto ao tamanho do plasmídeo a ser montado. Neste trabalho serão apresentadas algumas das principais técnicas de fusão de fragmentos de DNA, sendo detalhado o método *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) e sua verificação quanto a correta montagem dos fragmentos, empregando para isso a digestão por enzimas de restrição. No presente estudo foi desenvolvido um protocolo passo a passo do método CPEC na montagem de dois plasmídeos para modificação genética de microrganismos, de modo a permitir avanços biotecnológicos com maior efetividade. Foi possível identificar que o tamanho do plasmídeo não afetou o percentual de colônias corretas, e sim que outras características, como o CG%, a quantidade de pares de base (pb)

sobrepostas com o vetor base, bem como entre os fragmentos, no qual afetam o sucesso da construção por CPEC.

**PALAVRAS - CHAVE:** Fusão de fragmentos de DNA, plasmídeos, protocolo, CPEC.

### ADAPTATION OF THE CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING METHOD IN PLASMIDS CONSTRUCTION FOR GENETIC MODIFICATION OF MICROORGANISMS

**ABSTRACT:** The genetic modification of microorganisms has encouraged researchers for allowing the viability of certain biotechnological processes. In order to increase the yield of pharmaceutical, medicinal, cosmetic, environmental and biotechnological products, among others, several methods of assembling DNA fragments have already been studied, however there are still certain difficulties regarding process and plasmid size to be connected. In this work, some of the main techniques to assemble DNA fragments will be presented, highlighting the *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) method and its verification as to the correct assembly of the fragments, using digestion by restriction enzymes. In the present study, a step-by-step protocol of the CPEC method was developed to assemble two plasmids for the genetic modification of microorganisms, in order to allow biotechnological advances with greater effectiveness. It was possible to identify that plasmid size did not affect the percentage of correct colonies, but that other characteristics, such as CG%, the number of base pairs (bp)

overlapped with the base vector, as well as between fragments, in which affect the success of construction by CPEC.

**KEYWORDS:** Assembling DNA fragments, plasmids, protocol, CPEC.

## 1 | INTRODUÇÃO

A viabilidade dos processos biotecnológicos depende frequentemente da modificação genética do organismo que expressa o produto de interesse (STEPHANOPOULOS, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de métodos que facilitem a montagem de cassetes e vetores para o melhoramento genético de microrganismos têm se tornado cada vez mais necessário. Com auxílio da Biologia Sintética algumas vias metabólicas podem ser alteradas e montadas para produzir células mais robustas capazes de produzir maiores quantidades de produtos desejados (COBB et al., 2013; LI; BORODINA, 2015).

Para realizar a montagem de cassetes de interesse, inicialmente é necessário o fusão de fragmentos de DNA de diferentes organismos ou genes. Diversos métodos de montagem de fragmentos de DNA *in vitro* e *in vivo* já foram descritos (XIONG et al., 2008; SHAO et al., 2009; WANG et al., 2012; PATRON, 2014). Os fragmentos de interesse podem ser amplificados pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e diretamente introduzidos em plasmídeos por recombinação homóloga *in vitro*, porém este procedimento necessita de transformação bacteriana, purificação e também confirmação do plasmídeo (SZEWCZYK et al., 2007). Os métodos de sequências de clonagem dependentes utilizam enzimas de restrição e ligação ou recombinação sítio específica, o que limita sua aplicação dentro da biologia sintética, uma vez que são restritos aos sítios específicos dos vetores e insertos (QUAN; TIAN, 2011).

Algumas aplicações mais complexas envolvendo múltiplos fragmentos necessitam de métodos de sequências de clonagem independentes, dentre as quais destacam-se o método isotérmico enzimático de Gibson (GIBSON et al., 2008), a Reação em Cadeia da Ligase (LCR) (KOK et al., 2014), a Ligação Independente de Clonagem (LIC) (ASLANIDIS; JONG, 1990), a Sequência e Ligação Independente de Clonagem (SLIC) (LI; ELLEDGE, 2012) T4 DNA polymerase, to generate single-stranded DNA overhangs in insert and vector sequences. These fragments are then assembled in vitro and transformed into *Escherichia coli* to generate recombinant DNA of interest. SLIC inserts can also be generated by incomplete PCR (iPCR, a Fusão baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-fusion-based) (SHEVCHUK et al., 2004), *Hot-Fusion* (FU et al., 2014) e *Circular polymerase extension cloning* (CPEC) (QUAN; TIAN, 2009).

