

Biotecnologia:

Aplicação tecnológica nas ciências agrárias e ambientais, ciência dos alimentos e saúde

Vanessa Bordin Viera
Natiéli Piovesan
(Organizadoras)



Vanessa Bordin Viera
Natiéli Piovesan
(Organizadoras)

**BIOTECNOLOGIA: Aplicação Tecnológica nas
Ciências Agrárias e Ambientais, Ciência dos
Alimentos e Saúde**

Atena Editora
2017

2017 by Vanessa Bordin Viera & Natiéli Piovesan
Copyright © da Atena Editora
Editora Chefe: *Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira*
Edição de Arte e Capa: *Geraldo Alves*
Revisão: *Os autores*

Conselho Editorial

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto (UFPEL)
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua (UNIR)
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson (UTFPR)
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho (UnB)
Prof. Dr. Carlos Javier Mosquera Suárez (UDISTRITAL/Bogotá-Colombia)
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior (UEPG)
Prof. Dr. Gilmei Francisco Fleck (UNIOESTE)
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza (UEPA)
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior (UFAL)
Profª Drª Ivone Goulart Lopes (Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatric)
Profª Drª Lina Maria Gonçalves (UFT)
Profª Drª Vanessa Bordin Viera (IFAP)
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa (FACCAMP)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

B616

Biotecnologia: aplicação tecnológica nas ciências agrárias e ambientais, ciência dos alimentos e saúde / Organizadoras Vanessa Bordin Viera, Natiéli Piovesan. – Ponta Grossa (PR): Atena, 2017. 232 p. : il.

Formato: PDF
ISBN 978-85-93243-31-8
DOI 10.22533/at.ed.3182806
Inclui bibliografia

1. Alimentos - Biotecnologia. 2. Biotecnologia agrícola. 3. Medicina - Biotecnologia. I. Viera, Vanessa Bordin. II. Piovesan, Natiéli. III. Título. CDD-660.6

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

2017

Proibida a reprodução parcial ou total desta obra sem autorização da Atena Editora

www.atenaeditora.com.br

E-mail: contato@atenaeditora.com.br

Apresentação

A biotecnologia pode ser definida como uma ciência que utiliza sistemas biológicos e/ou organismos vivos em aplicações tecnológicas visando desenvolver ou modificar produtos ou processos, sendo que suas aplicações mais importantes estão relacionadas com a área agrária e ambiental, saúde e ciência dos alimentos.

A Coletânea “Biotecnologia: Aplicação tecnológica nas ciências agrárias e ambientais, ciência dos alimentos e saúde” é um livro que aborda o conhecimento científico através de 16 artigos divididos em três grandes áreas: Agrárias e Ambientais, Ciência dos Alimentos e Saúde.

A área “Agrárias e Ambientais”, é apresentada através de seis artigos que tratam sobre temas de imensa importância como avaliação da qualidade da água, germinação de plantas, fitotoxicidade de antibióticos, produção de biomassa e prospecção de genes.

A área de “Ciência dos Alimentos”, é composta por cinco artigos que abordam temas referentes a aplicação de bactérias na produção de alimentos, estabilidade de compostos antimicrobianos, produção de corantes naturais, produção de hidrolisados proteicos e produção de lacases.

A área de “Saúde”, aborda diante da publicação de cinco artigos, temas relevantes sobre método de determinação da int-cfDNA, eficácia de vacina para a linfadenite caseosa, estudo piloto de biomarcadores em carcinomas, efeito de dietas suplementadas com microalgas, genes alvo para o controle *in vitro* das condições de estresse térmico e oxidativo em condições de estresse *in vitro*.

Através desta obra pretende-se oferecer um instrumento teórico e metodológico para auxiliar nos estudos e ampliar o conhecimento sobre a biotecnologia aplicada nas áreas descritas. Por fim, desejamos a todos uma excelente leitura e ótimas descobertas!

*Vanessa Bordin Viera
Natiéli Piovesan*

SUMÁRIO

Apresentação.....03

Área: Agrárias e Ambientais

CAPÍTULO I

A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CAPIM ANONNI É REDUZIDA NA AUSÊNCIA DE LUZ

Joseila Maldaner, Gerusa Pauli Kist Steffen, Tamires Moro, Cleber Witt Saldanha, Evandro Luiz Missio, Rosana Matos de Moraes, Ionara Fátima Conterato e Rejane Flores.....07

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE NASCENTES NA BACIA DO ARROIO ANDRÉAS, RS, BRASIL, ATRAVÉS DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E GENTOXICOLÓGICOS UTILIZANDO O ENSAIO COMETA

Daiane Cristina de Moura, Cristiane Márcia Miranda Sousa, Alexandre Rieger e Eduardo Alcayaga Lobo.....19

CAPÍTULO III

FITOTOXICIDADE DO ANTIBIÓTICO CEFALOTINA EM SEMENTES DE ALFACE (*LACTUCA SATIVA*)

Caroline Lopes Feijo Fernandes, Laiz Coutelle Honscha e Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior.....39

CAPÍTULO IV

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES PELETIZADAS DE *Eucalyptus grandis* (MYRTACEAE)

Denise Russowski, Cinthia Gabriela Garlet, Frederico Luiz Reis, Leonardo Menezes, Liziane Maria Barassuol Morandini, Juçara Terezinha Paranhos, Zaida Inês Antonioli e Ademir Farias Morel.....47

CAPÍTULO V

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *ASPERGILLUS SP.* PELA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO DE PÓ DE FUMO PROVENIENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE TABACO

Joyce Cristina Gonçalves Roth e Valeriano Antonio Coberllini.....64

CAPÍTULO VI

PROSPECÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA qPCR EM PEIXE-REI (*Odontesthes humensis*): CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA β -ACTINA

Lucas dos Santos da Silva, Bruna Fagundes Barreto, Ingrid Medeiros Lessa, William Borges Domingues, Tony Leandro Rezende da Silveira e Vinicius Farias Campos.....73

Área: Ciência dos Alimentos

CAPÍTULO VII

APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS UMA REVISÃO
*Ketlin Schneider, Fernanda Megiolaro, César Milton Baratto e Jane Mary Lafayette
Neves Gelinski.....83*

CAPÍTULO VIII

ESTABILIDADE DO COMPOSTO ANTIMICROBIANO DE *Pleurotus sajor-caju* FRENTE A
CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO
*Camila Ramão Contessa, Nathiéli Bastos de Souza, Guilherme Battú Gonçalo,
Luciano dos Santos Almeida, Ana Paula Manera e Caroline Costa
Moraes.....101*

CAPÍTULO VIX

PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS A PARTIR DE FUNGOS POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL
Priscila Molinares dos Santos e Lisiane de Marsillac Terra.....113

CAPÍTULO X

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DE CARÇAÇAS DE FRANGO
DESOSSADAS MANUALMENTE UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
*Mari Silvia Rodrigues de Oliveira, Felipe de Lima Franzen e Nelcindo Nascimento
Terra.....123*

CAPÍTULO XI

PRODUÇÃO DE LACASES POR *Marasmiellus palmivorus* VE-111 EM BIORREATOR DE
AGITAÇÃO MECÂNICA E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS
Camila Cantele, Roselei Claudete Fontana e Aldo José Pinheiro Dillon.....144

Área: Saúde

CAPÍTULO XII

AValiação DA INTEGRIDADE DO cfDNA ATRAVÉS DE qPCR COM OS PRIMERS L1PA2
Alessandra Koehler, Danieli Rosane Dallemole e Alexandre Rieger.....157

CAPÍTULO XIII

EFICÁCIA DA FOSFOLIPASE D RECOMBINANTE DE *CORYNEBACTERIUM
PSEUDOTUBERCULOSIS* NA COMPOSIÇÃO DE VACINA DE SUBUNIDADE PARA A
LINFADENITE CASEOSA
*Rodrigo Barros de Pinho, Mara Thais de Oliveira Silva, Silvestre Brilhante Bezerra,
Raquel Nascimento das Neves, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e Sibe
Borsuk.....169*

CAPÍTULO XIV

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO PILOTO

Rosane Giacomini, Alessandra Eifler Guerra Godoy, Isnard Elman Litvin e Fábio Firmbach Pasqualotto.....184

CAPÍTULO XV

REDUÇÃO DE GANHO DE PESO CORPORAL EM CAMUNDONGOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM MICROALGAS

Julia Livia Nonnenmacher, Mayara Breda, Alexandre Matthiensen, Helissara Silveira Diefenthaeler, Elisabete Maria Zanin e Silvane Souza Roman.....193

CAPÍTULO XVI

RESPOSTA TRANSCRICIONAL DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A CONDIÇÕES DE ESTRESSE *in vitro*

Gabriela Merker Breyer, Franciele Maboni Siqueira e Irene Silveira Schrank.....205

Sobre as organizadoras.....219

Sobre os autores.....220

CAPÍTULO I

A GERMINAÇÃO IN VITRO DE CAPIM ANONNI É REDUZIDA NA AUSÊNCIA DE LUZ

**Joseila Maldaner
Geresa Pauli Kist Steffen
Tamires Moro
Cleber Witt Saldanha
Evandro Luiz Missio
Rosana Matos de Moraes
Ionara Fátima Conterato
Rejane Flores**

A GERMINAÇÃO IN VITRO DE CAPIM ANONNI É REDUZIDA NA AUSÊNCIA DE LUZ

Joseila Maldaner

Pesquisadora - Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Gerusa Pauli Kist Steffen

Pesquisadora - Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Tamires Moro

Estudante de Agronomia – Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Cleber Witt Saldanha

Pesquisador – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Evandro Luiz Missio

Pesquisador – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Rosana Matos de Moraes

Pesquisadora - Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Florestas

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Ionara Fátima Conterato

Pesquisadora - Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Centro de Pesquisa Anacreonte Ávila de Araújo

São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil

Rejane Flores

Docente - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha

São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO: Dentre as espécies exóticas invasoras de maior impacto na região sul do Brasil destaca-se o capimannoni (*Eragrostis plana* Nees). Dados recentes afirmam que aproximadamente 20% da vegetação campestre do Rio Grande do Sul encontram-se infestadas por essa invasora, introduzida acidentalmente na década de 1950. O objetivo deste trabalho foi acompanhar a germinação in vitro de sementes de capimannoni em resposta à ausência de luminosidade. Sementes da espécie foram desinfestadas, semeadas em placas de Petri contendo meio MS, e mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2. Os tratamentos consistiram na exposição das sementes a diferentes períodos de escuro (0; 7; 14; 21 e 28 dias). Após o tempo de escuro de cada tratamento, o material permaneceu

sob o fotoperíodo de 16/8 h L/E. Foram utilizadas 12 placas de Petri contendo seis sementes por tratamento. Aos 40 dias após a semeadura, foi avaliado o percentual das sementes germinadas e o número médio de folhas por plântula. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha= 0,05$). Sementes que permaneceram 28 dias no escuro apresentaram porcentagem de germinação cerca de cinco vezes menor que àquelas que foram expostas ao fotoperíodo de 16/8 L/E desde a semeadura no meio de cultura. De maneira semelhante, o número médio de folhas reduziu significativamente com a exposição ao escuro. Esses resultados indicam que a luz é um fator que regula o potencial germinativo de sementes de *E. plana*.

PALAVRAS-CHAVE: espécie exótica invasora; luz; fatores abióticos; ressurgência.

1. INTRODUÇÃO

A conservação de um dos importantes biomas brasileiros, o bioma Pampa, está em risco. Este bioma possui uma área de 176,5 mil Km², aproximadamente 2% do território brasileiro e 63% do Rio Grande do Sul (RS), além de abranger territórios da Argentina e do Uruguai (PILLAR et al., 2009). Entre os anos de 1970 e 2005, estima-se que 4,7 milhões de hectares de pastagens nativas do RS foram convertidos em outros usos agrícolas, como lavouras e silvicultura (PILLAR, 2012). Não obstante, a degradação associada à adoção de estratégias inadequadas de manejo do pastejo e a invasão de espécies exóticas fazem com que somente 39% da área total do bioma Pampa permaneça constituída por remanescentes de campos naturais (PILLAR et al., 2009; PILLAR apud BUCKUP, 2007).

Dentre as espécies exóticas invasoras de maior impacto encontra-se o capim annoni (*Eragrostis plana* Nees) (Figura 1). Esta espécie, originária do sudoeste da África, foi introduzida acidentalmente no Brasil na década de 1950, como contaminante de sementes de capim-de-rhodes (*Chloris gayana* Kunth) e capim-chorão (*Eragrostis curvula* Schrader) (MEDEIROS e FOCHT, 2007; ZENNI e ZILLER, 2011).



Figura 1: Touceira de *Eragrostis plana* em área de solo degradado no bioma Pampa no município de Santa Maria. Fonte: os autores.

O capim annoni é uma gramínea C₄ de clima tropical, perene e alóctone. Sua planta alcança de 0,5 a 1 m de altura e forma densas touceiras devido ao intenso perfilhamento. As folhas desta espécie caracterizam-se pelo alto teor de fibra.

O produtor rural Ernesto Josué Annoni, foi pioneiro no cultivo e propagação de *E. plana*. Considerando a resistência às flutuações climáticas e a alta prolificidade, a planta foi enaltecida chegando-se a acreditar que poderia ser a solução da escassez de alimento para os bovinos. Então, em 1970, através do Grupo Rural Annoni, foram cultivadas e comercializadas sementes com o nome “Capim Annoni-2”, para os estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal (FERREIRA, 2011). Entretanto, em março de 1979, através da portaria MA nº 205 do Ministério da Agricultura, foi proibida a comercialização, o transporte, a importação e a exportação de sementes e mudas no Rio Grande do Sul.

Com o avanço das pesquisas sobre a espécie, foram descobertas características indesejáveis, sendo então classificada como planta invasora. Dentre essas características destaca-se a rejeição pelos animais, em função do alto teor de fibras e baixo valor nutricional (SCHEFFER-BASSO et al., 2016); rápido desenvolvimento, fase reprodutiva extensa, alta produção de sementes, presença de substâncias alelopáticas potencialmente prejudiciais às espécies forrageiras nativas (COELHO, 1986; FAVARETTO et al., 2011); alta resistência a tração mecânica e baixa produção animal. Após estas constatações, ficou evidente que a espécie é inapta para produção de pastagens (ALFAYA et al., 2002).

A similaridade botânica do capim annoni com as espécies forrageiras nativas ou cultivadas dificulta o seu controle em pastagens naturais. Soma-se a isso o fato de a produção de sementes dessa espécie ser muito alta, podendo um único indivíduo gerar mais de 300.000 sementes (REIS, 1993; LORENZI, 2000). A alta dormência das sementes também favorece sua manutenção no banco de sementes do solo, proporcionando reinfestações contínuas. Outro agravante é o fato de o capim annoni apresentar efeitos alelopáticos capazes de influenciar a germinação ou limitar o crescimento das forrageiras nativas, reduzindo a capacidade de regeneração da vegetação nativa do bioma Pampa (COELHO, 1986), o que reflete diretamente na redução da biodiversidade deste importante ecossistema natural que fornece armazenamento de carbono no solo, controle da erosão, infiltração de água no solo, disponibilidade de polinizadores e produção de forragem (PILLAR et al., 2009). Assim, o alto poder de infestação do capim annoni representa um risco ambiental para a integridade do bioma Pampa.

Os métodos convencionais de controle de *E. plana* tem como base o controle químico e a realização da rotação com culturas anuais e plantas forrageiras cultivadas (REIS e COELHO, 2000), o que implica na supressão e em alguns casos na eliminação total do campo nativo, além da possibilidade de reinfestação da área pelo rico banco de sementes de capim annoni (GOULART et al., 2009). Algumas dessas práticas de controle desenvolvidas são relativamente eficientes, porém não tem como princípio a preservação da vegetação nativa, sendo, portanto, limitadas do ponto de vista da conservação da biodiversidade (MEDEIROS e FOCHT, 2007).

No anseio por métodos alternativos eficientes, um fator importante a se considerar é o conhecimento limitado que se tem sobre a fisiologia do desenvolvimento do capim annoni e suas respostas a condições de adversidades. Essas informações são importantes para que se possam elucidar aspectos de

resistência e vulnerabilidade, para que então sejam elaboradas estratégias pontuais de combate a essa planta invasora. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação, *in vitro*, de sementes de capimannoni em resposta a diferentes períodos de escuro.

Os dados apresentados neste capítulo fazem parte de um projeto aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) visando compreender melhor a fisiologia do capimannoni e suas respostas às condições de estresse, com o propósito de buscar alternativas sustentáveis de manejo que contribuam para o processo de prevenção e controle da expansão desta espécie no bioma Pampa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes maduras de capimannoni foram coletadas manualmente na região fisiográfica da Campanha do Rio Grande do Sul, nos municípios de Hulha Negra e São Gabriel, durante a primavera do ano de 2014. As sementes foram secas à temperatura ambiente, em local ventilado sem controle de temperatura e umidade. O excesso de impurezas foi separado manualmente e com o auxílio de peneiras.

Previamente à instalação dos ensaios *in vitro*, as sementes passaram por um processo de desinfestação, definido em testes preliminares. A desinfestação consistiu de uma lavagem com água destilada e autoclavada adicionada de uma gota de detergente (neutro) comercial para cada 100 mL de água durante dois minutos, seguida de lavagem com hipoclorito comercial (2,5%) e água na proporção 1:1 durante cinco minutos e finalizada com cinco enxagues com água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram distribuídas em placas de Petri (90 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar e autoclavado por 20 minutos a 120 °C e 1 atmosfera.

O material foi mantido em sala de crescimento climatizada com temperatura de 25 °C ± 2 durante todo o período do experimento. A condição de luminosidade variou conforme os tratamentos utilizados.

Os tratamentos consistiram na exposição das sementes a diferentes períodos de escuro (0; 7; 14; 21 e 28 dias). Após o tempo de escotofase estipulado para cada tratamento, o material permaneceu sob o fotoperíodo de 16/8 h L/E, ou seja, as placas permaneciam completamente no escuro, conforme cada tratamento, até serem expostas ao fotoperíodo da sala (16/8 h L/E), irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

Utilizaram-se 12 placas de Petri contendo seis sementes por tratamento. Aos 40 dias após a semeadura, foi avaliado o percentual das sementes germinadas e o número médio de folhas por plântula. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (α= 0,05), com o auxílio do software BioEstat 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a porcentagem de germinação, de um modo geral, tenha sido baixa, como é possível observar no próprio controle (exposto desde a inoculação ao fotoperíodo de 16/8 luz/escuro), a manutenção das sementes em períodos contínuos de escuro influenciou negativamente a germinação do capim annoni (Figura 2). A baixa porcentagem de germinação pode ser atribuída ao fato de não ter sido aplicado tratamento de escarificação e tampouco seleção das sementes. Já no primeiro período de exposição ao escuro (sete dias) ocorreu uma redução significativa (quase 50%) na germinação das sementes em relação ao controle. Este efeito foi mais intenso para as sementes pertencentes ao tratamento com 28 dias de escuro, onde se observou uma redução de aproximadamente 75% na germinação (Figura 2).

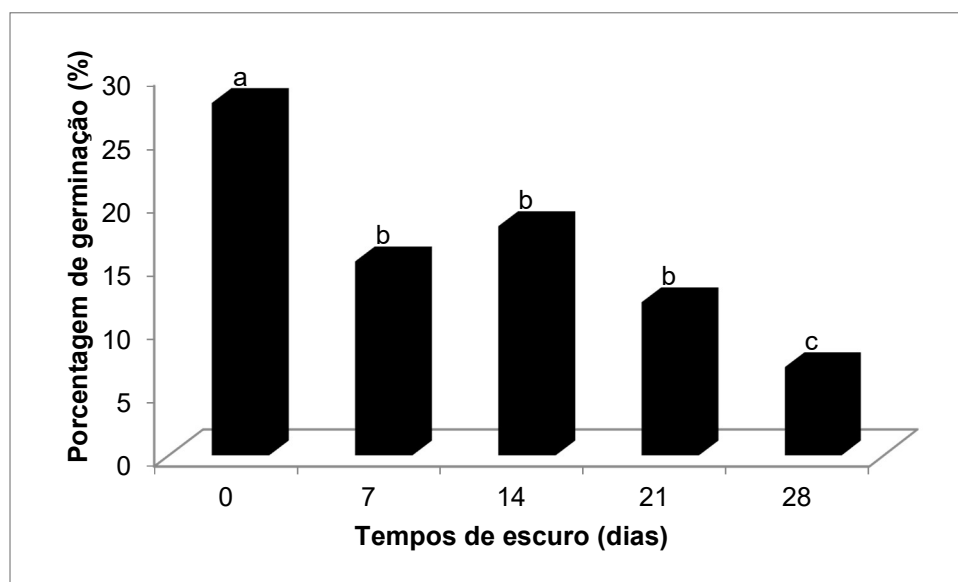


Figura 2: Efeito dos tempos de escuro na taxa de germinação de *Eragrostis plana* Nees aos 40 dias de condição de cultivo in vitro.

A germinação é um processo fisiológico complexo que se inicia com a entrada de água na semente quiescente e termina com a emergência de parte do eixo embrionário de dentro dos envoltórios seminais (LABOURIAU, 1983; BEWLEY, 1997). Este processo é influenciado por mecanismos inerentes à própria semente ou ainda por condições ambientais inadequadas, como foi observado no presente estudo pela redução da germinação mediante a ausência de luz.

Neste sentido, os resultados do presente estudo indicam que o sombreamento pode ser determinante na germinação das sementes de capim annoni. Observações informais destacam que o capim annoni é uma planta que necessita considerável luminosidade para o seu desenvolvimento, além de ser muito resistente à restrição hídrica, ou seja, suporta períodos de seca. Essa relativa resistência confere o sucesso da espécie em áreas em que o campo nativo é mais baixo, mais exposto ao dessecamento e com boas condições de luminosidade (OTT

e AMARAL, 2016), como ocorre nas pastagens naturais do bioma Pampa. Talvez este seja um dos fatores responsáveis pela elevada ressurgência a campo do capim annoni após tentativas de controle químico, quando não há especificidade de controle, sendo o banco de sementes presente no solo exposto diretamente à luminosidade natural, a qual contribui para a germinação.

Uma parceria entre FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária); FZB (Fundação Zoobotânica) e EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Pecuária Sul resultou na condução de um estudo com a utilização do princípio do sombreamento por silvicultura, utilizando bosques de acácia (*Acacia mearnsii*) para o controle do capim annoni. Após quatro anos de implantação, os autores observaram que o sombreamento não apenas diminuiu a infestação por capim annoni, mas também suprimiu o restante da vegetação (AMARAL et al., 2016). Na segunda fase deste estudo, foi realizado um desbaste nas plantas de acácia, através do corte de algumas linhas de plantio, para permitir a entrada de luz. Após o desbaste, poucas plantas de capim annoni vigoraram, embora a presença de outras invasoras tenha sido registrada pelos autores (AMARAL et al., 2016).