Muitos fatores estão envolvidos na escolha do melhor método para a construção de fragmentos, desde os custos de reagentes, laboratório, o grau de complexidade e as sequências do DNA envolvidas (KOK et al., 2014). Por este motivo, o pesquisador deve fazer a escolha do método conforme suas possibilidades e viabilidade para cada caso.

O método isotérmico enzimático de Gibson permite a união de fragmentos com sequências terminais em sobreposição (15-80 pb) por meio da combinação de três enzimas: Exonuclease, DNA polimerase e DNA ligase. Basicamente, uma exonuclease remove os nucleotídeos de uma das extremidades da dupla fita, expondo as regiões de complementaridade entre as fitas. Posteriormente, as porções complementares são aneladas e preenchidas pela DNA polimerase. A DNA ligase sela os cortes permitindo o reparo dos intervalos entre as fitas (GIBSON, 2011).

O LCR utiliza oligonucleotídeos complementares aos terminais das regiões vizinhas do DNA que funcionam como molde para unir fragmentos de dupla fita previamente fosforilados nas porções 5'. Após desnaturação e anelamento dos ssDNA (*bridging oligos*), uma ligase termoestável une os fragmentos através de uma ligação fosfodiéster. Após ciclos de desnaturação, anelamento e ligação são obtidos fragmentos complexos de DNA. Em condições otimizadas os autores puderam fusionar até vinte fragmentos de até 20 kb (KOK et al., 2014).

O método conhecido como LIC utiliza uma propriedade específica da T4 DNA polimerase que atua como exonuclease na ausência de dNTPs. Utilizando a PCR são adicionadas ao inserto sequências curtas de 12 nucleotídeos em sobreposição com o respectivo plasmídeo, de tal forma que um dos dNTPs esteja ausente. O inserto e o plasmídeo linearizado são então tratados com a polimerase T4 na presença do dNTP inicialmente ausente. A T4 DNA polimerase possui atividade de exonuclease 3' para 5', degradando o DNA do terminal 3' até encontrar o primeiro resíduo correspondente ao dNTP adicionado, gerando assim pequenas regiões complementares em fita simples, que posteriormente serão aneladas gerando duplas fitas. O tamanho dos fragmentos empregados podem variar de 150-3.000 pb e o plasmídeo utilizado pelos autores foi o pUC119 que contém o gene de resistência à ampicilina (ASLANIDIS; JONG, 1990). O método SLIC não tem restrições de sequência em sua região de homologia, possui o mesmo princípio já descrito para o LIC e pode fusionar até dez fragmentos (LI; ELLEDGE, 2012).

Basicamente, no PCR de fusão, três ou quatro fragmentos previamente obtidos e purificados podem ser unificados inicialmente numa reação de PCR padrão, porém sem adição inicial de *primers*. Na fusão tripla todos os fragmentos em quantidades equimolares são colocados na mesma reação por 13 ciclos, sem *primers*, sendo posteriormente purificados e adicionados a uma nova reação com *primers* externos e cerca de 30 ciclos para obtenção da montagem completa. Já na fusão quádrupla os fragmentos em quantidades equimolares são separados em dois grupos de dois fragmentos cada, e após 12 ciclos de fusão os quatro fragmentos são unidos numa nova reação de 20 ciclos, ainda sem *primers*. Ao final da purificação desta etapa, uma nova reação é realizada com adição dos *primers* externos e cerca de 30 ciclos para obtenção da montagem completa (SHEVCHUK et al., 2004).

Um método de fusão duplo para montagem de cassetes com a proteína

verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) foi desenvolvido por PCR-*fusion-based*. Os autores verificaram que, por razões ainda desconhecidas, a purificação dos fragmentos de DNA diretamente do gel de agarose promoveu inibição da reação de fusão. Portanto, os dois fragmentos com 24 nucleotídeos em sobreposição, compostos por promotor/gene de interesse e GFP/3'UTR, foram fusionados diretamente dos seus produtos de PCR, numa concentração aproximada de 1 ng/50  $\mu$ L de reação de cada fragmento (HOBERT, 2002). Segundo Shevchuk et al. (2004), alguns itens são imprescindíveis para o sucesso do PCR-*fusion-based*: 1) uso de uma enzima com atividade corretora (*proofreading*) 3' $\rightarrow$ 5'; 2) a purificação dos intermediários da PCR deve limitar-se a ligar e lavar (*bind-and-wash*), pois a gel-purificação acaba impossibilitando o uso dos longos fragmentos para fusões posteriores; 3) os fragmentos devem possuir regiões de sobreposição com cerca de 25 pb ou mais; 4) os *primers* devem apresentar temperaturas de *melting* elevadas (68-70°C), o que aumenta a especificidade evitando erros e estruturas secundárias durante o anelamento.