Para várias espécies vegetais a luminosidade é um fator importante para a promoção da germinação das sementes, nestes casos é dito que tais espécies apresentam fotoblastismo positivo. Por outro lado, há espécies em que o comportamento de germinação das sementes é melhorado na ausência de luz, estas apresentam fotoblastismo negativo (LABOURIAU, 1983). Com base nessas informações, é possível sugerir que existe uma tendência ao fotoblastismo positivo em sementes de *E. plana*.

Considerando as teorias da ecologia populacional, sabe-se que a germinação de plantas pioneiras e tardias difere principalmente em relação à quantidade de luz e qualidade espectral (BAZZAZ e PICKET, 1980). O requisito de energia luminosa para uma germinação eficiente de *E. plana* ajuda a explicar sua ampla dispersão e cobertura no bioma Pampa, pois neste bioma existem amplas extensões de campo nativo contendo áreas com solo descoberto que fornecem grande incidência luminosa.

O número médio de folhas das plântulas de capim annoni, aos 40 dias de cultivo in vitro, foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) pelo tempo de manutenção no escuro. Esta redução foi drástica com o aumento número de dias em exposição ao escuro (Figura 3). Quanto maior o tempo de permanência no escuro, além do maior número de sementes não germinadas, foi observado que, dentre as plântulas germinadas, as folhas emitidas apresentavam-se visivelmente estioladas (dados não mostrados) nestes tratamentos.

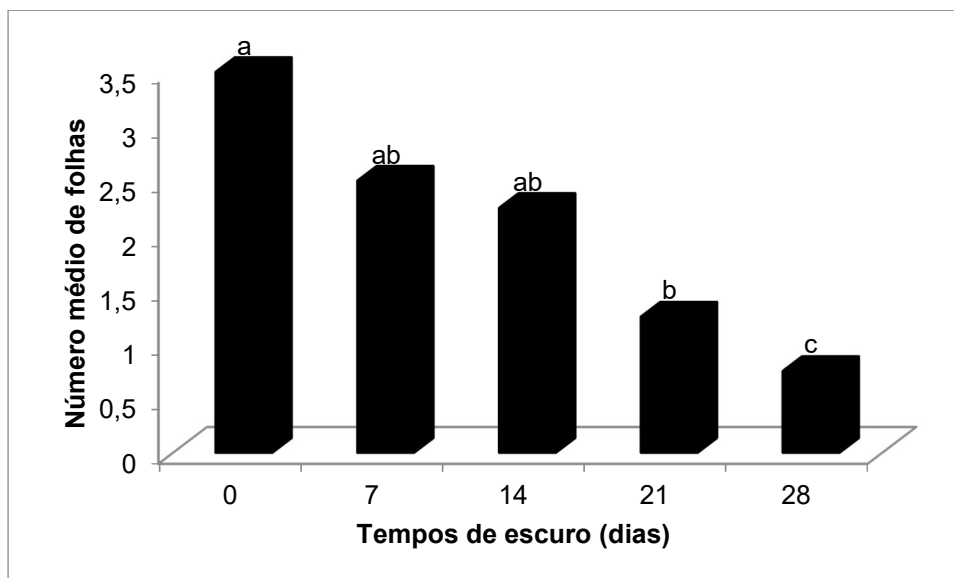


Figura 3: Número médio de folhas de plântulas de *Eragrostis plana* Nees em resposta ao tempo de exposição ao escuro aos 40 dias de condição de cultivo in vitro.

A luz é um fator de fundamental importância no crescimento inicial de plantas. Diferentes condições de luminosidade provocam alterações morfofisiológicas como forma de adaptação às diferentes condições. Esta adaptação está relacionada a um ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. Neste sentido, o número e a área foliar são, em geral, variáveis que podem ser alteradas em respostas a variações na luminosidade.

Lopes (2003) reporta que a maioria das plantas forrageiras tropicais são plantas de sol e não apresentam tolerância desenvolvida ao sombreamento. Esse comportamento justificaria a redução no crescimento em condições onde a competição por luz ocorrer devido ao sombreamento pelas plantas vizinhas. GAUTIER et al. (1999) verificaram que o efeito quantitativo do sombreamento (redução de fluxo fotossintético) reduziu a taxa de aparecimento de folhas, por outro lado o efeito qualitativo do sombreamento (redução da razão V/VD) não teve efeito na taxa de aparecimento de folhas.

Alguns estudos indicaram que o sombreamento diminui a altura da planta de *E. plana* e o perfilhamento, reduzindo assim o diâmetro do agregado e, possivelmente, a produção de sementes (FRANTZ et al., 2015; MARTINS et al., 2010). No entanto, esses estudos anteriores não fornecem informações sobre o efeito do sombreamento na germinação das sementes e nossos resultados mostram que a falta de luz retardou a germinação do capim annoni, o que pode ser útil em programas para conter esta espécie invasora.

Nossos resultados confirmam o comportamento oportunista do capim annoni, já que ocorre, por exemplo, em solo desnudo, onde a frequência e a escala da perturbação deixam o sistema fragilizado e exposto à alta incidência luminosa. Assim é possível sugerir que o manejo da luz pode ser um fator determinante na redução da regeneração do capim annoni, visto que em condições de sombreamento sua

capacidade competitiva pode ser reduzida em relação à vegetação nativa.

4. CONCLUSÃO

A luz é um fator condicionante para a germinação e o crescimento inicial de *Eragrostis plana* Nees e pode ser considerado no planejamento de futuras estratégias de controle desta espécie invasora no sul do Brasil, em especial no bioma Pampa.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa; à FAPERGS pela concessão da bolsa de Iniciação Tecnológica e de Inovação (PROBITI).

REFERÊNCIAS

ALFAYA, H.; SUÑÉ, L. N. P.; SIQUEIRA, C. M. G. Efeito da amonização com uréia sobre os parâmetros de qualidade do feno do capim-annoni2 (*Eragrostis plana* Nees). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 842-851, 2002.

AMARAL, G. A.; MALDANER J.; TAROUCO, A. K.; AITA, M. F.; OTT, A. P.; OTT, R. O sombreamento de áreas de campo como alternativa ao controle do capimannoni e a conservação do Pampa. In: **Natureza em Revista** – Publicação editada pela Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Edição 14, 2016, 110 p.

BAZZAZ, F. A.; PICKET, S. T. A. Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. **Annual Review of Ecology and Systematics** v.11, p. 297- 310, 1980.

BEWLEY, J.D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v.9, n 7, p.1055-1066, 1997.

BUCKUP, L.; SUERTEGARAY, D.; NABINGER, C.; BRACK, P.; BOLDRIN, I. I.; LANNA, A. A.; PILLAR, V. P.; BUCKUP, G. B. **Porque respeitar o zoneamento**. Porto Alegre: UFRS, 19 p. 2007.

COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no Capim Annoni-2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, v. 21, n. 3, p. 255-263, 1986.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; FELINI, V.; ZOCH, A. N.; CARNEIRO, C. M. et

al. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1168-1172, 2011.

FERREIRA, A.T. Uma “exótica” no campo: o capim annoni-2 e suas influências na produção pecuária da coxilha de São Rafael, no município de Quaraí – RS. Trabalho de conclusão apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Planejamento e Gestão para o desenvolvimento Rural, UFRGS. 2011.

LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: O.E.A. 1983. 174p.

LOPES, B. A. **Aspectos importantes da fisiologia vegetal para o manejo**. Trabalho apresentado como parte das exigências da disciplina ZOO 750. 55 pg., 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 324 p.

Frantz, A. C. L.; Maia, M.; Varella, A. C.; Tadêo, R. W. M.; Vieira, I. M. B. P. 2015. Uso de estrados de madeira em diferentes níveis de sombreamento na avaliação do crescimento e desenvolvimento de plantas de capim-annoni. **V Simposio de iniciação científica da Embrapa Pecuária Sul, Anais...** Embrapa Pecuária Sul Bagé, RS.

GAUTIER, H.; GRANCHER, C.; HAZARD, I. Tillering responses to the light environment and to defoliation in populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) selected for contrasting leaf length. **Annals of Botany**, London, v.83, p.423-429, 1999.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; PEREZ, N. B.; KALSING, A. Controle de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) com herbicidas pré-emergentes em associação com diferentes métodos de manejo do campo nativo. **Planta Daninha**. Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 181-190, 2009.

MARTINS, L. A.; MONTARDO, D. P.; RIGHI, D. M.; SISTI, R. N.; PEREZ, N. B. 2010. Avaliação do número de plantas de capim-annoni-2 sob efeito de sombreamento. In: Congrega URCAMP 2010 – 8ª Mostra de Iniciação Científica. 2010 **Anais...** Congrega URCAMP, p. 238.

MEDEIROS, R.B.; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.13, n.1-2, p.105-114, 2007.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

OTT, R., AMARAL, G. A. Projeto capim-annoni. In: **Natureza em Revista – Publicação**

editada pela Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Edição 14, 2016, 110 p.

PILLAR, V.D.P.; BOLDRINI, I.I. HASENACK, H.; JACQUES, A. V. A.; BOTH, R. **Estado atual e desafios para a conservação dos campos**. Workshop - UFRGS, Porto Alegre, 2006.

PILLAR, V. P.; MULLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. (Eds). **Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. 403 p.

PILLAR, V.D.; TORNQUIST; C.G.; BAYER, C. The southern Brazilian grassland biome: soil carbon stocks, fluxes of greenhouse gases and some options for mitigation. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, p.673-681, 2012.

REIS, J.C.L. Capim Annoni2: origem, morfologia, características, disseminação. In: REUNIÃO REGIONAL DE AVALIAÇÃO DE PESQUISA COM ANNONI, 2., 1993, Bagé, RS. **Anais...** Bagé: EMBRAPA-CPPSUL, 1993. p.5-23.

REIS, J. C. L.; COELHO, R. W. Controle do Capim-Annoni-2 em Campos Naturais e Pastagens. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. 21 p. Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 22.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; CECCHIN, K.; FAVARETTO, A. Dynamic of dominance, growth and bromatology of *Eragrostis plana* Nees in secondary vegetation area. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 3, p. 582-588, 2016.

ZENNI, R.D.; ZILLER, S.R. An overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.3, 2011.

ABSTRACT: Among the invasive exotic species with the greatest impact in the southern region of Brazil, the annoni grass (*Eragrostis plana* Nees) stands out. Recent data indicate that approximately 20% of the rural vegetation of Rio Grande do Sul is infested by this invasive species, introduced accidentally in the 1950s. The objective of this work was to evaluate the in vitro germination of annoni grass seeds in response to lack of light. Seeds of annoni grass were disinfested, seeded in Petri dishes containing MS medium, and kept in a growth room with a temperature of $25^{\circ} \text{C} \pm 2$. The treatments consisted in exposing the seeds to different periods of darkness (0, 7, 14, 21 and 28 days). After the dark time of each treatment the material remained under the photoperiod of 16/8 h L/D. Twelve petri dishes containing six seeds per treatment were used. At 40 days after sowing, the percentage of germinated seeds and the average number of leaves per seedlings were evaluated. The data were submitted to ANOVA and the means were compared by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). Seeds that remained 28 days in the dark presented germination percentage about five times lower than those exposed to the

photoperiod of 16/8 L/D from seeding. Similarly, the mean number of leaves significantly reduced with dark exposure. These results indicate that the light is a factor that regulates the seed germination potential of *E. plana*.

KEYWORDS: Invasive exotic species; light; abiotic factors; resurgence.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE NASCENTES NA BACIA DO ARROIO ANDRÉAS, RS, BRASIL, ATRAVÉS DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E GENTOXICOLÓGICOS UTILIZANDO O ENSAIO COMETA

**Daiane Cristina de Moura
Cristiane Márcia Miranda Sousa
Alexandre Rieger
Eduardo Alcayaga Lobo**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE NASCENTES NA BACIA DO ARROIO
ANDRÉAS, RS, BRASIL, ATRAVÉS DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E
GENTOXICOLÓGICOS UTILIZANDO O ENSAIO COMETA**

Daiane Cristina de Moura

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), aluna do Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental (PPGTA) - Mestrado

Santa Cruz do Sul, RS

Cristiane Márcia Miranda Sousa

UNISC, aluna do PPGTA - Mestrado

Santa Cruz do Sul, RS

Alexandre Rieger

UNISC, Professor do Departamento de Biologia e Farmácia

Santa Cruz do Sul, RS

Eduardo Alcayaga Lobo

UNISC, Professor do Departamento de Biologia e Farmácia da e do PPGTA

Santa Cruz do Sul, RS

RESUMO: A pesquisa foi desenvolvida em áreas de preservação de recursos hídricos (nascentes) na Bacia Hidrográfica do Arroio Andréas, RS, implantadas através do Pagamento de Serviços Ambientais (PSA). Tradicionalmente, a avaliação de impactos ambientais neste ecossistema é realizada pela medição de variáveis físicas, químicas e microbiológicas, contudo, cabe destacar a importância da utilização de novas metodologias, como ensaios de ecotoxicidade e genotoxicidade. Neste contexto, a presente pesquisa objetivou avaliar a qualidade da água de nascentes na Bacia do Arroio Andréas, RS, através de ensaios ecotoxicológicos e genotoxicológicos, utilizando o Ensaio Cometa (EC) com o organismo-teste *Daphnia magna* (STRAUS, 1820). Foram avaliados 20 pontos, nos meses de setembro e dezembro de 2015 e março e junho de 2016. *D. magna* foi empregada nos testes de exposição aguda conforme a norma técnica brasileira NBR-12713. A aplicação de EC permitiu o cálculo de Frequência de Dano (FD) e o Índice de Dano (ID) no ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Empregou-se a prova não paramétrica de Mann-Whitney com um nível de significância de 5%. Os resultados apontaram as maiores genotoxicidades nos pontos P10, P11, P12, P17 e P20, entretanto, pelas análises convencionais físicas, químicas e microbiológicas, 65% destes pontos foram classificados com um Índice de Qualidade da Água (IQA) “bom”, cancelando a importância da utilização de ensaios genotoxicológicos (EC) como ferramentas complementares na avaliação da qualidade da água, uma vez que detecta alterações mesmo em águas consideradas de boa qualidade.

PALAVRAS - CHAVE: Pagamento por Serviços Ambientais (PSA), preservação de recursos hídricos, ensaios ecotoxicológicos, ensaios genotoxicológicos, Bacia do Arroio Andreas, RS

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a água é considerada um recurso natural abundante quando comparada à atual demanda, embora existam áreas muito secas onde a água é tão preciosa que é utilizada apenas para atender às necessidades humanas. Apesar de detentor de 8% de toda a água doce do mundo, a situação no país é delicada. A maioria do volume disponível (80%) está na região amazônica, e o remanescente (20%), encontra-se desigualmente dividido entre as demais regiões, nas quais vivem 95% da população brasileira (UNEP-IETEC, 2001). Na região Sul há escassez de água apesar dos rios de grande porte e vazão. Essa escassez se deve aos efeitos cumulativos dos processos ambientais e usos múltiplos que são de amplo espectro: agricultura, indústrias, piscicultura, navegação e recreação (TUNDISI, 2000).

Neste sentido, dentre as alternativas complementares de desenvolvimento local-sustentável, o Pagamento por Serviços Ambientais (PSA) vem se destacando como uma política recente e inovadora de conservação ambiental. Define-se PSA como a transferência voluntária de recursos financeiros de beneficiários de tal serviço a pessoas que exercem práticas para um manejo adequado do meio ecossistêmico onde tal serviço é exercido ou compensado (WUNDER, 2008). O PSA, por ser um conceito e uma WUNDER para avaliar a qualidade da água das nascentes do Arroio Andréas, desde as análises físicas e químicas convencionais até enfoques biológicos, com destaque para a utilização de bioindicadores na avaliação da qualidade da água como, por exemplo, o uso do microcrustáceo *Daphnia magna* (STRAUS, 1820), popularmente chamado de “pulga d’água”, comumente utilizado em ensaios ecotoxicológicos para avaliação de impactos ambientais, nos quais se testam os impactos potencialmente deletérios de substâncias ou compostos químicos que agem como poluentes sobre os organismos vivos, possibilitando a definição de padrões de qualidade da água.

Cabe destacar, entretanto, que outros testes podem ser empregados a fim de complementar os dados obtidos pelos testes ecotoxicológicos, como testes genotoxicológicos, com destaque para o Ensaio Cometa (EC), teste que vem se mostrando uma importante ferramenta uma vez que detecta alterações no material genético passíveis de reparo, e que não afetam a viabilidade nem a vitalidade do organismo teste, ou seja, capaz de detectar alterações antes mesmo que essas causem a mortalidade dos seres vivos em estudo.

Neste contexto, a presente pesquisa visa avaliar a qualidade da água de nascentes na Bacia Hidrográfica do arroio Andréas, RS, através de ensaios ecotoxicológicos e de genotoxicidade, utilizando o Ensaio Cometa, tendo como organismo-teste o microcrustáceo *Daphnia magna*, visando fornecer subsídios tecnológicos ao enfoque toxicológico de avaliação ambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo/amostragem

A bacia do Arroio Andréas está localizada no município de Vera Cruz, RS, e tem fundamental importância como manancial para abastecimento de água do mesmo. Apresenta uma área de drenagem de 80,2 km², valor que classifica esta bacia como “pequeno arroio de ordem 2-5”, seguindo a classificação descrita em Chapman (1992). O município tem 25.700 habitantes e uma área territorial de 309.621 km² (IBGE, 2016).

Ao longo desta bacia foram selecionados 20 pontos de coleta em áreas de preservação (nascentes), tendo havido coletas trimestrais nos meses de setembro e dezembro de 2015 e março e junho de 2016 (Fig. 1). É válido lembrar que esta pesquisa vincula-se a um projeto de maior envergadura denominado “Protetor das Águas”, projeto que conta com a parceria da UNISC, Empresa Universal Leaf Tabacos e Fundación Altadis, e visa proteger as nascentes e áreas ripárias da referida bacia, garantindo a preservação dos recursos hídricos mediante o pagamento aos agricultores de pequenas propriedades pelo fornecimento de serviços ambientais (PSA) de proteção das nascentes e áreas ripárias que se situam em suas propriedades.

2.2 *Daphnia magna*

Para a realização dos ensaios, neonatos de *D. magna* (Fig. 2) foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), de acordo com a norma técnica brasileira 12713 (ABNT, 2009). Os neonatos foram empregados nos testes com idade entre 2 a 26 horas. Os indivíduos foram cultivados em água reconstituída com foto-período de 16 horas luz e 8 horas escura, a uma temperatura de aproximadamente 20°C ± 2°C; sendo alimentados diariamente com algas da espécie *Desmodesmus subspicatus*.

Para aferição do sucesso do cultivo de *D. magna*, realizou-se um teste de sensibilidade, para tal uma amostra do lote de indivíduos foi submetida ao teste de sensibilidade de Dicromato de Potássio, conforme as recomendações da norma da ABNT NBR 12713 (ABNT, 2009). Os resultados indicaram que o cultivo de *D. magna* estava apto para a utilização nos testes.

2.3 Testes ecotoxicológicos com *Daphnia magna*

Testes ecotoxicológicos com *D. magna* foram realizados em duplicata. Consistem na exposição de 10 indivíduos em 25 ml da amostra. A exposição foi do tipo aguda e após 48 horas foi realizado o levantamento de indivíduos sobreviventes e conforme os resultados encontrados a amostra foi enquadrada em seu grau de

toxicidade, seguindo a norma 12713 (ABNT, 2009), que classifica uma amostra como não tóxica quando esta apresentar uma taxa de sobrevivência superior a 80%.

Figura 1 - Mapa da área de estudo mostrando a localização da bacia do Arroio Andréas, em relação ao Estado do Rio Grande do Sul, destacando os pontos de coleta selecionados.