No método denominado *Hot-Fusion* múltiplos fragmentos com regiões entre 17-30 pb em sobreposição podem ser fusionados em um único passo. A incubação dos fragmentos com o vetor é realizada a 50°C com uma exonuclease (T5) e uma polimerase de alta fidelidade (Phusion). A T5 remove nucleotídeos do terminal 5' para 3' deixando porções de fita simples complementares entre os fragmentos e a Phusion preenche as lacunas unindo as porções em dupla fita. Foi observado até 95% de eficiência de clonagem, mesmo quando o fusão foi realizado com produtos de PCR não purificado, mas que apresentavam boa concentração (30-100 ng/ $\mu$ L) (FU et al., 2014).

O fusão de fragmentos previamente amplificados e purificados via CPEC evita a adição de sítios de restrição e não requer ligases e exonucleases específicas. O método utiliza o mecanismo de extensão com a DNA polimerase, unindo fragmentos sobrepostos para formar os plasmídeos circulares de cadeia dupla. Geralmente se aplica uma relação molar de fragmentos/plasmídeo de 1:1 ou 2:1, numa concentração total de DNA de 10-20 ng/ $\mu$ L. Uma DNA polimerase de alta fidelidade é primordial para este método, além da purificação prévia dos fragmentos. Dependendo do tamanho e da quantidade dos fragmentos podem ser usados de 5-20 ciclos de desnaturação a 98°C, anelamento a 55°C, extensão a 72°C por 15 segundos/kb e uma extensão final de no mínimo 5 min. Os *primers* das regiões de sobreposição dos fragmentos devem ter temperaturas de *melting* muito próximas e elevadas (60-70°C) para que o anelamento seja correto. Basicamente, este método é muito semelhante à preparação da mistura reacional da PCR, exceto que não há adição de *primers*, ou seja, não se trata de uma amplificação. Outra vantagem é que o produto fusionado pode ser transformado diretamente no organismo de interesse sem purificação (QUAN; TIAN, 2011).

Vários cassetes de expressão podem ser montados para melhorar a via metabólica dos microrganismos. Com o avanço das técnicas de fusão de DNA é possível montar

seqüências lineares para deleção de genes, troca de promotores e adição de proteínas tag, que podem ser aplicadas posteriormente à transformação de microrganismos (SZEWCZYK et al., 2007).

Num estudo prévio sobre diferentes métodos de montagem de fragmentos de DNA, Dalonso et al. (2017), empregando fragmentos previamente purificados, foi a melhor opção na montagem de longos cassetes de expressão, com tamanho superior a 7000 pares de bases. No presente trabalho, maiores detalhes sobre o protocolo de obtenção de plasmídeos serão explorados, de modo a apresentar um passo a passo para obtenção e validação no fusão de fragmentos de DNA.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Dois plasmídeos com funções distintas, pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO foram construídos de modo a validar o método CPEC anteriormente selecionado (DALONSO et al., 2017) allowing some biotechnological processes to become economically viable by genetic improvement of microorganisms. We compared three methods of assembling six DNA fragments: PCR fusion-based, isothermal NEBuilder and circular polymerase extension cloning (CPEC). O vetor linearizado pUC20 foi usado como base para a construção dos plasmídeos. Este plasmídeo contém o gene de resistência a ampicilina como marcador, sendo replicado em bactéria *Escherichia coli* DH5α. Após cultura *overnight* das colônias contendo o vetor de expressão com gene de resistência a higromicina, pUCHYG, foi extraído empregando *NucleoSpin Plasmid* e digerido com BamHI para promover sua linearização. Os *primers* para amplificação dos fragmentos de interesse da glucano sintase (GLSA e GLSB) e do promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) de *Pleurotus ostreatus* PC9 (Utrecht University) foram desenhados pela ferramenta NEBuilder, disponível no site da NEB (<http://NEBuilder.neb.com/#>), de modo que tivessem 15 pares de base complementares entre si, e 30 pares de bases complementares com o vetor pUCHYG.