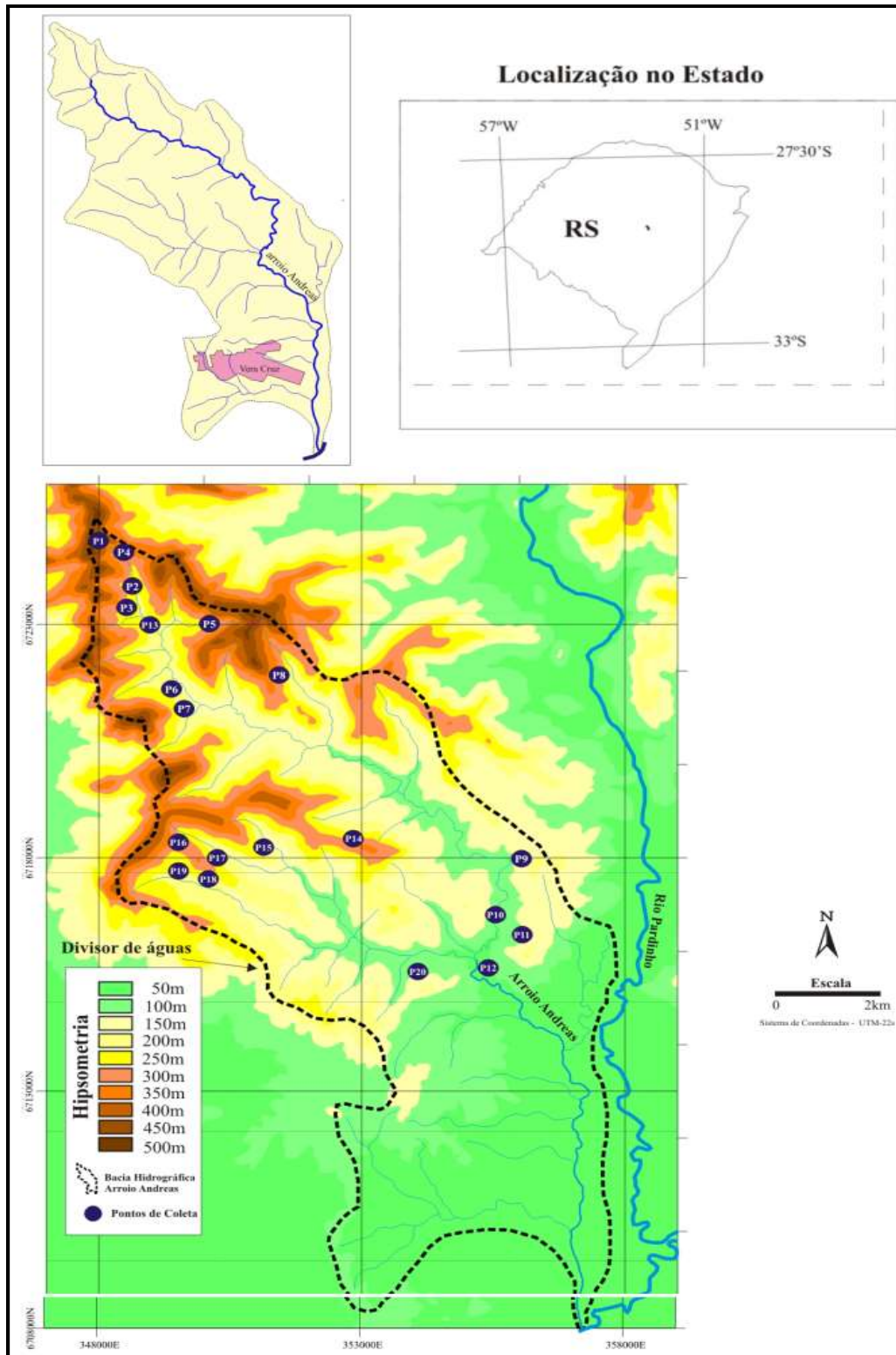
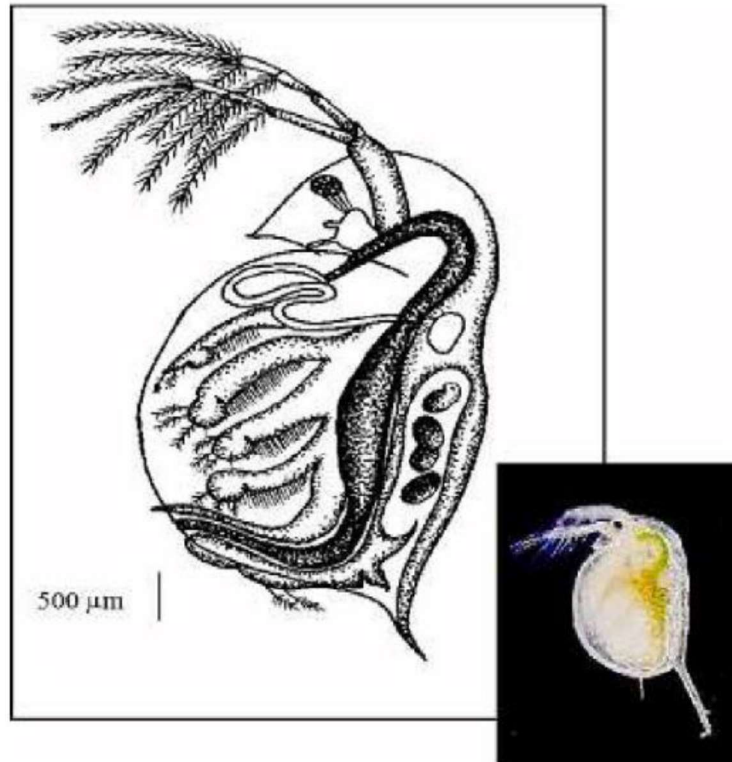


Figura 2 - Representação de *Daphnia magna*



2.4. Testes genotóxicológicos com *Daphnia magna*

Para a realização do teste genotóxicológico adotou-se o EC, sendo que neonatos de *D. magna* foram submetidos ao teste de exposição aguda de 48 horas com 20 indivíduos por amostra, utilizando 25 ml de amostra para cada 10 exemplares. Para cada teste utilizou-se um Controle Negativo (CN) composto por água reconstituída.

Após a exposição, os neonatos foram transferidos com o auxílio de pipetador automático e armazenados em solução contendo 850 µl de tampão fosfato salino (PBS com pH 7,4), 20mM de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) e 50 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Posteriormente o material foi macerado e centrifugado por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C e a velocidade de 2.100 rpm, sendo o sobrenadante removido e descartado. O EC foi desenvolvido com base no trabalho de Park e Choi (2007), com alterações necessárias para a utilização de *D. magna*, conforme Zenkner (2012). Nesta etapa o material foi exposto em 5 lâminas pré-cobertas e acrescido de agarose, sendo 20µL de material e 80 µL de agarose de baixo ponto de fusão, mantida aquecida a 37°C.

A suspensão celular juntamente com a agarose foi disposta sobre a lâmina e recoberta por lamínula. Após 10 minutos sobre a refrigeração, retiraram-se as lamínulas e as lâminas foram submetidas a uma solução de lise por 1 hora, processo esse que consiste no rompimento das membranas, tanto a celular, quanto a nuclear,

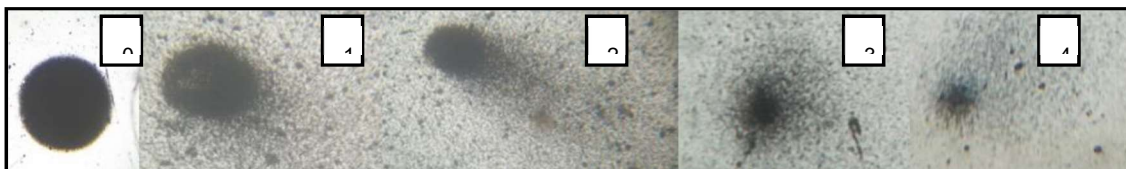
expondo assim o material genético.

A solução de lise é composta de 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA e 10 mM TRIS, com pH 10, no momento de uso se adiciona 1% Triton X-100, e 10% DMSO. Inicia-se então a eletroforese alcalina (pH>12), para tal as lâminas foram submersas durante 15 minutos em tampão eletroforese para que ocorresse o desnovelamento do DNA. A seguir, deu-se seguimento a eletroforese (0,7 V/cm; 300 mA) com duração de 20 minutos. Terminada a eletroforese as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4M), lavadas com água destilada e postas para secar naturalmente. Após foram fixadas e secas novamente, para receberem a coloração a base de nitrato de prata.

No processo de coloração, as lâminas foram reidratadas com água destilada, posteriormente submersas em uma solução a base de nitrato de prata para que ganhassem cor, foram acondicionadas em shaker com agitação de 120 RPM, a 37°C por 35 minutos, seguindo a metodologia descrita em Nadin, Vargas-Roig e Ciocca (2001). Após o processo de coloração as lâminas foram então analisadas em microscopia óptica convencional (aumento de 400x), para cada lâmina se contabilizou 100 nucleóides, totalizando 500 nucleóides por amostra para D. magna

Os nucleóides foram quantificados e classificados em 5 tipos de danos (0, 1, 2, 3 e 4), quanto maior o dano maior o dígito correspondente, sendo a classe 0 destinada para nucleóides livres de dano (Fig. 3).

Figura 3 - Classes de Danos dos nucleóides. Em sequência nucleóides de dano 0, 1, 2, 3 e 4 (aumento de 400x).



Com a classificação dos nucleóides é possível obter dois tipos de informações o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD), ambos comparados ao Controle Negativo (CN) do teste. O ID corresponde ao total do resultado da multiplicação entre o dígito denominador de cada classe (0, 1, 2, 3 e 4) e o número de nucleóides de cada classe. Já a FD é calculada como a porcentagem de todos os nucleóides danificados (classe 1 até 4) em relação ao total de nucleóides contados.

Visando a padronização dos resultados de modo a poder compará-los ao longo do tempo e entre as diferentes amostras, os valores de FD e ID foram estandarizados em relação à respectiva média do grupo CN. O valor padronizado foi obtido pela razão entre a FD (ou ID) de cada amostra pela respectiva FD (ou ID) da média do grupo CN de cada teste.

No processamento da informação, empregou-se a estatística descritiva para a tabulação dos dados (CALLEGARI-JACQUES, 2006). As diferenças estatísticas foram estabelecidas utilizando a prova estatística não paramétrica de Mann-Whitney. Trabalhou-se com níveis de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram processadas utilizando-se o programa estatístico GraphPadPrism6.01 (GraphPad,

2012).

2.5 Análises físicas, químicas e microbiológicas

Além das coletas para as análises ecotoxicológicas e genotoxicológicas, coletaram-se amostras para medição de variáveis físicas, químicas e microbiológicas, recolhidas na superfície utilizando-se frascos de vidro e/ou polietileno, de 300 a 1000 ml, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e analisadas no dia seguinte à coleta. As técnicas utilizadas na coleta das amostras e na determinação analíticas das variáveis físicas, químicas e microbiológicas encontram-se descritas em APHA (2005).

Para a avaliação ambiental foram consideradas como parâmetros variáveis: temperatura, pH, turbidez, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio após cinco dias, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal total, fosfato, sólidos totais dissolvidos e coliformes termotolerantes.

Com base nas análises ambientais, a avaliação da qualidade da água foi feita utilizando o Índice de Qualidade da Água (IQA), originalmente desenvolvido pela National Sanitation Foundation (NFS) dos Estados Unidos, e adaptado aos sistemas lóticos sul brasileiros por Moretto et al. (2012). Os cálculos do IQA forma feitos utilizando o programa IQAData, desenvolvido por Posselt et al. (2015). A tabela 1 apresenta as faixas de qualidade da água para interpretação do valor de IQA.

Tabela 1. Faixas de qualidade de água para o IQA. Retirado de Posselt et al. (2015).

Faixas de IQA	Classificação da qualidade da água
0 - 25	Muito Ruim
26 - 50	Ruim
51 - 70	Regular
71 - 90	Bom
91 - 100	Excelente

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes ecotoxicológicos

No teste ecotoxicológico com exposição aguda (48h) de *D. magna* (20 indivíduos/amostra) encontrou-se mortalidade em algumas amostras (Tab. 2).

Tabela 2 - Taxa de Sobrevivência em *D. magna* utilizando Ensaio Ecotoxicológico referente as amostras.

Amostras	Sobrevivencia - %			
	Set/15	Dez/15	Mar/16	Jun/16
P1	100	100	100	95
P2	100	100	100	95

P3	95	90	95	95
P4	100	100	95	100
P5	100	100	100	100
P6	100	100	100	100
P7	100	100	100	100
P8	100	100	95	85
P9	100	100	100	100
P10	100	100	100	100
P11	100	100	100	100
P12	90	100	100	100
P13	100	90	90	100
P14	95	100	90	85
P15	100	90	100	95
P16	100	80	95	100
P17	85	90	90	90
P18	90	100	100	90
P19	0	90	90	90
P20	95	100	90	90

A norma brasileira ABNT 12713 (2009), classifica as amostras “não tóxicas”, quando *D. magna* apresentar sobrevivência superior a 80%. Ou seja, com execução de P19 na coleta de Setembro de 2015, nenhuma amostra foi enquadrada como tóxica conforme a mesma.

3.2 Testes genotoxicológicos

Os testes genotoxicológicos realizados através do EC em *D. magna* revelam genotoxicidade para algumas amostras, tanto para FD quanto para ID (Tab. 3, 4, 5 e 6).

Tabela 3 - Resultados de FD (Frequência de Dano) e ID (Índice de Dano) em *D. magna* referente ao Controle Negativo (CN) e as amostras para a amostragem de Setembro de 2015.

Set/15								
Amostras	Média	FD			ID			
		DP	Mediana	P	Média	DP	Mediana	P
CN	1	± 0,1642	1,061		1	± 0,2999	1,059	
P1	1,97	± 0,375	1,97	0,0079**	1,929	± 0,4911	1,765	0,0079**
P2	1,727	± 0,2235	1,818	0,0079**	1,776	± 0,3206	1,824	0,0159*
P3	1,636	± 0,3151	1,515	0,0079**	1,541	± 0,2833	1,529	0,0238*
P4	1,485	± 0,6746	1,364	0,1746	1,471	± 0,8161	1,294	0,4444
P5	1,576	± 0,1642	1,667	0,0079**	1,482	± 0,1523	1,471	0,0238*
P6	2,364	± 0,1809	2,348	0,0079**	2,176	± 0,2461	2,118	0,0079**
P7	2,303	± 0,6352	2,273	0,0079**	2,224	± 0,6582	2	0,0079**
P8	1,561	± 0,6574	1,742	0,127	1,388	± 0,6663	1,471	0,2063

P9	2,227	±	0,6122	2,045	0,0079**	2,071	±	0,5724	1,765	0,0079**
P10	2,515	±	0,4094	2,652	0,0079**	2,541	±	0,554	2,529	0,0079**
CN	1	±	0,1708	0,9929		3,07	±	0,6234	3,158	
P11	1,064	±	0,252	1,064	0,7381	3,526	±	1,114	3,333	0,5873
P12	1,078	±	0,2452	1,028	0,8016	3,702	±	1,105	3,596	0,5
P13	0,8582	±	0,2384	0,8865	0,3095	2,667	±	0,6924	2,632	0,3889
P14	0,9574	±	0,1893	0,922	0,6825	3,228	±	0,5832	2,895	0,7302
P15	1,064	±	0,2352	1,028	0,7302	4,105	±	0,8737	3,947	0,1111
P16	0,9504	±	0,283	0,7801	0,6905	3,228	±	0,9103	2,719	0,881
P17	1,142	±	0,2104	1,17	0,246	4,211	±	1,099	4,298	0,0952
P18	1,156	±	0,3799	0,922	0,8492	4,281	±	1,499	3,596	0,2381
P20	1,248	±	0,09179	1,206	0,0476	5,018	±	0,6517	5,175	0,0079**

Utilizou-se o teste de Mann-Whitney, comparando cada amostra contra o CN (*p<0,05; **p<0,01
p<0,001, *p<0,0001).

Observa-se que as amostras, P1, P2, P3, P5, P6, P7, P9 e P10, foram capazes de gerar alterações ao material genético do organismo-teste, tanto em FD como para ID, além de P20 somente para ID. Levando em consideração apenas os valores da FD de cada amostra e comparando os mesmos com a FD do CN, verifica-se que P10 apresentou a maior resposta genotóxica (2,5 vezes maior). Em relação a ID, a amostra com diferença mais relevante em comparação ao CN foi P20 (5 vezes maior).

Tabela 4 - Resultados de FD (Frequência de Dano) e ID (Índice de Dano) em *D. magna* referente ao Controle Negativo (CN) e as amostras para a amostragem de Dezembro de 2015.

Dez/15								
Amostras	FD				ID			
	Média	DP	Mediana	P	Média	DP	Mediana	P
CN	1	± 0,2248	0,9052		1	± 0,2784	1,242	
P1	1,302	± 0,1234	1,293	0,0952	1,265	± 0,1727	1,424	0,0952
P2	1,069	± 0,1196	1,078	0,381	1,02	± 0,1542	0,9934	0,6667
P3	0,9655	± 0,1542	0,9052	0,9365	1,007	± 0,1939	0,894	0,8016
P4	1,121	± 0,3448	1,034	0,6508	1,179	± 0,3647	1,192	0,4444
P5	0,8879	± 0,2869	0,9914	> 0,9999	0,894	± 0,3193	0,9934	0,8492
P6	0,7328	± 0,1056	0,7759	0,0238	0,8013	± 0,1743	0,7616	0,2063
P7	0,9569	± 0,2031	0,9483	0,8175	0,9934	± 0,3115	0,8278	0,8968
P8	0,8966	± 0,09345	0,8621	0,6508	0,9536	± 0,1879	0,8278	0,9048
P9	1,095	± 0,3087	1,164	0,5	1,172	± 0,442	1,258	0,5317

					1			
P10	0,870 7 ± 0,28	0,8621	0,5159	0,940 4 ± 0,328	0,9934	0,8016		
CN	1 ± 0,1016	0,9804		1 ± 0,098 03	1,015			
P11	1,441 ± 0,3053	1,471	0,0238*	1,511 ± 0,284 3	1,579	0,0317*		
P12	1,51 ± 0,1487	1,52	0,0079* *	1,526 ± 0,216 9	1,617	0,0079* *		
P13	1,343 ± 0,4051	1,225	0,0397*	1,474 ± 0,573 5	1,316	0,0317*		
P14	1,078 ± 0,1511	1,127	0,3889	1,023 ± 0,125 8	1,015	0,7302		
P15	1,078 ± 0,2219	1,127	0,6905	1,113 ± 0,254 4	1,165	0,4921		
P16	1,176 ± 0,104	1,176	0,0556	1,135 ± 0,120 1	1,053	0,1984		
P17	0,941 2 ± 0,1527	0,8824	0,4762	0,864 7 ± 0,148	0,8271	0,1429		
P18	0,803 9 ± 0,0890 5	0,8333	0,0238	0,751 9 ± 0,109 6	0,7895	0,0159		
P19	0,911 8 ± 0,2154	0,9804	0,754	0,842 1 ± 0,238 7	0,9399	0,254		
P20	1,225 ± 0,1733	1,176	0,0397*	1,286 ± 0,310 5	1,203	0,0794		

Utilizou-se o teste de Mann-Whitney, comparando cada amostra contra o CN (*p<0,05; **p<0,01
p<0,001, *p<0,0001).

As amostras com potencial genotóxico em Dezembro de 2015 foram, P11, P12 e P13, tanto para FD como ID, e P20 somente para FD. O ponto com o valor da FD mais alterado foi P11 (1,44 vezes maior que CN), já para ID o valor mais alto foi para o P12 (1,5 vezes maior que CN).

Tabela 5 - Resultados de FD (Frequência de Dano) e ID (Índice de Dano) em D. magna referente ao Controle Negativo (CN) e as amostras para a amostragem de Março de 2016.

Mar/16								
Amostras	FD				ID			
	Média	DP	Mediana	P	Média	DP	Mediana	P
CN	1 ± 0,1667		1		1 ± 0,1532		1,009	
P1	1,244 ± 0,2026		1,222	0,0794	1,246 ± 0,3064		1,228	0,1746
P2	1,122 ± 0,1438		1,111	0,373	1,14 ± 0,1886		1,053	0,3333
P3	1,189 ± 0,1648		1,167	0,1429	1,237 ± 0,171		1,316	0,0714
P4	1,033 ± 0,2767		1,056	0,6429	1,026 ± 0,2968		1,053	0,5238
P5	1,333 ± 0,08784		1,333	0,0079**	1,325 ± 0,1135		1,36	0,0159*
P6	1,333 ± 0,3447		1,278	0,0476*	1,281 ± 0,3528		1,272	0,1349
P7	1,167 ± 0,3664		1,167	0,4127	1,132 ± 0,4594		1,053	0,8889
P8	1,344 ± 0,35		1,333	0,0873	1,298 ± 0,3032		1,36	0,1111

P9	1,467 ± 0,3841	1,389	0,0556	1,447 ± 0,4241	1,184	0,0556
P10	1,044 ± 0,09938	1,056	0,5952	1,026 ± 0,1101	1,009	0,8889
CN	1 ± 0,1266	0,9906		1 ± 0,1329	0,9295	
P11	1,717 ± 0,155	1,792	0,0079**	1,885 ± 0,3492	1,891	0,0079**
P12	1,66 ± 0,2779	1,604	0,0079**	1,603 ± 0,3149	1,731	0,0317*
P13	1,472 ± 0,3735	1,509	0,0794	1,936 ± 0,8936	1,955	0,119
P14	1,632 ± 0,3031	1,651	0,0079**	1,686 ± 0,4513	1,731	0,0317*
P15	1,519 ± 0,1126	1,462	0,0079**	1,628 ± 0,3372	1,538	0,0079**
P16	1,179 ± 0,1916	1,085	0,1429	0,9487 ± 0,1371	0,8974	0,4444
P17	1,934 ± 0,1796	1,887	0,0079**	2,436 ± 0,4572	2,372	0,0079**
P18	0,7519 ± 0,1096	0,7895	0,0079	1,731 ± 0,3813	1,603	0,0079**
P19	1,151 ± 0,2177	1,179	0,4127	1,071 ± 0,2836	1,154	0,873
P20	1,387 ± 0,2575	1,321	0,0079**	1,442 ± 0,5958	1,218	0,0397*

Utilizou-se o teste de Mann-Whitney, comparando cada amostra contra o CN (*p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001, ****p<0,0001).

Na coleta de Março de 2016, os pontos enquadrados como genotóxicos foram P5, P11, P12, P14, P15, P17 e P20, tanto para FD como para ID, e P6 somente para FD e P18 somente para ID. Dentre esses, mais uma vez P11 apresentou a maior FD (1,7 vezes maior que CN), para ID, P17 obteve o maior valor (2,4 vezes maior que CN).

Tabela 6 - Resultados de FD (Frequência de Dano) e ID (Índice de Dano) em D. magna referente ao Controle Negativo (CN) e as amostras para a amostragem de Junho de 2016.

Jun/16								
Amostras	FD				ID			
	Média	DP	Mediana	P	Média	DP	Mediana	P
CN	1 ± 0,2175		1,116		1 ± 0,2551		1,08	
P1	1,041 ± 0,1969		1,033	0,5079	0,9877 ± 0,1328		1,049	0,9841
P2	1 ± 0,1443		0,9091	> 0,9999	0,9938 ± 0,1298		0,9568	>0,9999
P3	1,066 ± 0,1287		1,033	0,6905	1,154 ± 0,1754		1,204	0,3333
P4	1,025 ± 0,1383		1,033	0,9683	1,167 ± 0,2712		1,08	0,4524
P5	1,008 ± 0,1294		1,033	> 0,9999	1 ± 0,1126		0,9877	>0,9999
P6	0,9256 ± 0,1389		0,9504	0,4603	0,9815 ± 0,1981		0,9568	0,6667
P7	0,9835 ± 0,1473		0,9917	> 0,9999	1,037 ± 0,1983		1,019	0,9365
P8	1,14 ± 0,2455		1,24	0,1984	1,346 ± 0,355		1,142	0,1587
P9	1,116 ± 0,07731		1,116	0,6746	1,302 ± 0,192		1,296	0,1429
P10	1,116 ± 0,1054		1,116	0,5079	1,401 ± 0,2357		1,265	0,0556
P11	1,24 ± 0,1132		1,24	0,0635	1,29 ± 0,09613		1,327	0,0397*
P12	1,479 ± 0,4549		1,322	0,1111	2,284 ± 1,186		2,253	0,0159*

P13	1,132	±	0,1507	1,074	0,5952	1	±	0,1754	1,049	0,8571
P14	1,14	±	0,1719	1,157	0,2857	1,253	±	0,266	1,327	0,119
P15	1,174	±	0,2275	1,157	0,4127	1,272	±	0,3814	1,235	0,2302
P16	1,339	±	0,4579	1,198	0,2143	2,025	±	0,9126	1,975	0,0238*
P17	1,231	±	0,1287	1,198	0,127	1,463	±	0,2031	1,574	0,0238*
P18	0,7438	±	0,1371	0,7025	0,0873	0,7099	±	0,18	0,6481	0,0317
P19	1,322	±	0,337	1,24	0,1111	2,043	±	1,014	1,759	0,0397*
P20	1,442	±	0,5958	1,218	0,0952	1,442	±	0,5958	1,218	0,2063

Utilizou-se o teste de Mann-Whitney, comparando cada amostra contra o CN (*p<0,05; **p<0,01
p<0,001, *p<0,0001).

Em junho de 2016, os pontos, P11, P12, P16, P17 e P19 apresentaram genotoxicidade somente para ID. Dentre esses se destacou P12, com ID 2,3 vezes maior que CN.

De forma evidente, os resultados apontaram diferenças de toxicidade em relação aos testes de ecotoxicidade e genotoxicidade. A ecotoxicidade aguda enquadrou apenas uma amostra, o ponto de coleta P19, e para apenas um período, setembro de 2015, como tóxica. Entretanto, do ponto de vista das análises convencionais físicas, químicas e microbiológicas, este ponto de coleta, nesta época do ano, foi classificado como tendo um Índice de Qualidade da Água (IQA) “bom”, que corresponde a águas das Classes de Uso 1 e 2 do CONAMA (KLAMT et al., 2017), caracterizadas como águas de boa qualidade apropriadas para o consumo humano, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas e à recreação de contato primário (balneabilidade), dentre as suas principais características (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos nos ensaios agudos, que enquadraram apenas uma amostra como tóxica, diferem dos resultados obtidos aplicando o Ensaio Cometa, que mostraram genotoxicidade em todos os pontos de coleta, em pelo menos um período de amostragem, com exceção dos pontos de coleta P4 e P8. Estes resultados coincidem com aqueles de Palma et al. (2016), onde os autores concluíram que o ensaio agudo não é um bom indicador para a classificação do estado da qualidade de águas, pois é dependente da presença de concentrações suficientemente elevadas, que se traduzam no comprometimento da sobrevivência do organismo. Isto não é sinônimo da ausência de tais substâncias, nem da ineficácia da sua ação. Klaassen e Watkins (2012), por sua vez, reforçam a necessidade da complementação de testes ecotoxicológicos com genotoxicológicos, uma vez que somente a avaliação da toxicidade aguda pode não detectar produtos químicos de baixa toxicidade capazes de gerar efeitos cancerígenos ou teratogênicos.

Do ponto de vista das análises convencionais, os pontos de coleta P4 e P8 que não apresentaram genotoxicidade, foram classificados como tendo um IQA “bom”, com exceção do ponto P8 em setembro de 2015 e março de 2016, que foi classificado como tendo um IQA “regular”. Este IQA corresponde a águas da Classe de Uso 3 do CONAMA (KLAMT et al., 2017), que apresenta usos bem mais restritivos

do que as Classes 1 e 2, limitando-se ao consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, recreação de contato secundário e dessedentação de animais, dentre as suas principais características.

Em relação às coletas que apresentaram as maiores genotoxicidades, tanto para ID como para FD, em todas as épocas do ano, destacaram-se os pontos P10, P11, P12, P17 e P20, tendo atingidos valores que variaram de 1,4 a 5 vezes o controle negativo (CN). Conforme Bright et al. (2011), geralmente um aumento entre duas e três vezes da intensidade do dano, em relação ao controle negativo (CN), pode ser classificado como um resultado biologicamente significativo, condição que evidência a presença de substâncias com efeito genotóxico.

Estes pontos de coleta caracterizaram-se por apresentar a maior genotoxicidade, entretanto, do ponto de vista das análises convencionais, nestas quatro épocas do ano, 65% destes pontos de coleta foram classificados como tendo um IQA “bom”, que corresponde a águas das Classes de Uso 1 e 2 do CONAMA, caracterizadas como águas de boa qualidade (KLAMT et al., 2017). Apenas os 35% restantes foram classificados como tendo um IQA “regular”, que corresponde a águas da Classe de Uso 3 do CONAMA, considerados como pontos de coleta críticos (KLAMT et al., 2017). Estes pontos foram o P10 (dezembro de 2015), P12 (setembro e dezembro de 2015 e março de 2016), P17 (setembro de 2015 e junho de 2016), P20 (março de 2016).

Estes resultados demonstram, claramente, a importância da utilização de ensaios de genotoxicidade como ferramenta de avaliação ambiental, destacando o Ensaio Cometa, uma vez que permitem avaliar danos no DNA passíveis de reparo e que não alteram a vitalidade e viabilidade do organismo-teste, detectando alterações mesmo em águas consideradas de boa qualidade, como verificado nos 65% dos pontos de coleta que foram classificados como tendo um IQA “bom”, caracterizados como águas de boa qualidade, enquanto que do ponto toxicológico estes pontos apresentaram a maior genotoxicidade. Desta forma, a genotoxicidade observada não se associa às variáveis que foram determinantes para a boa qualidade da água verificada pelas análises convencionais (demanda bioquímica de oxigênio, oxigênio dissolvido, fósforo, turbidez, nitrato e coliformes termotolerantes), uma vez que não constituem um fator genotóxico.

Neste contexto, a genotoxicidade observada poderia ser explicada considerando a lixiviação de insumos agrícolas empregados em lavouras próximas aos pontos de coleta amostrados. Vera Cruz tem sua agricultura baseada no cultivo de tabaco, na qual as principais empresas de processamento de tabaco estão instaladas, juntamente com as cidades de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires (SILVEIRA, 2015). O cultivo de tabaco se caracteriza pelo uso intensivo de agrotóxicos que no intuito de combater pragas, controle de doenças e otimização da produção, são aplicados em larga escala no Brasil (GOULART e CALLISTO, 2003; TORRES, 2006; VALE, 2016).

De fato, numa pesquisa feita em municípios da Região do Vale do Rio Pardo, RS, onde foram selecionadas 146 unidades familiares de fumicultores de Santa Cruz do Sul, Gramado Xavier e Sinimbu, durante novembro de 2000 a março de 2001,

Lobo et al. (2006) demonstraram que 100% das oito amostras do sistema float apresentaram toxicidade ao organismo-teste, variando de pouco tóxica a extremamente tóxica, e comprovando, desta forma, a alta toxicidade dos insumos utilizados para a produção. Segundo Lima (2000), devido às pressões de organismos internacionais para a eliminação do uso do brometo de metila das atividades agrícolas, o complexo agroindustrial fumageiro desenvolveu um novo pacote tecnológico para a produção de mudas chamado de sistema “float”, onde as mudas são produzidas em bandejas que flutuam sobre uma lâmina de água previamente fertilizada e que dispensa o uso do brometo. Entretanto, os demais agrotóxicos recomendados para as sementeiras continuam sendo utilizados, com a soma de mais um produto específico do novo sistema (cobre Sandoz BR). Se o manejo for inadequado, a água do sistema float escorre pelo terreno, contaminando o solo, podendo atingir rios e arroios.

Dados retirados da literatura (LIMA, 2000, HERMES, 2000) mostram que dos agrotóxicos utilizados no sistema float, os fungicidas Manzate ou Dithane (mancozeb), são considerados altamente tóxicos, sendo aplicados 135g, de 5 a 6 vezes na sementeira. O fungicida Rovral (iprodisone), também é considerado altamente tóxico sendo aplicados 30g, de 4 a 5 vezes em 45m² na sementeira. Já o inseticida Orthene (acephate), também utilizado para as bandejas do sistema float, é considerado moderadamente tóxico para *Daphnia magna* e são utilizados 60g de 3 a 4 vezes por 45m².

Ainda, segundo os mesmos autores, dos pesticidas utilizados na lavoura nos municípios de Santa Cruz do Sul, Gramado Xavier e Sinimbu, o Doser ou Lorsban 480 BR (clorpirifós) é considerado extremamente tóxico ao organismo-teste, sendo necessários apenas 0,10ppb para causar efeito de imobilidade, sendo usados até 1L por hectare e aplicado até duas vezes por safra. O pesticida Solvirex (disulfoton), também é extremamente tóxico, sendo necessário apenas 13ppb para causar efeito deletério à *Daphnia magna*, utilizando-se na lavoura 15Kg por hectare por safra. Este também é o caso do Carbaryl Fersol pó 75 ou Sevin (carbaryl), que é aplicado conforme a incidência de insetos, usando-se 15Kg por hectare por safra, sendo necessários apenas 6,4ppb para apresentar toxicidade ao organismo-teste. Ainda, o herbicida Herbadox 500 CE (pendimethalin) é extremamente tóxico e o herbicida Poast (sethoxydim), altamente tóxico para *Daphnia magna*, sendo aplicados 1,5 - 3,0L e 1,25 - 2,0L, respectivamente, por hectare, por safra.

Verificou-se, portanto, que são estes insumos agrícolas que apresentam a maior probabilidade de serem os agentes tóxicos da região devido à fumicultura. Embora o reconhecimento dos avanços tecnológicos advindos da implementação do sistema float, tais como as condições ideais para o desenvolvimento das mudas através de um substrato especial, a partir dos dados obtidos por Lobo et al. (2006) pode-se verificar a alta toxicidade da água do sistema float para os organismos-teste. Esta água do float na maioria das vezes é descartada pura ou misturada com calcário diretamente no solo, ou, fica dentro do sistema até evaporar por completo ou ser lavada pelas chuvas tendo o mesmo destino. Embora tenha sido desenvolvido para utilizar uma menor quantidade de agrotóxicos, particularmente a eliminação do

brometo de metila, a água do sistema float ainda apresenta uma alta concentração de agrotóxicos altamente tóxicos, o que torna a água residual do sistema float altamente tóxica.

Desta forma, pode-se inferir que há uma alta probabilidade de que o uso de agrotóxicos empregados em lavouras próximas aos pontos de coleta amostrados tenha colaborado com valores significativos observados de genotoxicidade. De fato, agrotóxicos em geral (herbicidas, fungicidas, inseticidas) são misturas químicas muito complexas e heterogêneas, sendo que vários dados experimentais revelaram que muitas destas substâncias podem induzir alterações cromossômicas, mutações e danos ao DNA ou às proteínas de sua estrutura em organismos vivos (GARAJ-VRHOVAC e ZELJEZIC, 2001).

Segundo Pra et al. (2005), o Ensaio Cometa apresenta alta sensibilidade na detecção de lesões mesmo em organismos expostos a baixas concentrações de toxinas, o que explica as diferenças nos graus de toxicidade observados pelo emprego de ensaios genotoxicológicos. Observou-se que dos quatro períodos de coletas, setembro de 2015 foi o período que enquadrou o maior número de pontos como tóxicos, atingindo 50% das amostras. Nesta época as lavouras de tabaco recebem o transplante das mudas de fumo, há o preparo do solo com a adubação, química e orgânica (esterco) e uma aplicação de agrotóxicos. Os agrotóxicos aplicados na lavoura nesta etapa da safra são para inibir o crescimento de ervas que possam diminuir ou prejudicar o desenvolvimento do fumo. No entanto, a genotoxicidade foi encontrada em todos os períodos amostrados, sendo válido ressaltar que o fumo tem suas atividades estendidas por quase todo o ano. Além disso, na maioria das propriedades no período de entressafra as lavouras de tabaco dão espaço para outros cultivos, principalmente milho e feijão (BELING, 2006).

Verificou-se, portanto, que a genotoxicidade variou ao longo do tempo, havendo uma alta probabilidade de que influências antrópicas, tais como o uso de agrotóxicos e insumos agrícolas empregados em lavouras próximas às áreas amostradas tenha causado esse problema. Desta forma, Lobo et al. (2006) argumentam que há uma necessidade de trabalhos educativos junto aos agricultores por parte dos complexos agroindustriais fumageiros, e destacam ainda, que o monitoramento ambiental é de extrema importância para garantir a preservação do meio ambiente e da saúde do trabalhador, condição que foi destacada, também, por Etges (2006) na sua pesquisa sobre aspectos socioeconômicos e possibilidades de diversificação entre os produtores de tabaco na Bacia Hidrográfica do Rio Pardinho, RS.

4. CONCLUSÕES

Do ponto de vista da avaliação toxicológica d'água das nascentes do Arroio Andreas, RS, os resultados apontaram diferenças de toxicidade em relação aos testes de ecotoxicidade e genotoxicidade. A ecotoxicidade enquadrou apenas uma amostra, ponto de coleta P19 em setembro de 2015, como tóxica. Já através do

Ensaio Cometa, observou-se genotoxicidade em todos os pontos de coleta, em pelo menos um período de amostragem, com exceção dos pontos de coleta P4 e P8.

Os pontos de coleta P10, P11, P12, P17 e P20 destacaram-se por apresentar as maiores genotoxicidades, entretanto considerando as análises convencionais físicas, químicas e microbiológicas, 65% destes pontos de coleta foram classificados como tendo um IQA “bom”, que corresponde a águas das Classes de Uso 1 e 2 do CONAMA, caracterizadas como águas de boa qualidade. Assim, a genotoxicidade observada não se associa às variáveis que foram determinantes para a boa qualidade da água verificada pelas análises convencionais (demanda bioquímica de oxigênio, oxigênio dissolvido, fósforo, turbidez, nitrato e coliformes termotolerantes), uma vez que não constituem um fator genotóxico.

Desta forma, pode-se inferir que há uma alta probabilidade de que o uso de agrotóxicos empregados em lavouras próximas aos pontos de coleta amostrados tenha contribuído com os altos valores observados de genotoxicidade. O município de Vera Cruz tem sua agricultura baseada no cultivo de tabaco, caracterizado pelo uso intensivo de agrotóxicos que no intuito de combater pragas, controle de doenças e otimização da produção, são aplicados em larga escala no Brasil.

Neste contexto, os resultados obtidos nesta pesquisa vêm cancelar a importância da complementação de testes comumente empregados para a avaliação da qualidade da água, como os testes físico-químicos convencionais e de ecotoxicidade, com testes genotoxicológicos, destacando o Ensaio Cometa como importante ferramenta de avaliação ambiental, uma vez que permitem avaliar danos no DNA passíveis de reparo e que não alteram a vitalidade e viabilidade do organismo-teste, detectando alterações mesmo em águas consideradas de boa qualidade.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladóceras, Crustácea). 3. ed. São Paulo, 2009.
- APHA. **American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater.** 21 ed. Washington. 2005.
- BELING, R. R.; **A história de muita gente: um exemplo de liderança.** Santa Cruz do Sul: AFUBRA, 2006.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

BRIGHT, J., AYLOTT, M., BATE, S., GEYS, H., JARVIS, P., SAUL, J. AND VONK, R. **Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay.** *Pharmaceutical Statistics*. 485-493. 2011.

CHAPMAN RI-JACQUES, S. D. 2006. **Bioestatística. Princípios e Aplicações.** Porto Alegre: Artmed. 255p.

CHAPMAN, D. **Water Quality Assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring.** UNESCO, UNEP, WHO. Londres: Chapman & Hall. 366 p. 1992.

ETGES, V. E., FERREIRA, M. A. F. **A produção do tabaco: impacto no ecossistema e na saúde humana na região de Santa Cruz do Sul/RS.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2006.

GOULART, M. & CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental.** *Revista da FAPAM*, 2(1): 153-164. 2003

GARAJ-VRHOVAC, V., ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, 165: 153-162. 2001.

GraphPad, 2012. **Instat guide to choosing and interpreting statistical tests.** San Diego, Ca (<http://www.graphpad.com>).

HERMES, N. Implicações sócio-ambientais da fumicultura: panorama atual e perspectivas. *Economia ecológica. Revista Redes*, Santa Cruz do Sul, 5(3): 45-64. 2000.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=432270&search=rio-grande-do-sul|vera-cruz>>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

KLAASSEN, C D.; WATKINS. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull.** 2. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. xii, 460 p.

KLAMT, R. A., DELEVATI, D. M., COSTA, A. B., LOBO, E. A. Evaluation of water resource preservation areas in the Hydrographical Basin of Andreas Stream, RS, Brazil, using environmental monitoring programs. *Water Utility Journal* (In press). 2017.

LIMA, R. G. **Práticas alternativas e convencionais na cultura de fumo estufa: estudo**

de casos. 203 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional - Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2000.

LOBO, E. A.; RATHKE, F. S.; BRENTANO, D. M. **Ecotoxicologia aplicada: o caso dos produtores de tabaco na Bacia Hidrográfica do Rio Pardinho, RS, Brasil.** p. 41-68. In: ETGES, V. E.; FERREIRA, M. A. F. A produção do tabaco: impacto no ecossistema e na saúde humana na região de Santa Cruz do Sul/RS. Santa Cruz do Sul: EDINISC, 2006. 248p.

MORETTO, D. L., PANTA, E., COSTA, A. B., LOBO, E. A. Calibration of Water Quality Index (WQI) based on Resolution nº 357/2005 of the Environment National Council (CONAMA) Brazil. **Acta Limnológica Brasiliensia**, 24(1): 29-42. 2012.

NADIN S. B.; VARGAS-ROIG L. M.; CIOCCA D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

PALMA, P., LEDO, L. AND ALVARENGA, P. Ecotoxicological endpoints, are they useful tools to support ecological status assessment in strongly modified water bodies? **Science of the Total Environment**, 541: 119-129. 2016.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**, v.33, p.817-822, 2007.

POSSELT, E. L., COSTA, A. B., LOBO, E. A. **Software IQADData 2015.** Registro no INPI BR 512015000890-0. Programa de Mestrado em Sistemas e Processos Industriais (PPGSPI), Programa em Tecnologia Ambiental - Mestrado e Doutorado (PPGTA), UNISC. Disponível em: <<http://www.unisc.br/ppgsapi>. 2015>.

PRA, D., LAU, A. H., KNAKIEVICZ, T., CARNEIRO, F. R., ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 585(1-2): 79-85, 2005.

SILVEIRA, R. L. L. **A cultura do tabaco na Região Sul do Brasil:** dinâmica de produção, organização espacial e características socioeconômicas. **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 19, n.2 p. 23-40, maio/ago. 2015.

TORRES, J. P. M. **Aspectos Ambientais da Produção de Tabaco em Santa Cruz do Sul, Sinimbu e Gramado Xavier.** A produção de tabaco – impacto no ecossistema e na saúde humana na região de Santa Cruz do Sul/RS. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2006.

TUNDISI, J. G. Limnologia e gerenciamento de recursos hídricos: Avanços conceituais e metodológicos. *Ciência e Ambiente*, Santa Maria, 21: 9-20. 2000.

UNEP-IETEC. **Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: uma abordagem integrada ao problema da eutrofização**. IETEC, 2001.

VALE, A. In: **Proteção Contra Agrotóxicos – CIPA**. V, 38, n.438, março de 2016.

WUNDER, S. (Coord.). **Pagamentos por Serviços Ambientais: perspectivas para a Amazônia Legal**. Brasília: MMA, 136 p. (Série Estudos, 10). 2008.

ZENKNER, F. F.; ATHANASIO, C. G.; ELLWANGER, J. H.; PRÁ, D.; RIEGER, A.; LOBO, E. A. Análise genotóxica de efluente de lavanderia hospitalar: Ensaio Cometa com *Daphnia magna* Straus, 1820. *Revista Jovens Pesquisadores*, n. 1, 2012.

ABSTRACT: The research was conducted in water resources preservation areas (springs) in Andreas Stream Hydrographic Basin, RS, established through the Payment for Environmental Services (PES). Traditionally, the environmental impacts evaluation in aquatic ecosystems have been realized through the measurements of physical, chemical and microbiological variables, however, it's important to highlight the utilization of new methodologies, such as the ecotoxicological and genotoxicological approaches. In this context, this research aimed at evaluate the water quality of springs in Andreas Stream Basin, RS, through ecotoxicological and genotoxicological tests, using the Comet Assay (CA) and having as a test-organism the microcrustacean *Daphnia magna* (STRAUS, 1820). In total, 20 sampling points were evaluated in September and December 2015 and March and July of 2016. Neonates of *D. magna* were submitted to acute exposition bioassay following the Brazilian Technical Standard NBR-12713. The CA test allowed the calculation of Damage Frequency (DF) and the Damage Index (DI) in the DNA (Deoxyribonucleic Acid). The Mann-Whitney non parametrical test with a significant level of 5% was used. The results indicated the highest genotoxicity in sampling points P10, P11, P12, P17 and P20, however, from the conventional physical, chemical and microbiological analyses, 65% of these sampling points were classified as having a Water Quality Index (WQI) "good", reinforcing the importance of genotoxicological assays (CA) utilization as tools complement for water quality evaluation, since it detect changes even in waters considered as having good quality.

KEYWORDS: Payment for Environmental Services (PES), water resources preservation, ecotoxicological assay, genotoxicological assay, Andreas Stream Hydrographic Basin, RS.

CAPÍTULO III

FITOTOXICIDADE DO ANTIBIÓTICO CEFALOTINA EM SEMENTES DE ALFACE (LACTUCA SATIVA)

**Caroline Lopes Feijo Fernandes
Laiz Coutelle Honscha
Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior**

FITOTOXICIDADE DO ANTIBIÓTICO CEFALOTINA EM SEMENTES DE ALFACE (LACTUCA SATIVA)

Caroline Lopes Feijo Fernandes

Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Rio Grande – Rio Grande Do Sul

Laiz Coutelle Honscha

Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Rio Grande – Rio Grande Do Sul

Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior

Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Rio Grande – Rio Grande Do Sul

RESUMO: Atualmente, antibióticos e outros produtos farmacêuticos tem recebido atenção especial em estudos ambientais, devido à sua extensa utilização por seres humanos e na produção animal. Os resíduos destes compostos, ainda que metabolizados, de uma forma ou de outra podem contaminar sistemas aquáticos e terrestres. O aporte destes resíduos no meio ambiente pode favorecer a resistência de micro-organismos, além de ocasionar efeitos tóxicos em plantas e animais não alvos. Neste presente trabalho foi avaliada a fitotoxicidade do antibiótico Cefalotina (cefalosporina de 1ª geração) utilizando o ensaio de toxicidade aguda em sementes de alface (*L. sativa*). As sementes de alface foram expostas em placas de Petri (n= 20 sementes por placa), em triplicata, a diferentes concentrações de cefalotina sódica (0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 mg/L). Após cinco dias, foi medida a taxa de germinação e os pesos fresco e seco das plântulas. Nenhuma concentração de cefalotina parece ter causado prejuízos em nenhum dos parâmetros mensurados da espécie testada. Desta forma, conclui-se que a cefalotina tem potencial fitotóxico nulo nas condições testadas, mas chamamos atenção de que outros produtos farmacêuticos podem causar prejuízos aos organismos.