Para obtenção do plasmídeo pUCHYG-HYDRO, inicialmente foram amplificados os fragmentos 5' e 3' UTR (região não traduzida) do gene da hidrofobina de *P. ostreatus* com *overlapping primers* para o plasmídeo pUC20 linearizado com enzimas de restrição Smal e EcoRV. O gene de resistência a higromicina foi extraído do plasmídeo pHYM1.2 (SCHOLTMEIJER et al., 2001) por amplificação em PCR, empregando *overlapping primers*. O fragmento referente ao gene da higromicina foi colocado entre as regiões 5' e 3' UTR do gene da hidrofobina. Os *primers* foram desenhados pela ferramenta NEBuilder, disponível no site da NEB (<http://nebuilder.neb.com/#>), de modo que tivessem 13 pares de base complementares entre si, e 25 pares de bases complementares com o vetor pUC20.

Os vetores pUCHYG e pUC20, empregados como base na construção de seus respectivos plasmídeos, foram digeridos *overnight* com as enzimas de restrição

já mencionadas e todos os fragmentos e vetores foram purificados de bandas de agarose (*NucleoSpin-Gel* e *PCR Clean-up* - MN) e quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific).

Os vetores linearizados (0,016 pmol) foram então misturados na relação 1:3 aos demais fragmentos a serem fusionados de maneira equimolar (0,05 pmol de cada). Posteriormente, uma alíquota de 6  $\mu\text{L}$  desta mistura foi então submetida a *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) durante 2,5 ciclos/kb, num volume de reação de 25  $\mu\text{L}$ . A reação consistiu numa desnaturação inicial a 98°C por 30 s e 2,5 ciclos/kb a 98°C por 10 s, 55°C por 30 s, 72°C por 160 s, seguida de 10 min de extensão final a 72°C. Os componentes da reação foram os mesmos para uma reação padrão com a DNA polimerase Phusion, exceto que não são adicionados *primers*.

Células quimicamente competentes (25  $\mu\text{L}$ ) (Stellar, TaKaRa) foram então transformadas por choque térmico com 2,5  $\mu\text{L}$  do produto de reação CPEC. As colônias transformantes após seleção em LB contendo ampicilina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram submetidas à extração de DNA plasmidial (*NucleoSpin Plasmid*) e digeridas com enzima de restrição Sall. As colônias corretas que continham a sequência do plasmídeo construído foram confirmadas de acordo com o perfil de digestão esperado, conforme predição da ferramenta online J5 (<https://j5.jbei.org/VectorEditor/VectorEditor.html>).

A Figura 1 apresenta um esquema das etapas necessárias para construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO.