PALAVRAS-CHAVE: contaminantes emergentes, toxicidade aguda, irrigação.

1. INTRODUÇÃO

Entre as importantes fontes de poluição ambiental estão os resíduos animais, antibióticos e hormônios, produtos químicos de curtumes, fertilizantes e pesticidas utilizados nas terras cultiváveis e sedimentos provenientes de pastagens erodidas. Números globais não estão disponíveis, mas nos Estados Unidos, estima-se que o gado é responsável por 55% da erosão e sedimentos nas terras cultiváveis, 37% da utilização de pesticidas, 50% do uso de antibiótico, quase um terço das cargas de nitrogênio e fósforo despejados em recursos de água doce (SOUZA, 2010). A

exposição direta dos alimentos de origem animal e vegetal aos resíduos dos antibióticos tem sido motivo de atenção dos órgãos regulamentadores e de pesquisa (PALERMO-NETO e ALMEIDA, 2006). Os estudos sobre a farmacodinâmica e farmacocinética de antibióticos são muito bem conhecidos e averiguados. Em contrapartida, os seus efeitos em organismos não-alvo expostos em condições ambientais ainda são pouco conhecidos (CAPLETON et al. 2006), despertando assim o interesse de conhecer seus efeitos em diferentes organismos-teste e a potencialização destes na cadeia trófica.

A metabolização dos antibióticos normalmente não é completa, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (KEMPER, 2008). Uma vez no ambiente, os resíduos de antibióticos podem acumular-se no solo, sofrer lixiviação ou ainda serem transportados, via escoamento superficial, para os corpos hídricos (DÍAZ-CRUZ et al. 2003). Por outro lado, resíduos de fármacos podem ser absorvidos e se acumular nas plantas, resultando em risco à saúde humana quando da colheita e consumo de alimentos de origem vegetal (MIGLIORE et al. 2003; BOXALL et al. 2006). O destino e o comportamento ambiental desses compostos, assim como de outros produtos farmacêuticos, são influenciados por uma variedade de fatores, como as propriedades físico-químicas da molécula e do solo e as condições ambientais e de manejo prevaletentes (KEMPER, 2008).

Alguns trabalhos têm sido realizados visando avaliar os efeitos fitotóxicos de fármacos, especialmente antimicrobianos, e os resultados tem mostrado alta variabilidade (MIGLIORE et al. 2003, HILLIS et al, 2011). O antibiótico utilizado neste experimento (cefalotina) tem como característica química ser um antibiótico semissintético do grupo das cefalosporinas de primeira geração e que possui um mecanismo de ação similar à penicilina. Por ser um antibiótico considerado de amplo espectro, a cefalotina é muito utilizada para tratar diferentes infecções como pulmonar e óssea. Em sua composição, a cada 1g de cefalotina usa-se como tampão 30mg de bicarbonato de sódio, para que o pH varie entre 6,0 e 8,5. Nesta faixa de tamponamento não há formação de cefalotina ácida livre, o que o torna ainda mais solúvel (NOVAFARMA, 2015).

A principal via de eliminação deste fármaco é representada pelos rins, através da filtração glomerular, acrescida de secreção tubular e o fígado acaba por ter um papel muito delimitado. A cefalotina em especial é degradada no organismo, transformando-se em uma forma desacetilada, inativa. As concentrações urinárias destes produtos alcançam níveis alarmantes, atingindo 600mg/ml até 5.000/ml, sendo 80% a 100% excretados após a sua utilização (SILVA, 2013). Após a sua excreção, a cefalotina acompanha o curso da água sendo transportada por longas distâncias contaminando diferentes trechos do corpo hídrico (CZERNIAWSKA-KUSZA e KUSZA, 2011). Devido a isto é crescente a preocupação com o potencial poluidor de diferentes substâncias a corpos d'água que recebem efluentes domésticos ou industriais (RODRIGUES et al. 2013).

Atualmente os testes de ecotoxicidade são muito utilizados e servem de extrema importância quando tratamos de contaminação ambiental. Os testes que

utilizam plantas superiores são muito eficientes para avaliar e monitorar o efeito tóxico de diferentes poluentes. (FERNANDES et al. 2007; CZERNIAWSKA-KUSZA e KUSZA, 2011). A principal vantagem de utilizar estes testes está na sua ampla variedade de parâmetros de toxicidade que são contemplados, como a taxa de germinação e tamanho de plântulas além de apresentarem baixo custo. A alface *Lactuca sativa* é muito utilizada em ensaios de fitotoxicidade que avaliam principalmente efluentes domésticos (ŽALTAUSKAITĖ e ČYPAITĖ, 2008). Partindo disto o objetivo deste estudo foi avaliar a fitotoxicidade do antibiótico Cefalotina utilizando o ensaio de toxicidade aguda em sementes de alface (*L. sativa*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio de fitotoxicidade foi realizado com sementes comercial de alface mimosa (*Lactuca sativa*). O fármaco avaliado foi a Cefalotina sódica, um antibiótico do grupo das cefalosporinas de primeira geração.

Para avaliação da toxicidade aguda em sementes de alface foram avaliadas diferentes concentrações de cefalotina (1, 10, 100, 1000 e 10000 mg/ml) diluída em água destilada estéril. Como controle negativo foi utilizado apenas água destilada. Cada concentração foi testada em três réplicas, utilizando 20 sementes de alface distribuídas em placas de Petri descartáveis contendo filtro de papel e adicionando 3 ml da solução correspondente. Ao final de cinco dias de exposição, foi avaliada a taxa de germinação, peso fresco e peso seco das plântulas.

Os resultados foram expressos com a média \pm desvio padrão. Para comparação das médias foi realizada análise de variância (ANOVA) e quando necessário foi aplicado o teste a posteriori (Tukey) para comparação entre os grupos, a 5% de significância estatística.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de germinação de sementes de alface após cinco dias de exposição não foi alterada pela exposição à cefalotina, variando entre 83 e 97% de germinação, enquanto o controle teve uma taxa média de germinação de 95% (Figura 1). De maneira semelhante à taxa de germinação, os parâmetros relativos ao crescimento inicial das plântulas (peso fresco e seco) não foram alterados pela adição de cefalotina, em nenhuma das concentrações (Figuras 2a e 2b), indicando que este antibiótico não causa toxicidade à espécie testada, considerando as condições experimentais utilizadas no estudo. Embora nossos resultados sejam preliminares, estes são os primeiros dados referentes a toxicidade deste antibiótico para plantas superiores. Outros parâmetros e condições experimentais deverão ser utilizados para avaliar a existência de efeitos subletais da cefalotina em *L. sativa*.

Outros estudos já têm demonstrado que a alteração na taxa de germinação tem respondido pouco a antibióticos (HILLIS et al. 2011). Em um destes estudos foi

observado que há efeitos tóxicos da enrofloxacina, a partir de concentrações de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo percebidos prejuízos no desenvolvimento de raízes, cotilédones e folhas de várias espécies vegetais cultivadas, como feijão, pepino, alface e rabanete; ainda, as plantas foram capazes de converter parte da enrofloxacina absorvida em seu metabólito, a ciprofloxacina (MIGLIORE et al. 2003). Sendo assim parâmetros relativos ao crescimento parecem ser sensíveis a este grupo de compostos, mas os estudos têm avaliado estas alterações em um tempo mais prolongado (30 dias).

Alterações no desenvolvimento do vegetal exposto a contaminantes ambientais têm relação com inúmeros fatores, tais como: natureza do composto, concentrações envolvidas, cinética de sorção e mobilidade do produto (JJEMBA, 2002). A exemplo disto temos que em um estudo com os compostos florfenicol, levamisole e trimetoprina foram observados que os mesmos foram encontrados em folhas de alface, enquanto os compostos diazinon, enrofloxacina, trimetoprina e florfenicol foram detectados apenas nas raízes de cenoura. Entretanto, todas as concentrações que foram encontradas situaram-se abaixo dos valores de ingestão diária aceitável, representando um risco baixo aos consumidores (BOXALL et al. 2006). Devemos salientar que a grande maioria dos estudos relatando efeitos negativos no desenvolvimento vegetal foi realizada in vitro, sendo exposto em concentrações pouco prováveis de serem encontradas em condições normais de campo (JJEMBA, 2002).

Em um estudo sobre a absorção de antibióticos, as espécies vegetais *Panicum miliaceum* (painço), *Pisum sativum* (ervilha) e *Zea mays* (milho) acumularam alta quantidade de sulfadimetoxina (até $2.070 \mu\text{g g}^{-1}$ de material vegetal). Percebeu-se ampla diferença entre a acumulação nas raízes e na parte aérea, sendo esta última acumulava concentrações de 2 a 20 vezes maiores nas raízes (MIGLIORE et al. 1995). Esses trabalhos enfatizam a importância de se monitorar a ocorrência de resíduos de antibióticos no ambiente terrestre (nos solos), pelo menos devido ao potencial de fitotoxicidade e de bioacumulação em plantas cultivadas.

Em outro estudo avaliando o efeito dos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina na cultura do abacateiro in vitro, o cloranfenicol apresentou o maior efeito fitotóxico; houve redução da massa de calos a partir da concentração de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ e na formação de calos a partir de 50 mg L^{-1} (BIASI, 1995).

Existem inúmeras lacunas no conhecimento a respeito da relevância da absorção de antibióticos pelas plantas. Nesse sentido, mais pesquisas são necessárias a fim de avaliar as quantidades de antibióticos absorvidas pelas diferentes culturas, as transformações dessas moléculas nos tecidos vegetais, a possível influência desses compostos no desenvolvimento das plantas e por fim, as reais implicações dessa via de exposição para a saúde humana (DOLLIVER et al. 2007).

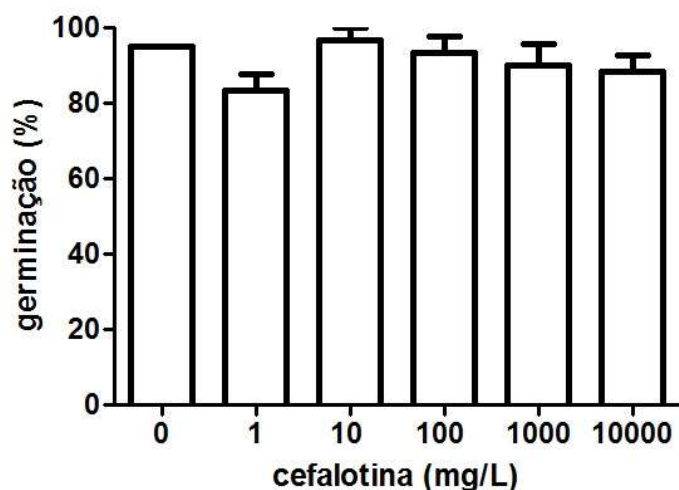


Figura 1. Taxa de germinação de sementes de alface em diferentes concentrações de cefalotina, após cinco dias de exposição.

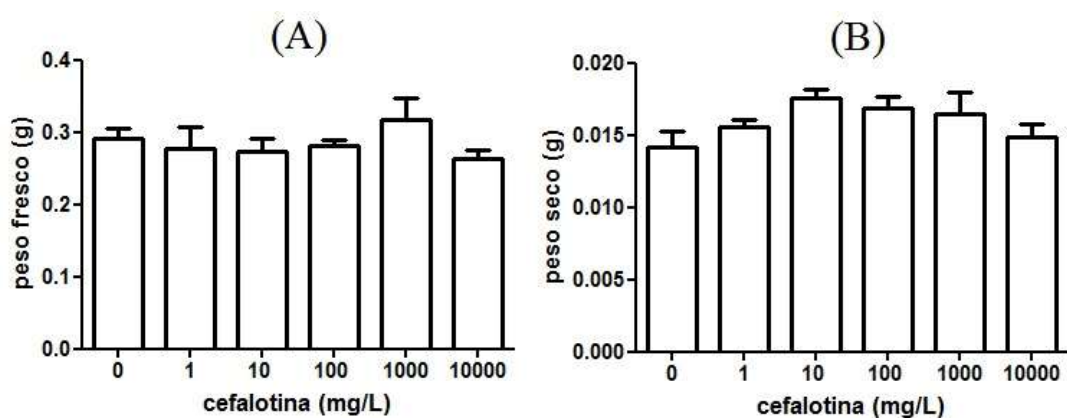


Figura 2. (A) Peso fresco e (B) peso seco de plântulas de alface germinadas em diferentes concentrações de cefalotina, após cinco dias de exposição.

4. CONCLUSÃO

Avaliando a taxa de germinação e crescimento inicial de plântulas, concluiu-se que o antibiótico cefalotina não é tóxico a sementes de alface mimosa (*L. sativa*), mas não descartamos a possibilidade de que outros fármacos possam ter ação tóxica sobre as plantas e outros organismos não-alvo. Estudos desta natureza devem ser estimulados a fim de elucidar os reais efeitos aos quais os organismos estão expostos em seus ambientes naturais.

REFERÊNCIAS

BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura in vitro de abacateiro. *Bragantia*, 54:251-256, 1995.

- BOXALL, A.B.A.; JOHNSON, P.; SMITH, E.J.; SINCLAIR, C.J.; STUTT, E. & LEVY, L.S. **Uptake of veterinary medicines from soils into plants.** *J. Agric. Food Chem.*, 54:2288-2297, 2006.
- CAPLETON, A.C.; COURAGE, C.; RUMSBY, P.; HOLMES, P.; STUTT, E.; BOXALL, A.B.A. & LEVY, L.S. **Prioritising veterinary medicines according to their potencial indirect human exposure and toxicity profile.** *Toxicol. Lett.*, 163:213-223, 2006.
- CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. **The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems.** *Environmental Monitoring and Assessment*, v.179, p.113-121, 2011.
- DÍAZ-CRUZ, M.S.; DE ALDA, M.J.L. & BARCELÓ, D. **Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge.** *Trac-Trends Anal. Chem.*, 22:340-351, 2003.
- DOLLIVER, H.; KUMAR, K. & GUPTA, S. **Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil.** *J. Environ. Qual.*, 36:1224-1230, 2007.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. **Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.88, p.252-259, 2007.
- HILLIS, D.G. FLETCHER, J., SOLOMON, K.R., SIBLEY, P. **Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 60: 220-232, 2011.
- JJEMBA, P.K. **The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review.** *Agric. Ecosyst. Environ.*, 93:267-278, 2002.
- KEMPER, N. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** *Ecol. Indic*, 8:1-13, 2008.
- MIGLIORE, L.; BRAMBILLA, G.; COZZOLINO, S. & GAUDIO, L. **Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*).** *Agric. Ecosyst. Environ.*, 52:103-110, 1995.
- MIGLIORE, L., COZZOLINO, S., FIORI, M. **Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants.** *Chemosphere* 52: 1233-1244, 2003.
- NOVAFARMA. **Cefalotina sódica Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda: Pó para solução injetável 1g.** ANVISA, p 3-4, 2015.

PALERMO-NETO, J. & ALMEIDA, R.T. **Antimicrobianos como aditivos em animais de produção.** In: SPINOZA, H.S.; GÓRNIK, S.L. & BERNARDI, M.M., eds. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.641-658, 2006.

SILVA, P. *Farmacologia.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1352p, 2010.

SOUZA, J., S. **O impacto ambiental atribuído à pecuária.** Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, *Revista CRMV- PR.* Ed. 30, 2010.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. **Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants** *Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants.* *Environmental Research - Engineering and Management*, v.46, p.42-47, 2008.

ABSTRACT: Antibiotics and other pharmaceuticals have received special attention in environmental studies, due to extensive use by humans and animal production. Residues of these compounds, although metabolized, in one form or another can contaminate aquatic and terrestrial systems. The contribution of these residues to the environment can favor the resistance of microorganisms, in addition to causing toxic effects in plants and non-target animals. In this study, the phytotoxicity of the antibiotic cephalotin (1st generation cephalosporin) was evaluated using the acute toxicity test in lettuce seeds (*L. sativa*). Lettuce seeds were exposed in petri dishes (n = 20 seeds per dish) in triplicate at different concentrations of cephalothin sodium (0.1, 10, 100, 1000 and 10000 mg / L). After 5 days, the germination rate and the fresh and dry weights of the seedlings were measured. No cephalothin concentration appears to have caused damage in any of the measured parameters of the tested species. Thus, it is concluded that cephalothin has no phytotoxic potential under the conditions tested, but we would like to point out that other pharmaceutical products can cause damage to organisms.

KEYWORDS: Emergent contaminants, acute toxicity, irrigation.

CAPÍTULO IV

GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES PELETIZADAS DE EUCALYPTUS GRANDIS (MYRTACEAE)

Denise Russowski
Cinthia Gabriela Garlet
Frederico Luiz Reis
Leonardo Menezes
Liziane Maria Barassuol Morandini
Juçara Terezinha Paranhos
Zaida Inês Antonioli
Ademir Farias Morel

GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES PELETIZADAS DE EUCALYPTUS GRANDIS (MYRTACEAE)

Denise Russowski

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Química
Santa Maria-RS

Cinthia Gabriela Garlet

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Biologia
Santa Maria-RS

Frederico Luiz Reis

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Química
Santa Maria-RS

Leonardo Menezes

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Química
Santa Maria-RS

Liziane Maria Barassuol Morandini

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Química
Santa Maria-RS

Juçara Terezinha Paranhos

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Biologia
Santa Maria-RS

Zaida Inês Antonioli

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Biologia do Solo
Santa Maria-RS

Ademir Farias Morel

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. Química
Santa Maria-RS

RESUMO: O controle da contaminação exógena é um dos desafios nos cultivos in vitro, principalmente quando se trata de germinação. Contaminações são responsáveis pelos baixos índices de germinação e sobrevivência das plântulas. Apesar de abundante literatura alusiva a assepsia de sementes de eucalipto e outras Myrtaceae para cultivos in vitro, o baixo percentual de germinação parece ser uma constante. Este estudo visa estabelecer um protocolo de assepsia de sementes de *Eucalyptus grandis* que garanta bons percentuais germinativos e de sobrevivência das plântulas. Para isso, sementes peletizadas foram lavadas com água corrente e/ou esterilizada, imersas em etanol 70%, hipoclorito de sódio 1; 2,5 e 5% e em solução fungicida Maxim 1%, em diferentes sequências e tempos, perfazendo cinco tratamentos. Após assepsia, cada semente foi colocada em um tubo de ensaio contendo meio Murashige & Skoog. O experimento foi mantido em sala de crescimento por 64 dias, com fotoperíodo e temperatura controlados. Percentual de germinação, contaminação, enraizamento e de sobrevivência foram analisados através de delineamento experimental inteiramente casualizado.

PALAVRAS-CHAVE: assepsia, sementes; eucalipto, contaminação.

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto (Figura 1) é uma planta arbórea lenhosa originária da Austrália que possui grande importância econômica. Seu uso industrial é uma das atividades que mais se expande no setor florestal mundial. Diferentes espécies de eucalipto e seus híbridos estão entre as principais fontes de biomassa lenhosa com alto potencial de utilização como matéria-prima para diversos setores, como o de papel e celulose (devido à baixa concentração de lignina e fibras de alta resistência), madeireiro e energético, sendo uma alternativa às florestas nativas (Almeida et al., 2010; Grattapaglia e Kirst, 2008).

Características como o rápido crescimento, adaptabilidade a diferentes tipos de solo e clima e presença de fibras de alta qualidade contribuem para o crescente interesse nesta árvore (Paiva et al., 2011). Além disso, o interesse nessas espécies tem aumentado devido ao seu potencial para uso em setores emergentes, como o de biocombustíveis e biomateriais (Bozell et al., 2007), além dos usos comuns citados anteriormente. *E. grandis*, por sua vez, é a espécie mais comumente plantada no Brasil (Canettieri et al., 2007). Estima-se que as plantações de eucalipto ocupem mais de 20 milhões de hectares ao redor do mundo (Iglesias-Trabado e Wilstermann, 2008).

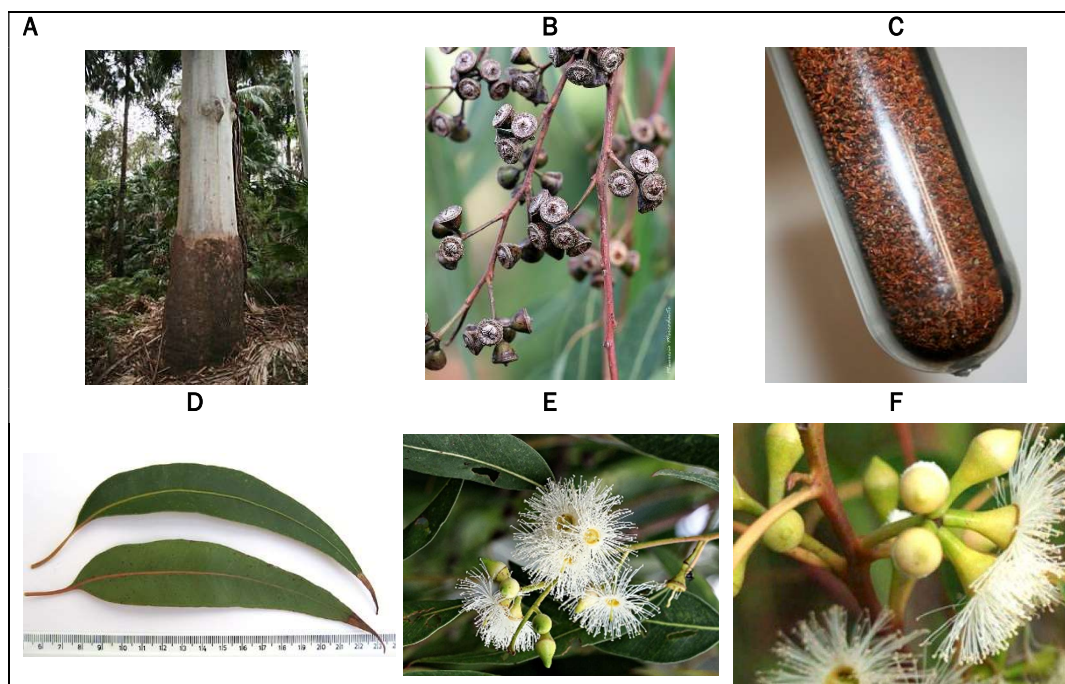


Figura 1 - (A) Aspecto geral do tronco lenhosos de *Eucalyptus grandis* evidenciando a "saia" áspera que ocorre na porção inferior; (B) Frutos secos; (C) Sementes; (D) Aspecto geral das folhas; (E) e (F) Flores e frutos.

Cultivos *in vitro* envolvendo inúmeras espécies de eucalipto tem sido relatados pela bibliografia, revelando que assepsias em explantes (segmentos nodais, folhas e ramos, etc) oriundos diretamente da natureza oferecem dificuldades práticas e são, geralmente, ineficazes na produção de plântulas assépticas,

principalmente quando a meta é se obter uma grande população de eucalipto. Protocolos de cultura de tecidos de plantas devem, independentemente do fim à que se destinam, proporcionar plantas uniformes, produtivas e livres de toda classe de patógeno (Cid e Zimmermann, 2006).

Um dos maiores desafios dos cultivos *in vitro* de plantas é a contaminação exógena. Contaminações são, em grande parte, responsáveis pelos baixos índices nas taxas de germinação de sementes e de desenvolvimento e sobrevivência das plântulas. O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Os meios de cultura são ricos em compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos e vitaminas, os quais proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias e fungos (Fermino Junior et al., 2009).

Em princípio, existem quatro fontes de contaminação: a fonte de explante, meio nutritivo, o ambiente e o operador (habilidade). Outro fator relacionado à contaminação na propagação *in vitro* é o tamanho da semente (Pierik, 1997). O mais importante destes é a fonte de explante que deve ser desinfestada antes da inoculação *in vitro* a fim de eliminar microrganismos exógenos. Contaminações por fungos e bactérias comprometem potencial germinativo das sementes e podem gerar plântulas anormais, (Corder e Borges Jr., 1999). Sendo assim, para que a plântula formada a partir da germinação *in vitro* possa ser fonte de explante confiável, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando total ausência de agentes patológicos.

Detergentes neutros, surfactantes e tensoativos são frequentemente utilizados após pré-lavagens. O etanol é o desinfetante mais empregado. Além da ação germicida, o etanol tem ação surfactante e facilita a ação de outros produtos sendo utilizado em concentrações de 70 a 80%. Dentre as várias substâncias germicidas a base de cloro utilizadas para desinfestação de explantes, dentre eles, as sementes, as mais comuns são o hipoclorito de sódio, ou o hipoclorito de cálcio. Outras substâncias têm sido adicionadas ao meio de cultivo a exemplo de reguladores de crescimento, antibióticos, fungicidas, carvão ativo, na tentativa de minimizar o problema. (Couto et al., 2004; Bandeira et al., 2006; Dutra et al., 2009; Effegem et al., 2014; Houllou et al., 2014; Mamedes e Silva, 2010; Nascimento et al., 2007; Sousa et al., 2007; Teixeira et al., 2008). Aqui, optou-se pelo uso do fungicida Maxim e o problema que surge é quando a população a ser gerada se destina aos estudos *in vitro* de micorrização, como é o caso da linha de pesquisa em nosso laboratório. Micorrizas são associações simbiótico-mutualísticas entre fungos e raízes de plantas hospedeiras e fungos dos gêneros *Pisolithus* e *Scleroderma* são simbióticos/mutualistas com várias espécies de *Eucalyptus*, os quais seriam “contaminantes” endógenos (Rachid et al., 2015).

Em decorrência da natureza asséptica dos cultivos *in vitro*, tratamentos que visam a eliminação dos contaminantes podem exterminar estes (micro) organismos, tão necessários para a germinação de sementes e desenvolvimento das espécies hospedeiras, provocando baixos índices germinativos e de crescimento vegetal. Portanto, o controle da contaminação, nesse caso deve atingir apenas contaminantes exógenos.

Dessa forma, para obtenção de uma grande população de *Eucalyptus grandis* in vitro para posteriores experimentos e destinos de infinitas naturezas, a germinação in vitro se coloca como um alentadora alternativa na clonagem desta espécie, uma vez que sua semente é de fácil enraizamento natural (Moura e Guimarães, 2003), somado ao fato de que explantes são de difícil assepsia, além de que aqueles provenientes das demais espécies de *Eucalyptus*, bem como aqueles da maioria das espécies lenhosas, exibem recalcitrância ao enraizamento (Almeida et al., 2010; Batista et al., 2014; Browse, 1978; Dias et al., 2012; Fermino Junior e Scherwinski-Pereira, 2012; Hartmann et al., 2002; Mantovani et al., 2001; Xavier et al., 2003; Xavier e Otoni, 2009).

A despeito da existência de vários protocolos de assepsia de sementes para germinação das espécies de *Eucalyptus*, o baixo rendimento germinativo parece ser uma constante (Alcântara et al., 2011; Brondani et al., 2009; Dutra et al., 2009). Assim sendo, este trabalho visa estabelecer protocolo de assepsia de sementes peletizadas de *E. grandis* de fácil, rápido e reproduzível método de germinação in vitro que garanta bons percentuais germinativos, de enraizamento e sobrevivência das plântulas para posterior estudos de micorrização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes peletizadas de *E. grandis*, foram lavadas com água (H₂O) corrente e/ou deionizada, destilada esterilizada em autoclave, imersas em etanol (EtOH) 70%, hipoclorito de sódio (HClO) 1%, 2,5% ou 5% e em solução fungicida Maxim 1%, em diferentes sequências e tempos de imersão, perfazendo cinco tratamentos de assepsia (Tabela 1); todos baseados na literatura (Alcântara et al., 2011; Brondani et al., 2009; Dutra et al., 2009; Mamedes e Silva, 2010; Nascimento et al., 2007).

Tabela 1 – Resumos dos tratamentos de assepsia de sementes peletizadas de *E. grandis*

Tratamentos, Especificações tempos e Ordens	Lavagem em H ₂ O corrente	Imersão em EtOH 70%	Imersão em NaClO	Imersão em Maxim 1%	Lavagem em H ₂ O deionizada, destilada e autoclavada
T1	1°	2°	3°	4°	5°
	1min.	1min.	5%/10min.	10 min.	3 lavagens/1min. cada
T2	1°	2°	3°	-	4°
	1min.	1min.	5%/15min.	-	6 lavagens/1min. cada
T3	1°	2°	3°	4°	5°
	1min.	2min.	2,5%/20min.	10 min.	3 lavagens/1min. cada
T4	1°	2°	3°	4°	5°
	1min.	1min.	1%/10min.	20 min.	3 lavagens/1min. cada
T5	1°	2°	3°	-	4°
	1min.	2min.	1%/5min.	-	6 lavagens/1min. cada

Todas as etapas de assepsia foram realizadas em câmara de fluxo laminar, a exceção das lavagens com água corrente e confecção das soluções dos desinfetantes. Após a assepsia, cada sementes foi colocada em um tubo de ensaio (1 semente/tubo), contendo 15 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) a 50% da concentração de sais e suplementado com 20g de sacarose pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6g.L⁻¹ de ágar, vedados com tampa de papel alumínio e autoclavados (20 minutos, a 121 °C. e 1,0 Atm de pressão). Na composição original do meio MS, são usados 30g.L⁻¹. Aqui, optou-se pelo uso reduzido de sacarose (20g.L⁻¹), com objetivo de auxiliar a diminuição da contaminação. Redução da oferta de fonte de carbono provoca efeito deletério mais contundente em microrganismos do que nas sementes e/ou plântulas (Damiani e Schuch, 2009; Erig e Schuch, 2005).

O cultivo foi mantido por 64 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/luz (lâmpadas brancas frias) e temperatura de 25±2 °C., quando foram tomadas as avaliações. A data de término do experimento foi determinada quando 75% das plântulas atingiram a tampa de alumínio do tubo de ensaio, estabelecida em experimentos anteriores (dados não mostrados). Os parâmetros avaliados foram: percentual (%) de germinação, de contaminação, de enraizamento e de sobrevivência. Cada tratamento contou com 40 repetições e o experimento foi realizado em triplicata. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Os softwares utilizados foram Excell, para a confecção dos gráficos e SPSS for Windows 22.0 para o cálculo das ANOVAS, com valor crítico de p≤0.05 para teste de Duncan na comparação das médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes deram início à germinação aos quatro dias após a inoculação, independente do tratamento de assepsia a que foram submetidas. O pellet nada influenciou nos resultados, pois durante as lavagens com água corrente ele foi totalmente removido. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram radícula, conforme Souza e Cardoso (2000).

Tabela 2 – Resumos dos tratamentos de assepsia de sementes peletizadas de *E. grandis*

Tratamentos	Germinação (%)	Contaminação (%)	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
T1	66,67±0,48 a*	20,83±0,41 a	78,73±0,41 a	92,50±0,27 a
T2	36,67±0,49 c	0,83±0,05 b	90,95±0,37 a	100,00±0,00 a
T3	00,00±0,00 e	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b
T4	28,33±0,45 d	0,00±0,00 c	88,38±0,32 a	100,00±0,00 a
T5	41,67±0,49 b	0,00±0,00 c	96,08±0,16 a	98,04±0,00 a

* Os valores representam as médias de três replicatas independentes ± DP (n = 40, barras de erros = ±DP). ANOVA aplicada com valor crítico de p≤0.05 e Teste de Duncan adotado para comparação das médias. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa.

De acordo com a Tabela 2, observa-se claramente que o Tratamento 1 (T1) foi o que apresentou os melhores rendimentos em termos de percentual de germinação ($66,67 \pm 0,48$), mas o pior em termos de percentual de contaminação ($20,83 \pm 0,41$). Mesmo assim, a contaminação não influenciou nos demais quesitos, onde percentual de enraizamento e sobrevivência (estabelecimento das plântulas) não houve diferença significativa entre os tratamentos, a exceção de T3, que apresentou percentual de germinação $00,00 \pm 0,00\%$, apesar do mesmo valor para percentual de contaminação. Estes resultados são fortemente respaldados pelos experimentos de assepsia de Alcântara et al. (2011), também com sementes de *E. grandis*.

O tratamento 3 (T3), que emprega o maior tempo em imersão em NaClO (20 min.), embora na concentração mediana (2,5%) não permitiu a germinação de nenhuma semente, apesar de, igualmente não exibir nenhuma contaminação. Dessa forma conclui-se, que o tempo de imersão das sementes de eucalipto em hipoclorito é um fator limitante para germinação dentre os demais protocolos utilizados neste experimento, desde que não ultrapasse 15 minutos, mesmo estando o NaClO em concentrações comerciais (2,5%). A soma dos fatores tempo de imersão em EtOH 70% e em NaClO nos tempos mais elevados, dois e 20 minutos, respectivamente, pode ter contribuído para o total fracasso de T3 para produção de plântulas, muito embora tenha apresentado um percentual de 0% de contaminação. Resultado muito semelhante foi relatado por Mamedes e Silva (2010), em que sementes com ala membranácea de *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae) foram desinfetadas com EtOH 70% por 15 minutos, seguida de desinfecção com NaClO 2% por 50 minutos, rendendo 0% de germinação e, apenas, 4% de contaminação. Tempos prolongados de imersão em mais de um tipo de desinfetante, mesmo em concentrações usuais, parecem ter efeito deletério na germinação de sementes.

A resposta negativa proveniente da aplicação de mais de um tipo de desinfetante pode ser explicada por resultado oposto obtido por Nascimento et al. (2007): sementes de *Parapiptadenia rígida* (Fabaceae) desinfetadas por concentrações moderada (2,5%) e alta (5,0%) de NaClO por tempos elevados 30 e 15 minutos, respectivamente, forneceram os melhores resultados em termos de percentual de germinação e os menores percentuais de contaminação, mas sem uso de qualquer outro agente desinfetante. Experimentos de assepsia em sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae), mas com ala membranácea realizados por Mamedes e Silva (2010) também apresentaram bons resultados quando as sementes eram submetidas a longos tempos de imersão em, apenas, um produto.

Em concentrações mais altas de NaClO (5%), como no caso de T1, mas tempo de imersão inferior a 15 minutos, as sementes respondem positivamente ao percentual de germinação, tornando este tratamento o melhor em termos de percentual de germinação. Portanto, concentrações de NaClO 5% podem, perfeitamente, ser aceitáveis, desde que, o tempo de imersão não ultrapasse 15 min., como em T2, o terceiro melhor resultado no ranquiamento germinativo ($36,67 \pm 0,49$). Estes resultados podem ser corroborados por experimentos similares com sementes de *Parapiptadenia rígida* (Fabaceae) desinfetadas com NaClO (Couto

et al., 2004; Nascimento et al., 2007). Cabe salientar que T1 e T2, além da imersão em NaClO 5% em tempos de 10 e 15 minutos de imersão, respectivamente, contam com imersão em EtOH 70% durante 1 minuto. Mas em T5, este tempo se eleva para 2 minutos, o que lhe confere o grau de segundo melhor tratamento ($41,67 \pm 0,49$). Neste caso, a redução na concentração (1%) e no tempo de imersão (5 min.) em NaClO no T5 é compensada pelo aumento de tempo de imersão em EtOH 70% (2min.), quando se compara com T2. Mas tal compensação não é o suficiente quando se compara com T1. Mesmo assim, T1 que apresenta os melhores rendimentos na germinação, foi também o tratamento que apresentou o mais alto índice de contaminação, indicando que a presença do fungicida foi irrelevante na contenção da contaminação fúngica exógena no experimento, uma vez que nos tratamentos T2 e T5 este produto não foi incorporado ao protocolo de assepsia.

Combinando estes resultados, podemos inferir que o maior percentual de germinação de T1 pode ser creditado à presença do fungicida Maxim 1%. O fungicida pode ter controlado contaminantes durante o processo germinativo, permitindo a germinação das sementes, mas perdendo a força de ação ao longo dos 64 dias de cultivo, e por isso T1 apresentou altos índices de germinação e contaminação. Estes resultados são extremamente semelhantes aos encontrados por Alcântara et al. (2011), mas estes autores optaram pelo uso de Benomyl, um fungicida sistêmico. A escolha por Maxim em detrimento do uso de Benomyl, decorre do fato de que este último é indicado como fungicida sistêmico para folhas e outras partes aéreas, e, por isso, um fungicida muito agressivo, enquanto que Maxim é um fungicida de contato de amplo espectro com atividade residual e tem uma limitada absorção pela semente e uma pequena translocação dentro da plântula, empregado para tratamento de doenças da semente.

Tal incoerência destes resultados, ou seja, apresentação dos maiores percentuais de germinação e contaminação em um mesmo tratamento (T1), mesmo nas concentrações mais altas de NaClO (5%) por tempo moderado (10 min.) pode ser explicada pelo fato de que, apesar dos processos de desinfestação utilizarem substâncias que normalmente promovem a eliminação de contaminantes microbianos da superfície dos explantes, os endofíticos não são eliminados (Houllou et al., 2014). Estudos sobre germinação in vitro de sementes de várias espécies arbóreas nativas da mata atlântica brasileira revelaram que percentual de contaminação das sementes durante o estabelecimento in vitro demonstrou que cada espécie apresenta microbiota endofítica específica e sendo assim, o sucesso no estabelecimento in vitro e resgate de sementes pode variar a depender da condição fitossanitária natural das sementes (Houllou et al., 2014).

Em estudos com desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), Couto et al. (2004) observaram 89% de contaminação quando as sementes não eram submetidas ao tratamento com substâncias desinfetantes. Outros pesquisadores desinfestaram as sementes de mogno com etanol 70% e hipoclorito de sódio comercial na concentração de 5,5% (Valverde-Cerdas et al., 1998). Com *Cedrela fissilis* as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% (Nunes et al., 2002). Tais contaminações, após o processo de

desinfestação das sementes, podem ser decorrentes da existência de colônias endofíticas dos microrganismos não expostas às substâncias utilizadas na desinfestação das sementes. (Houllou et al., 2014)

Além do tipo e fonte do explante, meio de cultura, qualidade do ambiente e operador (manipulação/ habilidade), o tamanho do explante/semente também se converte em mais uma fonte de contaminação nos cultivos (Pierik, 1997). Sementes de *E. grandis* são muito pequenas (Fig. 1 C) e, durante os procedimentos de assepsia e inoculação das sementes ao meio de cultura, grandes quantidades de material inerte são geradas como resultado da difícil manipulação, o que pode contribuir para inoculação simultânea de microrganismos ao meio (Alcântara et al., 2011). Na desinfestação de sementes de eucalipto, McComb e Bennett (1986) relatam que a desinfestação depende do tamanho e espessura do revestimento da casca. Termignoni et al. (1996) utilizaram hipoclorito de sódio a 0,12 % por 15 minutos na desinfestação de sementes de *E. dunnii*. Já para *E. marginata*, que possui sementes grandes e com revestimento mais espesso, pode-se tratar as sementes com 5 % de hipoclorito de sódio por 1 hora (Cahill et al., 1992). Portanto, o pequeno tamanho das sementes de *E. grandis* também pode ter contribuído para os resultados obtidos no presente trabalho.

Os demais tratamentos apresentaram bons resultados na desinfecção em decorrência do aumento dos tempos de imersão em EtOH 70% (T3 e T5) e/ou NaClO (T2 e T3) e/ou fungicida (T4). Assim sendo, tratamentos que exibiram os maiores de tempos em exposição aos desinfetantes (T2, T3, T4 e T5) foram mais eficazes na assepsia, mas os mais prejudiciais ao processo germinativo das sementes. Sementes selecionadas comerciais de *E. grandis* apresentam um potencial germinativo entre 87 a 97% na natureza, o que lhes confere a característica de fácil germinação (Aguilar et al., 1988; Moura e Guimarães, 2003). Com frequência, desinfetantes podem apresentar um efeito abrasivo ou de escarificação no tegumento da semente, lesando o embrião, o que explicaria os menores índices germinativos exibidos pelos tratamentos de assepsia mais eficientes (T2, T3, T4 e T5) (Corder e Borges Jr., 1999; Sousa et al., 2007). E isso pode ser a explicação do motivo pelo qual tratamentos mais drásticos aplicados às sementes de *E. grandis* proporcionaram os piores resultados em termos de percentual de germinação.

O próximo parâmetro a ser discutido é o percentual de enraizamento. A avaliação deste parâmetro de crescimento é relevante no caso de assepsia de sementes de eucalipto em vista de que várias espécies do gênero *Eucalyptus* exibem enraizamento recalcitrante (Almeida et al., 2015; Dutra et al., 2009; Corrêa et al., 2005), o que inviabiliza o estabelecimento das culturas, mesmo em cultivos *in vitro*. Dessa forma, a sobrevivência das plântulas depende, em muito, desta fase de crescimento vegetal. É necessário, portanto observar e estudar o enraizamento das sementes de *E. grandis* após assepsia e avaliar seu potencial de enraizamento, uma vez que, na natureza, suas sementes são de fácil germinação e enraizamento (Aguilar et al., 1988; Almeida et al., 2015; Moura e Guimarães, 2003) devido a, pelo menos, ampla faixa de temperatura ótima de germinação: de 17 a 33°C. (Souza e Cardoso, 2000).

Uma vez que os trabalhos em nossos laboratórios envolvem estudos alusivos à formação de micorrizas *in vitro*, mais precisamente, alusivos às substâncias produzidas pelos fungos simbiótico-mutualistas que promovem e incrementam o enraizamento de suas hospedeiras (Ek et al., 1993; Lei et al., 1995; Mitchell et al., 1996), os tratamentos de assepsia não devem interferir no desenvolvimento normal das plântulas a partir da germinação e por isso enraizamento deve ser garantido. De modo geral, cultivos *in vitro* de espécies lenhosas apresentam recalcitrância ao enraizamento (Almeida et al., 2015; Batista et al., 2014; Browse, 1978; Dias et al., 2012; Dutra et al., 2009; Corrêa et al., 2005; Fermino Junior e Scherwinski-Pereira, 2012; Hartmann et al., 2002; Mantovani et al., 2001; Xavier et al., 2003; Xavier e Otoni, 2009), mas *in natura* ele é fortemente influenciado pela presença de micorrizas, devido o teor de auxinas e outras substâncias promotoras de enraizamento presentes nos fungos micorrízicos (Ek et al., 1993; Lei et al., 1995; Mitchell et al., 1996; Scagel e Linderman, 1998). Estudos recentes revelam que a ausência desta relação simbiótico-mutualística é que parece ser exceção dentro do reino vegetal (Bonfante e Anca, 2009; Houllou et al., 2014).

Ademais, enraizamentos recalcitrantes requerem adição de hormônios vegetais ao meio de cultura para seu desenvolvimento, o que prejudicaria a avaliação da influência das micorrizas. O enraizamento adventício é uma das etapas-chave na clonagem *in vitro*. Para evitar tais problemas, adotou-se a espécie *E. grandis*, que apresenta capacidade de enraizamento maior que as demais (Almeida et al., 2010, Almeida et al., 2015; Bandeira et al., 2006).

Os tratamentos utilizados não provocaram qualquer efeito no percentual de enraizamento, ou seja, não houve diferença significativa entre os tratamentos quando se avalia o percentual de enraizamento. Também pode-se observar que a contaminação presente nos tratamentos T1 (20,83±0,41%) e T2 (0,83±0,05%), branda o suficiente de modo a não causar, pelo menos estatisticamente, danos ao enraizamento, nos tratamentos supracitados. Experimentos de germinação de sementes de *E. grandis* prévios (dados não mostrados) visando a influência da concentração de sacarose na germinação e estabelecimento das plântulas demonstrou não afetar a germinação, nem o enraizamento. Estes dados são respaldados por experimentos de Erig e Schuch (2005) e Damiani e Schuch (2009). Estes autores revelaram que, mesmo em condições de micropropagação fotoautotróficas de várias espécies agrícolas, a diminuição ou remoção dos teores da fonte de carbono (sacarose e outros tipos de açúcares) não só contribui para aumento do enraizamento, do número e comprimento de raízes, massa fresca total e sobrevivência das plântulas, mas também para forte redução do risco de contaminação microbiana (Erig e Schuch, 2005; Damiani e Schuch, 2009).

Comumente, microrganismos infectantes e sementes e/ou plântulas competem pelos nutrientes do meio de cultivo (Fermino Junior et al., 2009; Sousa et al., 2007). Além disso, patógenos podem produzir ocasionalmente substâncias tóxicas, que podem interferir negativamente na germinação, bem como no crescimento e desenvolvimento dos explantes, o que inclui o enraizamento e formação de partes aéreas (Sousa et al., 2007). Em adição aos fatores abióticos

(temperatura, luminosidade, fotoperíodo, composição do meio nutritivo, entre outros), fatores bióticos como presença de herbívoros, patógenos e parasitas são capazes de produzirem aleloquímicos prejudiciais ou não à germinação de sementes ou no crescimento e desenvolvimento das plântulas cultivadas in vitro. Estresses bióticos podem estimular a síntese de aleloquímicos nas plantas, como defesa vegetal, o que deslocaria o metabolismo primário no sentido do secundário, ocasionando perdas nos parâmetros de crescimento vegetal. E como resultado, taxas de crescimento e desenvolvimento tendem a decrescer (Scognamiglio et al., 2013; Nascimento e Fett-Neto, 2010). Ademais, baixas concentrações de açúcares como fonte de carbono e energia, tentem a afetar mais drasticamente a sobrevivência dos microrganismos patogênicos do que a sobrevivência das plântulas, na competição por nutrientes (Erig e Schuch, 2005; Damiani e Schuch, 2009; Fermino Junior et al., 2009; Sousa et al., 2007).