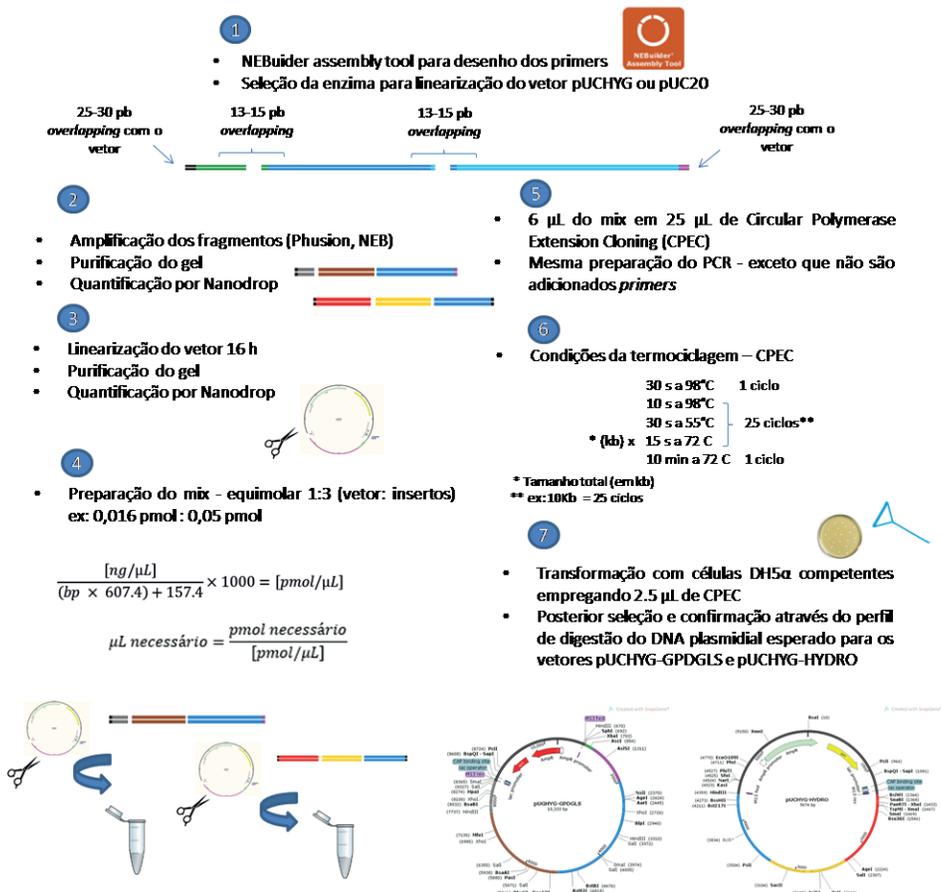


Figura 1: Esquema das etapas necessárias para construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO.

Fonte: Próprio autor.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do método para fusão de DNA irá depender do número de fragmentos que se deseja fundir. Por exemplo, para fusão de dois sugere-se o PCR-*fusion-based* e NEBuilder pela facilidade e rapidez que ambos apresentam, além de que os fragmentos podem ser fundidos diretamente dos produtos de PCR. A partir de três fragmentos a purificação torna-se o ponto chave da qualidade dos fundidos, pois os intermediários da reação ficam mais evidentes em caso de primers remanescentes. Para múltiplos fragmentos indica-se a adaptação do método CPEC que permite o fusão após purificação individual das bandas de DNA. Para esta adaptação do CPEC são de suma importância a qualidade e a pureza dos fragmentos, sendo a purificação em gel

de agarose mais indicada para assegurar a montagem correta. Uma polimerase de alta fidelidade define também o sucesso deste método.

Dois diferentes plasmídeos foram construídos de modo a validar a técnica CPEC para esta finalidade. A construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS visa a troca do promotor natural da glucano sintase pelo promotor constitutivo GPD de *Pleurotus ostreatus* PC9, já a construção do plasmídeo pUCHYG-HYDRO tem por objetivo a deleção do gene da hidrofobina, de *Pleurotus ostreatus*  $\Delta$ Ku80.

As Figuras 2 e 3 a seguir mostram os perfis de digestão com diferentes enzimas de restrição, tanto práticos quanto teóricos, utilizados para confirmação das colônias corretas dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS (Figura 2) e pUCHYG-HYDRO (Figura 3).