No caso deste experimento (Tabela 2), a branda contaminação de T1 ($20,83 \pm 0,41\%$) e T2 ($0,83 \pm 0,05\%$), apesar de serem as mais altas obtidas neste experimento, não se mostrou de maneira ameaçadora na disputa pelo alimento, na fase de plântulas, quando se compara percentual de germinação versus percentual de contaminação. Mas foi mais nociva para o processo de germinação, quando se relaciona percentual de germinação versus percentual de contaminação. Além disso, sementes de *E. grandis* são de fácil germinação e enraizamento (Aguiar et al., 1988; Moura e Guimarães, 2003).

Coerentemente, meios e/ou sementes menos contaminados (T2, T3, T4 e T5) proporcionaram os maiores valores absolutos de sobrevivência das plântulas, muito embora sem diferença significativa entre si e entre T1, a exceção de T3, que não permitiu qualquer germinação. Castellani et al. (1996) ressaltaram que a contaminação das sementes pode afetar, de forma severa, a qualidade fisiológica e, em alguns casos, inibir por completo a capacidade germinativa das sementes.

Em experimentos muito similar ao aqui presente, realizados por Alcântara et al. (2011) com sementes de *E. grandis*, suportam largamente nossos resultados: 1º lavagem com 1º) imersão em água estéril/30 seg.; 2º) imersão em EtOH 70%/30seg.; 3º) imersão em NaClO 2,5%/20 min.; 4º) imersão em Benomyl 1%(fungicida) /20 min. e 5º) três lavagens com água esterilizada, foi o tratamento que apresentou o melhor resultado em estabelecimento da cultura in vitro, ou seja, sobrevivência. Mesmo assim, a escolha por Maxim rendeu resultados ainda melhores no quesito percentual de sobrevivência: independente do tratamento (a exceção de T3) à que as sementes foram submetidas, os valores variaram entre $92,50 \pm 0,27$ e $100,00 \pm 0,00\%$, enquanto que Alcântara et al. (2011) conseguiram 87,5%. Fermino Junior et al., (2009) trabalhando com cultivos in vitro, concluiu que a lavagem dos frutos seguida por desinfestação em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5% mostrou-se eficiente para os fatores avaliados percentual de contaminação, com menor oxidação e maior sobrevivência independente da espécie ser uma lenhosa ou palmeira. O sucesso da técnica de micropropagação tem como ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento in vitro com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos

(oxidação) e maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O uso de sementes peletizadas de *E. grandis* não interferiu em nenhum dos parâmetros avaliados, uma vez que foi totalmente removido durante o processo de assepsia das sementes. Os resultados aqui obtidos não diferem significativamente daqueles encontrados na literatura que usam sementes não-peletizadas e os protocolos de assepsia adotados não foram capazes de ocasionar incrementos no percentual germinativo, mas o foram para eliminar totalmente a contaminação, garantindo excelentes rendimentos em termos de enraizamento e sobrevivência das plântulas germinadas. Além disso, o uso de fungicida Maxim não prejudica o processo germinativo, desde que o tempo de imersão seja inferior a 20 minutos, e é fortemente indicado em substituição ao Benomyl. Tempos superiores a 1 minuto de imersão em EtOH 70% devem ser evitados, pois podem reduzir o potencial germinativo.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, I.B. DE; PERECIN, D., KAGEYAMA, P.Y. Maturação fisiológica de sementes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Revista do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF-Atual Scientia Forestalis)**, n.38, p.41-49, 1988.

ALCÂNTARA, B.K.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M.; AZEVEDO, R.A. Methods of asepsis for in vitro establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.3, p. 7-13, 2011.

ALMEIDA, M.R. DE; RUEDELL, C.M.; RICACHENEVSKY, F.K.; SPEROTTO, R.A.; PASQUALI, G.; FETT-NETO, A.G. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 73-84, 2010.

ALMEIDA, M.R. DE; BASTIANI, D. DE; GAETA, M.L.; MARIATH, J.E. de A.; COSTA, F. DE; RETALLICK, J.; NOLAN, L.; TAI, H.H.; STRÖMVIK, M.V.; FETT-NETO, A.G. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. **Plant Science**, v. 239, p.155–165, 2015.

BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. Enxertia in vitro na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. **Pesquisa Agropecuária**

Brasileira, Brasília, v.41, n.2, p.223-232, 2006.

BATISTA, A.F.; SANTOS, G.A. DOS; SILVA, L.D.; QUEVEDO, F.F.; ASSIS, T.F. de. Influência do sistema de corte basal de miniestacas na propagação clonal de híbrido de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus globulus* subsp. *Maidenii*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.6, p.1115-1122, 2014.

BONFANTE, P.; ANCA, I.A. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 63, p. 363–383, 2009.

BOZELL, J.J.; HOLLADAY, J.E.; JOHNSON, D.; WHITE, J.F. **Top value-added chemicals from biomass – volume II – results of screening for potential candidates from biorefinery lignin**. Springfield, VA, USA: National Technical Information Service, US Department of Commerce. 2007.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.G.; WENDLING, I.; AZEVEDO, J.H. Estabelecimento, multiplicação e alongamento in vitro de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, p.11-19, 2009.

BROWSE, P.M.A. **A propagação das plantas**. Lisboa: Europa-América, 1979. 228p.

CAHILL, D.M.; BENNETT, I.J.; MCCOMB, J.A. Resistance of micropropagated *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Disease**, v. 76, n. 6, p. 630-632, 1992.

CANETTIERI, E.V.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO JR., J.A.; SILVA, J.B.A. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 422-428, 2007.

CASTELLANI, E.D.; SILVA, A.; BARRETO, M.; AGUIAR, I.B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var *variegata*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.1, p. 41-44, 1996.

CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. **A contaminação in vitro de plantas**. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 122 - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF, Maio, 2006.

CORDER, M.P.M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

CORRÊA, L. da R.; PAIM, D.C.; SCHWAMBACH, J.; FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as

regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n.63–73, 2005.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Enraizamento in vitro de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 4, p. 1.012-1.017, 2009.

DIAS, P.C.; OLIVEIRA, L.S. de; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira/Brazilian Journal of Forestry Research**, Colombo, v. 32, n.72, p. 453-462, 2012.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação do eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009.

EFFEGEM, C.; GONTIJO, A.B.P.L.; CAMPANHARO, A.; GONTIJO, I. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v.10, n.18, p.1221-1228, 2014.

EK, M., LOTUS, C.; STENSTRUM, E. IAA production by VAM fungi determined by GC-MS. **New Phytologist**, v. 94, p. 401 – 467, 1993.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERMINO JUNIOR., P.C.P.; NAGAO, E.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental/In vitro establishment, germination and multiplication of teak (*Tectona grandis* L.f) from genotypes of South-Western Amazon. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERMINO JUNIOR., P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE)/In vitro germination and propagation of cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST M. Tansley review: *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, p. 911–929, 2008.
GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.43-76.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JÚNIOR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

HOULLOU, L.M.; SOUZA R.A. de; GREGÓRIO, S.; CAVALCANTE, P. de F.; OLIVEIRA, I. S. de; TORRES, G.R. de C. **Avaliação do potencial da germinação in vitro no resgate e conservação de espécies arbóreas da flora brasileira**. In: **Anais do XI Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, Poços de Caldas, MG, maio 2014.

IGLESIAS-TRABADO, G.; WILSTERMANN, D. **Eucalyptus universalis. Global cultivated eucalypt forests map 2008**. Version 1.0.1. In: **GIT Forestry Consulting's EUCALYPTOLOGICS**. 2008.

LEI, Z.P.; JIN, J.R.; WANG, C.W. **Antagonism between ectomycorrhizal fungi and plant pathogens**. In: BRUNDETT, M.; DELL, B.; MALAJCZUK, M. (eds) **Mycorrhizas for plantation forestry in Asia**. Proceedings of an International Symposium and Workshop, 7–11 November 1994, Kaiping, China. **Australian Centre for International Agricultural Research, Proceedings**, No. 62, Canberra, Australia, pp 77–81, 1995.

MAMEDES, T.C.; SILVA, S.A. da. **Desinfestação e germinação in vitro de sementes de ipê roxo**. In: **Anais do VIII Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação**, Universidade Estadual de Goiás, novembro de 2010.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. **Regeneração in vitro de louro-pardo (Cordia trichotoma (Vellozo) Arrabida ex Steudel)/In vitro regeneration of louro-pardo (Cordia trichotoma (Vellozo) Arrabida ex Steudel)** **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 11, n. 2, p. 93-101 93

McCOMB, J.A.; BENNETT, I.J. **Eucalypts (Eucalyptus spp.)**. In: Bajaj, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Trees 1. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v. 1, p. 340-362.

MITCHELL, R.J.; GARRELL, H.E.; COX, G.S. **Boon and ectomycorrhizal influence on IAA lereb and peroxidase activity of Pinnus roots**. **Tree Physiology**, v. 1, p. 1- 8, 1996.

MOURA, V.P.G.; GUIMARÃES, D.P. **Produção de mudas de Eucalyptus para o estabelecimento de plantios florestais**. **Comunicado Técnico – EMBRAPA/CENARGEM**, Brasília, v.85, p. 1-9, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures**. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NASCIMENTO, N.C. do; FETT-NETO, A. G. **Plant secondary metabolism and**

challenges in modifying its operation: an overview. In: FETT-NETO, A. G. (ed.). **Plant secondary metabolism engineering (series) - Methods and applications**, v. 643, Chap. 1, 2010.

NASCIMENTO, P.K.V. do; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NUNES, E.C.; CASTILHO, C.V.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.70, n.1, p.259-268, 2002.

PAIVA J.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M.; SAN-CLEMENTE. H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J. et al. Advancing Eucalyptus genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis genes from deep-coverage BAC libraries. **BMC (BioMedCentral) Genomics**, v.12, p. 137, 2011.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. 1a ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1997.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; FONSECA, E.S.; PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Intercropped silviculture systems, a key to achieving soil fungal community management in Eucalyptus plantations. **PLOS ONE**, v.10, n.2, p. 1-13, 2015.

SCAGEL, C.F.; LINDERMAN, R.G. Influence of ectomycorrhizal fungal inoculation on growth and root IAA concentrations of transplanted conifers. **Tree Physiology**, v. 18, p. 739-747, 1998.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; PACIFICO, S.; MONACO, P.; FIORENTINO, A. Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. **Phytochemistry Reviews**, v.12, p. 803-830, 2013. DOI 10.1007/s11101-013-9281-9

SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R. de C. Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispata*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M. Effects of different environmental stresses on seed germination. **Seed Science and Technology**, v.28, n.16, p.621-630, 2000.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de *Eucalyptus pellita* L./Use of sodium hypochlorite in sterilization of culture medium for multiplication of *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

TERMIGNONI, R.R.; WANG, P.-J.; HU, C.-Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, n. 2, p. 129-132, 1996.

VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. In vitro organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v.42, p.225-228, 1998.

XAVIER, A.; OTONI, W.C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomia Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.2, p.139-143, maio 2003.

ABSTRACT: The control of exogenous contamination is one of the challenges in in vitro cultures, especially when it comes to germination. Contaminations are responsible for the low germination and survival rates of the seedlings. Despite the abundant bibliography alluding the in vitro cultures asepsis of *Eucalyptus* seeds and other Myrtaceae, the low germination percentage rate is a constant. This study aims to establish an aseptic protocol to a good germination and seedling survival rates of *Eucalyptus grandis* seeds. Thus, the pelleted seeds were washed with tap water and/or sterilized, followed by immersion in 70% ethanol, immersion in 1, 2.5 or 5% sodium hypochlorite, and then, immersion in 1% Maxim fungicide solution, in different sequences and times, making five treatments. After this, each seed was placed in a test tube containing Murashige & Skoog medium. The experiment was maintained in a growth room for 64 days, at controlled photoperiod and temperature. Percentages of germination, contamination, rooting and survival were analyzed by a completely randomized experimental design.

KEYWORDS: asepsis; seeds; *Eucalyptus*, contamination.

CAPÍTULO V

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ASPERGILLUS SP PELA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE PÓ DE FUMO PROVENIENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE TABACO

**Joyce Cristina Gonçalves Roth
Valeriano Antonio Coberllini**

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ASPERGILLUS SP PELA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE PÓ DE FUMO PROVENIENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE TABACO

Joyce Cristina Gonçalves Roth

Universidade de Santa Cruz do Sul, Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental.

Valeriano Antonio Coberllini

Universidade de Santa Cruz do Sul, Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental.

RESUMO: Otimizar a produção de biomassa de cepas de *Aspergillus* sp. para estudos de adsorção pode indicar um possível emprego de microrganismos na biossorção de constituintes do tabaco presentes nos efluentes. Para isso, esporos de amostras de *Aspergillus* sp. foram suspensos em solução 0,02% de ágar bacteriológico. Dessa solução, 0,5 mL foi aplicada em placa de Petri contendo 5 mL de ágar Sabouraud preparado com extrato pó-de-fumo. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h até iniciar a cobertura da superfície do ágar. A produção de biomassa se deu por fermentação em superfície líquida e fermentação submersa em 24 erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de caldo extrato pó de fumo, e inoculados com 1 mL de uma suspensão padronizada de esporos (1×10^5 UFC/mL) incubadas a 30°C por 8 dias em estufa estática e com agitação. Amostras foram coletadas a cada 48 h, e filtradas. Maiores produtividades de biomassa foram atribuídas ao crescimento sob agitação. Os espectros de infravermelho do caldo revelaram uma tendência de diminuição da intensidade da absorção das amostras após 192 horas de contato. A confirmação de modificações químicas no caldo e na biomassa deu-se pela análise multivariada dos dados (PCA e HCA), e permitiram verificar similaridades entre os conjuntos de dados associado ao caldo de pó de fumo como meio nutritivo. Conclui-se que as espécies de *Aspergillus* estudadas apresentam comportamentos diferenciais frente ao meio extrato de fumo, sendo as amostras *A. niger* as mais adaptadas às condições nutricionais fornecidas pelo pó de fumo.

PALAVRAS-CHAVE: Efluentes. Pó de fumo. *Aspergillus*. Biossorção.

1. INTRODUÇÃO

Em virtude das quantidades e de certas características das substâncias poluidoras, como persistência e toxicidade, a poluição ambiental representa um perigo para a saúde humana, de animais e de plantas, além de comprometer a habilidade ambiental para sustentação da vida. Os meios aquáticos recebem altas quantidades de resíduos domésticos e rejeitos industriais, que comprometem a qualidade ambiental de fauna e flora, estando ligados diretamente às necessidades e à saúde humana.

A utilização de organismos vivos para remover ou reduzir poluentes no ambiente tem sido muito pesquisada e recomendada como meio ecologicamente mais adequado para o tratamento de áreas contaminadas, indicada para águas

superficiais, subterrâneas, solos, resíduos e efluentes industriais e também aterros (GAYLARDE et al, 2005). O emprego de microrganismos tem se destacado por ser uma tendência em expansão na biotecnologia ambiental, como demonstram Ferreira-Leitão (2010), pela redução potencial poluidor agregado aos materiais orgânicos quando indevidamente dispersos nas matrizes ambientais por ação microorganismos; Mancera-López et al. (2015) pelos estudos de biorremediação de solos contaminados com trinitrotolueno empregando fungos da podridão branca - *Gymnopilus luteofolius*, *Kuehneromyces mutabilis*, e *Phanerochaete velutina*. Nesse trabalho foi possível observar a grande capacidade do fungo *P. velutina* que foi capaz de degradar 80% do poluente em 2,5 meses.

Da mesma forma, Yang et al. (2016) demonstraram a capacidade potencial de fungos isolados de um córrego na China na remoção de diferentes corantes sintéticos. Gola et al. (2016) comprovaram a capacidade de biorremediação de diferentes metais pesados utilizando o fungo entomopatogênico *B. bassiana* através de observação de mudanças estruturais na célula utilizando diferentes análises microscópicas.

Segundo Evans e Furlong (2003), os microrganismos apresentam capacidade de degradar as mais perigosas e recalcitrantes substâncias presentes no ambiente graças a mecanismos naturais de degradação existentes. Esta aplicação estende-se aos resíduos sólidos e líquidos, além de sua aplicabilidade em técnicas de remediação de meios contaminados pelos mais diversos poluentes (HOGG, 2005).

Em virtude de sua elevada tolerância a concentrações poluentes em comparação as bactérias, os fungos vêm sendo investigados desde meados de 1980 em termos da sua capacidade de remediação (GADD et al, 2005) e muitos estudos são conduzidos na intenção de demonstrar o potencial dos fungos em aplicações de biorremediação, em particular do gênero *Aspergillus*.

A produção de tabaco é uma das atividades agroindustriais de maior importância econômica e social na região Sul do Brasil, representando grande significância na região do Vale do Rio Pardo. Como toda atividade industrial, necessita de grandes volumes de água em seus processos.

Segundo Souza Cruz (2009), o processamento industrial do tabaco envolve a passagem do produto por cilindros onde são adicionados água e vapor. A etapa seguinte é a separação mecânica da lâmina e do talo realizada pelos separadores e debulhadores. A água adicionada é descartada, sendo enviada a estação de tratamento. A água saturada possui coloração marrom escura devido aos constituintes do talo que são extraídos durante o processo (SOUZA CRUZ, 2009).

Neste sentido, otimizar a produção de biomassa de cepa de *Aspergillus* sp. selecionada para estudos de adsorção (produção de biossorvente), no que se refere a variáveis de processo como fermentação submersa ou em superfície, indicaria em possível emprego de microrganismos na biossorção de constituintes do tabaco presentes em efluentes resultantes do processo industrial.

2. METODOLOGIA

2.1 Crescimento das amostras de *Aspergillus* sp.

Amostras de *Aspergillus* sp. foram inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de ágar Sabouraud (Oxoid) inclinado e incubadas a 30 °C até formação de micélio reprodutor (7 dias). Os esporos foram suspensos em solução 0,02% de ágar bacteriológico (Himedia) e 0,5 mL desta solução foi aplicada em placa de Petri de 7 cm de diâmetro contendo 5 mL de ágar Sabouraud preparado com extrato pó-de-fumo (65 g/L de caldo). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h até iniciar a cobertura da superfície do ágar.

2.2 Produção de biomassa

A preparação do caldo extrato de pó-de-fumo se deu através de 1 litro de água deionizada para cada 100 g de pó de fumo. A produção de biomassa através das cepas se deu por fermentação em superfície líquida e fermentação submersa em 24 erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de caldo extrato pó-de-fumo, e inoculados com 1mL de uma suspensão padronizada de esporos com 1×10^5 UFC/mL, com incubação a 30 °C por 8 dias em estufa de cultura bacteriológica Quimis modelo Q316M5 (fermentação em superfície líquida) e estufa com agitação e circulação de ar modelo Marconi MA- 420 a 170 RPM (fermentação submersa).

Amostras de culturas foram coletadas em triplicata a cada 48 h, sendo o conteúdo de cada frasco filtrado a vácuo com auxílio de papel filtro previamente tarado após secagem em estufa a 40 °C por 24 h. Após a filtração, o papel filtro foi pesado, repetindo-se a operação de secagem. Finalmente o material seco ser pesado e a diferença entre o peso inicial e o peso final resultou no valor do peso seco da biomassa.

3. RESULTADOS

3.1 Análise do caldo preparado de fumo e efluente

Conforme a natureza vegetal do efluente e do caldo de fumo, resíduos moleculares da estrutura da clorofila deveriam estar presentes, uma vez que o caldo foi preparado por meio de um material de origem vegetal, classificado pela indústria fumageira como resíduo. Em termos estruturais a clorofila é uma molécula complexa e sob certas condições é degradada gerando estas formas residuais (STREIT et al., 2005).

Estas estruturas residuais moleculares foram confirmadas pela observação dos espectros de infravermelho. A existência de uma banda mais intensa na região de 3300 cm^{-1} possivelmente está associada ao resíduo fitol que possuem em sua

extremidade um grupamento OH, enquanto os estiramentos observados na região de 1610 cm^{-1} que correspondem a ligação C=N, e 1081 cm^{-1} que corresponde a ligação C-O do éster alifático, ambos pertencentes à estrutura do anel porfirina associado à molécula de clorofila.

3.2 Ensaio e otimização da produção de biomassa

A evolução da produtividade de biomassa, em diferentes tempos de avaliação, tanto em condição de incubação estática e agitada, pode ser visualizadas pelas figuras 1 e 2.

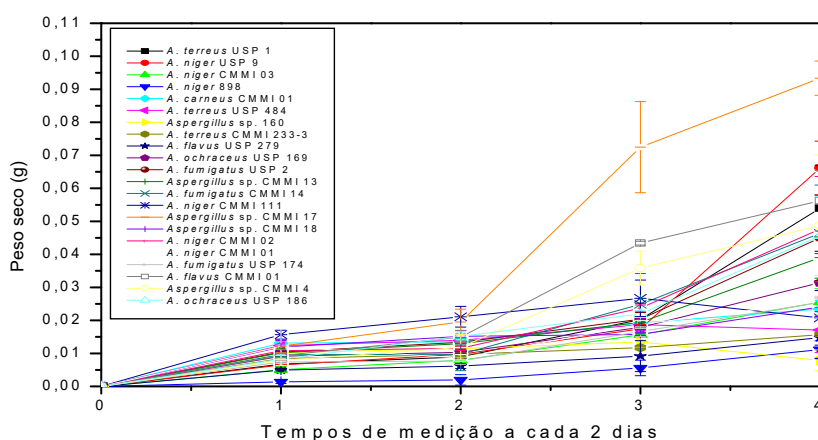


Figura 1- Variação de peso seco em estufa, sem agitação.