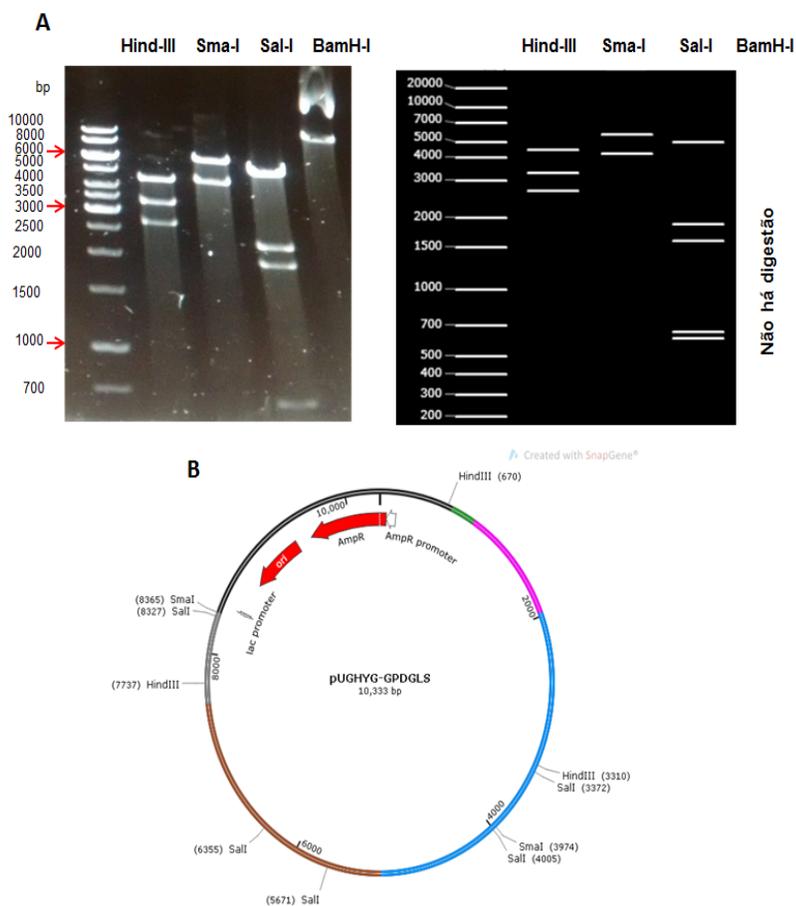


Figura 2: Perfis de digestão com enzimas de restrição HindIII, SmaI, SalI e BamHI, tanto práticos (esquerda) quanto teóricos (direita), utilizados para confirmação do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS; B - Mapa de restrição do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS.

Fonte: Próprio autor.

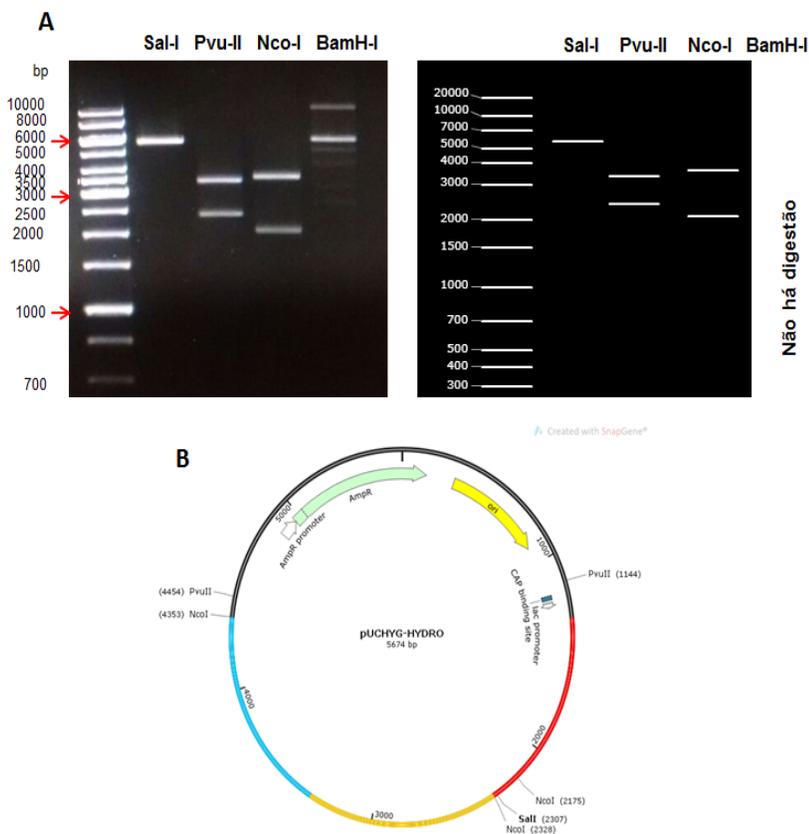


Figura 3: Perfis de digestão com enzimas de restrição SalI, PvuII, NcoI e BamHI, tanto práticos (esquerda) quanto teóricos (direita), utilizados para confirmação do plasmídeo pUCHYG-HYDRO; B - Mapa de restrição do plasmídeo pUCHYG-HYDRO.

Fonte: Próprio autor.

Os perfis de digestão com as respectivas enzimas de restrição confirmam a montagem correta dos fragmentos para obtenção dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS (Figura 2) e pUCHYG-HYDRO (Figura 3). Portanto, a técnica CPEC pode ser facilmente empregada no fusionamento de fragmentos de DNA e construção de plasmídeos, para os mais diferentes propósitos, seja para super-expressão, modificação ou deleção de genes.

Das dezesseis colônias analisadas por Quan e Tian (2009), de maneira randômica através de PCR de colônia, 100% apresentaram o inserto correto em testes realizados com plasmídeo de 6,4 kb que continham três fragmentos fusionados por CPEC. Outros autores quando analisaram o perfil de digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos isolados das respectivas colônias, não alcançaram mais de 50% das colônias corretas quando quatro fragmentos foram fusionados por CPEC (KOK et al., 2014).

Verifica-se, na tabela 1, que o número de colônias corretas diminuiu quando CG% entre fragmentos aumentaram. Ambas as sobreposições, com vetor e entre fragmentos contribuíram para aumentar o número correto de colônias no CPEC. O comprimento total do plasmídeo parece não ter sido um ponto crítico. O passo de amplificação e o corte da banda de DNA no gel podem ser considerados pontos críticos para gerar colônias incorretas.

Tabela 1 a seguir apresenta o percentual de colônias corretas, dentre as 20 colônias analisadas randomicamente, na obtenção dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO, com 4 fragmentos fusionados cada.

Plasmídeo	Comprimento do plasmídeo (kb)	% de CG entre os fragmentos	Sobreposição com o vetor (pb)	Sobreposição entre os fragmentos (pb)	% de colônias corretas (n=20)
pUCHYG-GPDGLS	10,3	49,6	30	15	85 (17/20)
pUCHYG-HYDRO	5,6	53	25	13	30 (6/20)

Tabela 1: Comprimento dos plasmídeos, % CG, sobreposição com vetor/fragmentos e a interferência quanto ao número de colônias corretas.

## 4 | CONCLUSÕES

A escolha do método de fusionamento de fragmentos de DNA em *overlapping* depende do número de fragmentos que se deseja fusionar. A partir de três fragmentos a purificação torna-se o ponto chave da qualidade dos fusionados, pois os intermediários da reação ficam mais evidentes em caso de *primers* remanescentes, sendo mais apropriado o método CPEC, que permite o fusionamento após purificação individual das bandas de DNA. A técnica CPEC permitiu a construção de dois plasmídeos pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO, havendo diferença entre o número de colônias corretas, conforme a complexidade em relação ao CG%, número de pares de bases sobrepostas entre os fragmentos, bem como entre os fragmentos e vetores. A correta montagem dos plasmídeos foi confirmada pelos perfis de digestão obtidos conforme simulação, empregando diferentes enzimas de restrição. A técnica CPEC permite a construção de plasmídeos, para os mais diferentes propósitos, seja para super-expressão, modificação ou deleção de genes.

## REFERÊNCIAS

ASLANIDIS, Charalampos; JONG, Pieter J. De. Ligation-independent cloning of PCR products ( LIC-PCR ). **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.

COBB, R. E.; NING, J. C.; ZHAO, H. DNA assembly techniques for next - generation combinatorial biosynthesis of natural products. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], p. 1–9, 2013. DOI: 10.1007/s10295-013-1358-3.

DALONSO, N.; SAVOLDI, M.; FRANÇA, P. H. C.; REIS, T. F.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. M. Sequence-independent cloning methods for long DNA fragments applied to synthetic biology. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 530, p. 5–8, 2017. DOI: 10.1016/j.ab.2017.04.018.

FU, Changlin; DONOVAN, William P.; SHIKAPWASHYA-HASSER, Olga; YE, Xudong; COLE, Robert H. Hot Fusion : An efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, p. 1–20, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115318.

GIBSON, Daniel G. et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. **Science**, [S. l.], v. 319, p. 1215–1220, 2008.

GIBSON, Daniel G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 498p. 349–361. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.

HOBERT, Oliver. PCR Fusion-Based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. **BioTechniques**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 728–730, 2002.

KOK, Stefan De et al. Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction. **ACS Synthetic Biology**, [S. l.], v. 3, p. 97–106, 2014.

LI, Mamie Z.; ELLEDGE, Stephen J. SLIC: A method for sequence- and ligation-independent cloning. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 852, p. 51–59, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-564-0\_5.

LI, Mingji; BORODINA, Irina. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1111/1567-1364.12213.

PATRON, Nicola J. ScienceDirect DNA assembly for plant biology : techniques and tools. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 19, p. 14–19, 2014. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.02.004.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1–6, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0006441.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning for high- throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011. DOI: 10.1038/nprot.2010.181.

SCHOLTMEIJER, K.; WÖSTEN, H. A. B.; SPRINGER, J.; WESSELS, J. G. H. Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 481–483, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.1.481-483.2001.

SHAO, Zengyi; ZHAO, Hua; ZHAO, Huimin. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 1–10, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkn991.

SHEVCHUK, Nikolai A.; BRYKSIN, Anton V; NUSINOVICH, Yevgeniya A.; CABELLO, Felipe C.; SUTHERLAND, Margaret; LADISCH, Stephan. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 1–12, 2004. DOI: 10.1093/nar/gnh014.

STEPHANOPOULOS, Gregory. Synthetic biology and metabolic engineering. **ACS Synthetic Biology**, [S. l.], v. 1, n. 11, p. 514–525, 2012. DOI: 10.1021/sb300094q.

SZEWCZYK, Edyta; NAYAK, Tania; OAKLEY, C. Elizabeth; EDGERTON, Heather; XIONG, Yi; TAHERI-TALESH, Naimeh; OSMANI, Stephen A.; OAKLEY, Berl R. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 3111–3121, 2007.

WANG, Tianwen; MA, Xingyuan; ZHU, Hu; LI, Aitao. Available methods for assembling expression cassettes for synthetic biology. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S. l.], v. 93, n. 5, p. 1853–1863, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-3920-8.

XIONG, Ai-Sheng; PENG, Ri-He; ZHUANG, Jing; LIU, Jin-Ge; GAO, Feng; CHEN, Jian-Min; CHENG, Zong-Ming; YAO, Quan-Hong. Non-polymerase-cycling-assembly-based chemical gene synthesis: Strategies, methods, and progress. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 26, p. 121–134, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.10.001.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Amilases 7, 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12

Antioxidante 74, 78, 80, 81, 83, 143, 144, 148, 149, 151, 188

Arduino 188, 189, 190, 191, 195, 196, 197

Artemísia 67, 68

Aterosclerose 93, 94, 95, 97, 107

Atividade Antimicrobiana 33, 35, 36, 39, 40, 41, 78, 80, 144, 149, 150

Atividades Biológicas 8, 74, 76, 80, 81

### B

Bactérias Cariogênicas 33, 34, 35, 39, 40, 41

Bacteriologia 44, 47

Biossíntese 144, 145

Bisfenol 7, 19, 21

### C

Câncer oral 84, 85, 87, 89

Carcinoma 9, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92

Carotenoide 188

Citationitems 179, 180

Contraceptivos Hormonais 115, 116

Controle de vetores 178

Cultivos Mixotróficos 188, 196

### D

Desregulador Endócrino 19, 20, 21

Dimetilsulfóxido 7, 14, 15

DNA 40, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 90, 96, 97, 117, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172

Doença Parasitária 178

Doenças cardiovasculares 94, 116, 173

### E

Embiratanha 74, 75, 77, 80, 81, 82

Esquistossomose 178, 185, 186

Estética 10, 154, 155, 156, 157, 160, 162, 163, 165

Estrogênio 21, 24, 29, 115, 116, 117, 118, 120, 121

## F

Fermentação Alcoólica 109, 110

Fungos Filamentosos 2, 3

## H

Hipóxia 84, 85, 86, 90, 91

Homeostase da glicose 115, 116, 126, 127, 128

## I

Ilhas de refrigeração 9, 133, 136

Inovação tecnológica 144, 166, 167

## L

Leveduras 9, 109, 110, 111, 112, 113, 144, 146

## M

Marcador Prognóstico 84, 85

Mebendazol 14, 15

Microalga 188, 189

Microrganismos 8, 12, 52, 55, 56, 58, 59, 114, 134, 139, 141, 144, 145, 146, 149, 189

## O

Obesidade 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28

Ovariectomia 20, 22, 28, 29

## P

Patógenos Bucais 34

Pectinas 110

Plantas Medicinais 35, 68, 72, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 82, 83

Plasmídeos 8, 55, 56, 58, 59, 62, 63, 64

Produção Avícola 46, 47, 135

Produção Enzimática 2, 11

Produtos Naturais 3, 11, 67, 93, 144

Progesterona 115, 116, 118

## **Q**

Química Medicinal Computacional 93, 98, 104

## **R**

Regiões Organizadoras de Nucléolos 85, 86

## **S**

Salmonelose 9, 45, 52, 53, 133, 135

Saúde Pública 33, 45, 46, 53, 94, 130, 133, 134, 135, 178, 185, 186

Setor Supermercadista 135

Soforolipídios 10, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153

## **T**

Tabagismo 93, 94, 95

Terapia gênica 10, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175

Tiabendazol 14, 15

Toxina Botulínica 10, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165

Toxocaríase 14, 15

## **V**

Vetores Virais 10, 166, 168, 170, 173

## **Z**

Zoonose 14, 15, 44, 45

# A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

# A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)