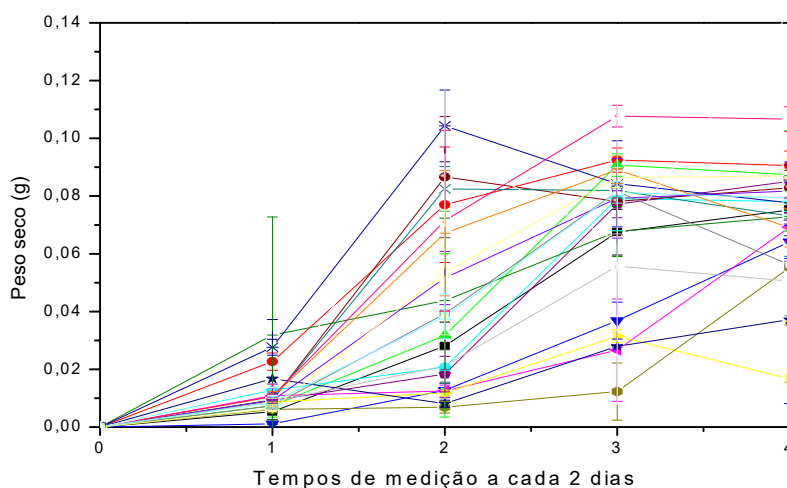


Figura 2 - Variação de peso seco em estufa, com agitação.

Na estufa sem agitação a maior produção de biomassa foi atribuída a amostra a *Aspergillus sp. CMMI 17* seguida pela amostra *A. niger USP 9*. Para a condição agitação, verificaram-se menores variações de peso seco para as diferentes

amostras de *Aspergillus* sp., com maiores produtividades relacionadas às amostras *A. niger* CMMI 02 e *A. niger* USP 9, corroborando os resultados obtidos pelo crescimento micelial radial.

A diferença encontrada na comparação dos resultados de crescimento micelial e peso seco na condição estática pode ser atribuída ao comportamento de fungos não adaptados ao meio apresentam maiores taxas de crescimento buscando colonizar novos meios com nutrientes mais adequados. A velocidade de crescimento micelial, portanto, não foi utilizada como critério para a seleção de da cepa mais adequada ao ensaio de biossorção. Esta seleção se deu a partir da produção de biomassa.

Outra diferenciação entre as condições de crescimento quando agitada ou estática está atribuída à produtividade de biomassa nestas diferentes condições. Maiores produtividades de biomassa foram atribuídas ao crescimento sob agitação, que apresentou 0,103 g como maior valor de peso seco, enquanto que na condição estática o maior valor de peso seco foi de 0,093 g e foi bem superior os demais valores de peso seco nestas condições.

Além da produção de biomassa e, conseqüentemente, sua atribuição na forma de peso seco, foi avaliada qualitativamente também a capacidade de absorção de pigmentos presentes no meio de cultura líquida. As amostras retiradas da estufa agitada, no quarto tempo de medição (192 horas), que apresentaram melhor evidência de absorção foram as amostras *A. niger* CMMI 01, *A. niger* CMMI 02, *A. niger* USP 898 e *A. niger* USP 9, conforme visualizado na figura 3.

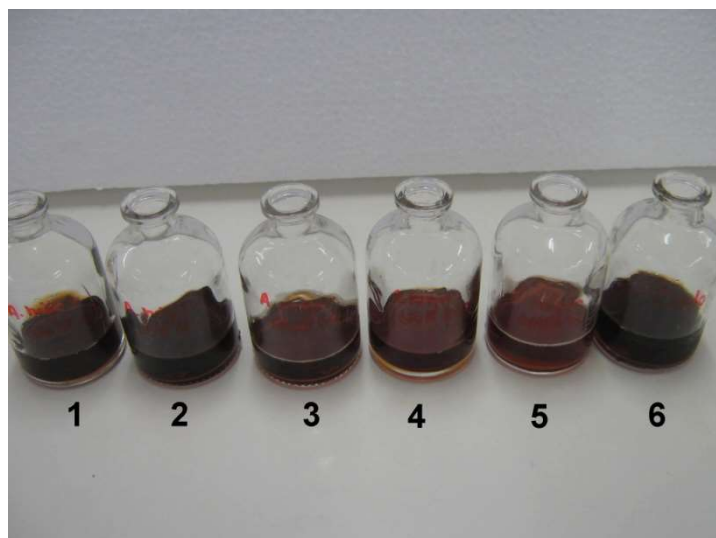


Figura 3- Cor residual do caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de algumas cepas de *Aspergillus* sp. (1) *A. niger* CMMI 03, (2) *A. niger* USP 9, (3) *A. niger* CMMI 02, (4) *A. niger* USP 898, (5) *A. niger* CMMI 01 e (6) caldo de pó-de-fumo em inoculação

Pela figura se observa uma redução gradual da cor do caldo de pó-de-fumo principalmente para as amostras *A. niger* CMMI 01, *A. niger* CMMI 02 e *A. niger* USP 898. As demais amostras também apresentaram redução da coloração do caldo sendo esta mais discreta quando comparado ao caldo puro, sem inoculação.

Pela observação dos espectros de infravermelho para o caldo verificou-se

uma tendência de diminuição da intensidade da absorção das amostras após 192 horas de contato com o caldo, indicando um consumo pelos microrganismos dos componentes residuais da molécula de clorofila, utilizados para seu desenvolvimento como fontes de carbono e nitrogênio.

Situação similar pôde ser observada nos espectros de infravermelho do caldo onde as amostras de biomassa permaneceram em contato com o caldo por 24 horas, sendo verificadas mudanças no meio pela diminuição de algumas bandas de absorção. Assim, afirma-se intuitivamente que já existe uma boa adaptação às condições do meio caldo de pó-de-fumo em apenas 24 horas de contato.

A confirmação destas modificações químicas no caldo bem como na biomassa, procedeu-se com a análise multivariada dos dados por meio de PCA e HCA. Estudo via PCA permitiu a verificação de similaridades entre os conjuntos de dados associado ao caldo de pó-de-fumo utilizado durante 192 horas como meio nutritivo para o desenvolvimento das amostras de *Aspergillus* sp.

Considerando toda a faixa de comprimento de onda por meio de um diagrama bidimensional de scores, houve a formação de dois grupos distintos, mostrados pela figura 4. As três primeiras componentes (PC1, PC2 e PC3) permitiram a clara separação de dois grupamentos, não havendo necessidade pela consideração das demais componentes principais. Estas três primeiras componentes descrevem 76,73% dos dados.

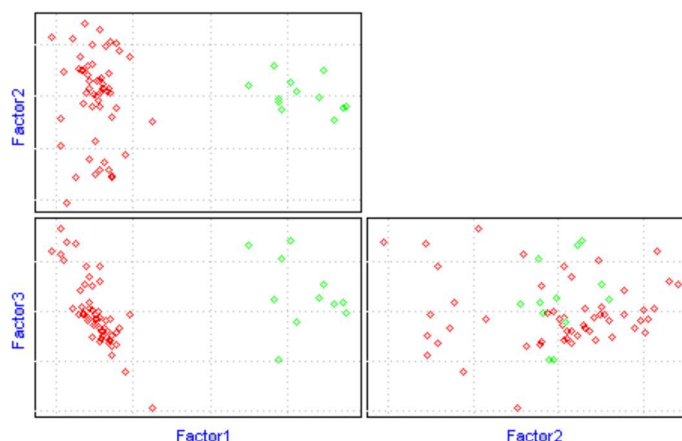


Figura 4 - Gráfico de scores de PCA de espectros FTIR (4000 a 600 cm^{-1}) de caldo de pó-de-fumo após 192 horas de cultivo de cepas de *Aspergillus* sp.. Amostras em verde: cepas cujos caldos apresentaram maior remoção qualitativa de cor; amostras em vermelho: demais cepas.

A HCA mostrou a distinção entre os dois principais grupos já verificados pela PCA quando observado o caldo após 192 horas de contato com a biomassa. Quando analisamos toda a região de absorção de infravermelho (4000 a 600 cm^{-1}), o dendograma obtido mostra a formação de dois grupos com similaridade próxima de 0,300. Um deles está relacionado a amostras de maior biossorção, com índice de similaridade de 0,585, enquanto o outro grupo apresenta muitas extensões sem aparente tendência à formação de grupamentos em função das diferenças em termos de absorção pelas amostras.

4. CONCLUSÕES

Verificou-se que as espécies de *Aspergillus* estudadas apresentam comportamentos diferenciais frente ao meio extrato de fumo, sendo as amostras *A. niger* as mais adaptadas às condições nutricionais fornecidas pelo pó de fumo.

O ensaio de produção de biomassa demonstrou qualitativamente a redução da cor para o meio líquido formado pelo caldo preparado de fumo. Estes resultados estimularam o emprego da biomassa na remoção de pigmentos presentes em efluente de indústria fumageira. A análise multivariada permitiu a comprovação de diferenças existentes entre aquelas amostras que apresentaram taxas de absorção distintas durante a fase de fermentação.

O seu emprego como bioprocesso pode ser somado ao tratamento de efluentes de indústrias fumageiras que enfrentam problemas na reutilização de seus resíduos líquidos, atribuídos a sua coloração.

Em adição, o meio preparado com extrato de fumo pode se tornar um meio seletivo para espécies distintas de fungos, uma vez que a formação do halo se deu para algumas das espécies estudadas, como foi verificado por Khan et al (2004) no estudo e diferenciação de duas espécies de *Candida* pelo uso de meio preparado com pó de fumo.

Espera-se ainda estudar a viabilidade de emprego do resíduo pó de fumo como fonte alternativa para a produção de bioprodutos de alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

EVANS, G. M.; FURLONG, J. C. **Environmental Biotechnology**: theory and application. England: John Wiley & Song Ltd , 2003.

FERREIRA-LEITÃO, V. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, 65–76, 2010.

GADD, G. M. **Fungi in Bioremediation**. New York: Cambridge University Press, British Mycology Society, 2001.

GAYLARDE, C. C. et al. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Rev. Biotecnologia Ciência e tecnologia**, 34: 36-43, 2005.

GOLA, D. et al. Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. **Bioresource Technology**, v. 218, 388-396, 2016.

HOGG, S. **Essential Microbiology**. England: John Wiley & Song Ltd, 2005.

IWAMOTO, T; NASU, M. Current Bioremediation Practice and Perspective: review. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 1, 1-8, 2001.

SOUZA CRUZ. Nosso negócio: processamento do fumo. Disponível em: <www.souzacruz.com.br>. Acesso em: fevereiro de 2009.

YANG, P. et al. Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, 828-834, 2016.

ABSTRACT: Optimize the biomass production of *Aspergillus* sp. For adsorption studies may indicate a possible use of microorganisms in the biosorption of tobacco constituents present in the effluents. For this, spores of *Aspergillus* sp. Were suspended in 0.02% bacteriological agar solution. From this solution, 0.5 mL was applied in Petri dish containing 5 mL of Sabouraud agar prepared with powdered smoke extract. The plates were incubated at 30 ° C for 48 h until the surface cover of the agar began. Biomass production was by fermentation on a liquid surface and submerged fermentation in 24 mL 50 mL Erlenmeyer flasks containing 15 mL of broth extract smoke powder and inoculated with 1 mL of a standard suspension of spores (1x10⁵ CFU / mL) incubated at 30 ° C For 8 days in a static greenhouse with agitation. Samples were collected every 48 h and filtered. Higher biomass yields were attributed to growth under agitation. Infrared broth spectra revealed a tendency to decrease the absorption intensity of the samples after 192 hours of contact. Confirmation of chemical modifications in the broth and biomass was made by the multivariate analysis of the data (PCA and HCA), and allowed to verify similarities between the data sets associated to the smoke powder broth as a nutrient medium. It is concluded that the species of *Aspergillus* studied presented differential behaviors against the medium smoke extract, and the *A. niger* samples were the most adapted to the nutritional conditions provided by the smoke powder.

KEYWORDS: Effluents. Smoking powder. *Aspergillus*. Biosorption.

CAPÍTULO VI

PROSPECÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA qPCR EM PEIXE-REI (*Odontesthes humensis*): CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA β - ACTINA

Lucas dos Santos da Silva
Bruna Fagundes Barreto
Ingrid Medeiros Lessa
William Borges Domingues
Tony Leandro Rezende da Silveira
Vinicius Farias Campos

PROSPECÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA qPCR EM PEIXE-REI (*Odontesthes humensis*): CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA β -ACTINA

Lucas dos Santos da Silva

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

Bruna Fagundes Barreto

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

Ingrid Medeiros Lessa

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

William Borges Domingues

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

Tony Leandro Rezende da Silveira

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

Vinicius Farias Campos

Laboratório de Genômica Estrutural
Universidade Federal de Pelotas
Pelotas – Rio Grande do Sul

RESUMO: Utilizados como controle interno da técnica de qPCR, os genes de referência devem obrigatoriamente exibir um padrão de constitutiva para a obtenção de um resultado fidedigno. As actinas são proteínas altamente conservadas e a evolução desta família gênica tem sido bastante estudada, tendo o gene da isoforma β recebido destaque devido ao seu caráter de manutenção. Dentre as espécies de teleosteos com potencial aquículo, destaca-se o peixe-rei (*Odontesthes humensis*), o qual pertence à família Atherinopsidae, sendo extremamente exigente em termos de qualidade de água. Sendo assim, este animal vem recebendo atenção de pesquisadores, pois, quando submetido a uma situação de estresse, o mesmo acaba respondendo de maneira em que sua maquinaria molecular seja direcionada à sua sobrevivência. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a clonagem molecular, o sequenciamento e a caracterização do gene da β -Actina em peixe-rei. Foi realizado a confecção de primers específicos para a amplificação da β -Actina. Após, foi realizada a clonagem molecular deste gene através da PCR com gradiente de temperatura e posterior sequenciamento do mesmo através do método de

Sequenciamento de Sanger automatizado.

PALAVRAS-CHAVE: Genes de referência, PCR, β -Actina e Sequenciamento

1. INTRODUÇÃO

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação in vitro de sequências de DNA. Ela foi desenvolvida pelo bioquímico americano Kary Mullis e seus colaboradores e apresentada oficialmente ao público em 1986 (MULLIS et al., 1986). A PCR logo revolucionou a ciência e rendeu a Mullis o prêmio Nobel de Química de 1993. Atualmente a PCR subsidia a grande maioria dos estudos sobre o código genético nas mais diversas áreas do conhecimento. Com a PCR bem estabelecida, surgiram variações desta técnica, como a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) em tempo real, a qual foi descrita por Higuchi e seus colaboradores. Esta técnica permite o acompanhamento da amplificação da amostra molde, a cada ciclo de amplificação, sendo um método de detecção e quantificação extremamente confiáveis.

A utilização da qPCR para realizar a quantificação absoluta ou relativa dos níveis de transcrição de RNAs mensageiros (mRNAs) inovou a compreensão de respostas celulares através do entendimento de interações moleculares. Devido ao seu custo, especificidade, sensibilidade e simplicidade, esta técnica molecular tem sido amplamente utilizada para verificar alterações de expressão de um ou mais genes de interesse. Além das vantagens citadas acima, a qPCR possui suas interações químicas e análise de dados bem estabelecidas, oferecendo uma gama de vantagens em comparação aos métodos tradicionais, tais como Northern blot e PCR semi-quantitativo.

Como a qPCR é uma técnica extremamente precisa, que permite a detecção de pequenas alterações na expressão gênica entre as amostras, é de extrema importância que se possua um grande cuidado em cada etapa anterior da qPCR, tanto de preparação da amostra quanto de processamento. Mesmo com o extremo cuidado, variações metodológicas podem acontecer, para isso é utilizado uma forma de normalização dos dados, visando minimizar ou corrigir variações experimentais inevitáveis. No método de quantificação absoluta da qPCR, o nível crescente de sinal fluorescente emitido pelos produtos amplificados pela reação é comparado a uma curva padrão. Porém, quando realizada a quantificação relativa da expressão gênica, utiliza-se a seguinte fórmula matemática: $2^{-\Delta\Delta CT}$, mas para isso é necessário a utilização de genes de referência para realizar o cálculo.

Os genes de referência devem exibir uma expressão constitutiva para a obtenção de um resultado confiável. Esses genes, são utilizados como controle interno da qPCR, possuindo sequências de DNA diferentes do gene alvo que está sendo analisado. Para que um gene seja estabelecido como referência confiável, ele deve possuir características notáveis de expressão, como a não variabilidade de expressão causada por fatores experimentais. Ainda, este gene deve manter a sua expressão regular em todo e qualquer tecido e estado fisiológico do organismo. Além

disso, é desejável que este gene demonstre a menor variabilidade resultante em relação a diferentes tecnologias utilizadas em procedimentos de preparação de amostra, como a utilização de kits comerciais e reagentes de diferentes marcas, por exemplo. Além disso, este gene deve possuir expressão estável em diferentes concentrações e tratamentos em um experimento específico. É sabido que genes de metabolismo básico exercem o desempenho perfeito dessas condições, e que por definição, estão envolvidos em processos essenciais para a sobrevivência das células, devem ser expressos em um nível constante e não regulado constantemente e de fato, eles foram primeiro examinados como genes de referência (THELLIN et al., 1999). Assim, é necessário validar vários genes de referência para várias espécies e seus estágios de desenvolvimento em diferentes tecidos, bem como para cada tipo de condição ambiental controlada (LIVAK e SCHMITTGEN 2001; ZHENG e SUN 2011).

Todavia, não é isso que encontramos em trabalhos relacionados à quantificação da expressão gênica relativa em teleósteos. Grande parte dos trabalhos utilizam genes normalizadores bem estabelecidos em espécies de mamíferos. Os principais genes de referência de mamíferos que têm sido utilizados em espécies de teleósteos são a β -Actina (CHOI; AN, 2008; NAWATA et al., 2010), EF1 α (NILSEN et al., 2007; PATTERSON; BODINIER; GREEN, 2012; SCOTT et al., 2004; SINHA et al., 2015), GAPDH (LIN et al., 2004), 18S (SINHA et al., 2015), entre outros.

A subunidade ribossômica 18s é um constituinte da pequena subunidade ribossomal eucariótica 40s, portanto, é um componente básico de todas as células. Porém, o gene que codifica para essa subunidade ribossômica possui menor grau de conservação da sua sequência entre as espécies do que GAPDH e as actinas. Apesar do seu menor grau de conservação, esse gene é utilizado para reconstruir ou elucidar histórias evolutivas dos organismos. Além disso, este gene tem sido utilizado como referência principalmente para análises filogenéticas e análises de marcadores para biodiversidade ambiental.

O fator de alongamento 1 Alfa (EF1- α) é uma isoforma da subunidade alfa complexa de eEF-1. É uma proteína codificada pelo gene eEF1 α 1 e expressa em célula eucarióticas, o qual desempenha seu papel na tradução proteica, além de participar no processo de proliferação celular, envolvendo a organização do citoesqueleto e a transdução de sinal. Além disso, este fator de alongamento é relatado como mediador de recrutamento de aminoacil-tRNA durante a síntese proteica. O grau de conservação deste gene é comparado com o alto grau de conservação do gene β -actina, sendo considerado um gene de referência confiável.

O tetrâmero glicolítico gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma proteína que catalisa a conversão do gliceraldeído 3-fosfato em D - glicerato 1,3-bisfosfato, fornecendo energia e moléculas de carbono para a célula. Além da sua função catalisadora, esta proteína regula processos não metabólicos, tais como, ativação da transcrição, apoptose e transporte axoplasmático. Comparando esta proteína com a família de proteínas actina, o GAPDH possui um menor número de cópias em regiões de codificação intraespecíficas, no entanto, sua sequência é

suficientemente conservada entre os diferentes tipos de filamentos animais, tornando um gene confiável para ser utilizado como referência.

As actinas são proteínas altamente conservadas responsáveis por desempenhar papéis importante nas células, tais como, fluxo citoplasmático, alterações na motilidade e forma celular, divisão celular e fagocitose. Além disso, essas proteínas são o principal componente dos microfilamentos citoplasmáticos em células eucarióticas. A evolução desta família gênica tem sido bastante estudada e o gene da isoforma β tem sido amplamente estudado em diversas espécies de mamíferos, crustáceos e peixes, devido ao seu caráter de manutenção e sua utilização em pesquisas na área de transgênese.

Dentre as espécies de teleósteos com potencial aquícola está o peixe-rei (*Odontesthes humensis* de Buen, 1953). Esse peixe pertence à família Atherinopsidae, sendo normalmente encontrados em lagoas costeiras e áreas estuarinas de países como a Argentina, Brasil e Uruguai. Por sua origem marinha, é um peixe exigente em termos de qualidade de água, ocupando ambientes de água doce e água salobra. Visto isso, este peixe vem recebendo atenção de pesquisadores, pois, quando submetido a determinados tipos de estresse, acaba respondendo de maneira em que sua maquinaria molecular seja em resposta à sua sobrevivência.

Dessa forma, buscando subsidiar estudos futuros de toxicologia molecular em espécies aquáticas, utilizando a técnica da qPCR, considerada “padrão ouro” para análises de expressão gênica, é notável a necessidade de um gene de referência específico para a espécie *Odontesthes humensis*. Dessa maneira, o gene da β -Actina, o qual apresenta uma alta taxa de conservação entre inúmeras espécies e com função bem elucidada na literatura, torna-se um ótimo candidato para referência. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo a clonagem molecular, o sequenciamento e a caracterização do gene da β -Actina em peixe-rei.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho de Primers

Foram confeccionados primers específicos para a amplificação do gene da β -Actina. Como a sequência deste gene em peixe-rei (*Odontesthes humensis*) ainda não havia sido elucidado na literatura, houve a necessidade de desenhar primers, os quais foram baseados em sequências estruturais de outros organismos próximos filogeneticamente ao peixe-rei, já depositadas no banco de dados Genbank®. Os primers foram desenhados com auxílio do software online Prifi (<http://cgi-www.cs.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>), o qual baseia-se no alinhamento das sequências utilizadas, a fim de encontrar uma determinada região gênica com o maior grau de conservação possível as sequências utilizadas como data input.

2.2 Coleta Tecidual

A coleta de tecidos de peixe-rei foi realizada no município de Arroio Grande (RS), no Laboratório de Piscicultura na Barragem do Chasqueiro - UFPel. Os animais utilizados no estudo foram mantidos em tanques cilíndricos de 1.000 L, alimentados três vezes ao dia (Supra, 38% de proteína bruta) até a saciedade, com água em pH $7,5 \pm 0,3$ e $19 \pm 0,3^\circ\text{C}$ para aclimatação.

Os animais foram submersos em uma solução de anestesia composta de benzocaína a 50mg/L, até a perda total de equilíbrio, enquanto anestesiados, os mesmos foram eutanasiados por meio de secção medular e excisão cerebral, visando a posterior retirada dos tecidos de interesse, tais como, tecido branquial, cerebral, hepático e renal, de acordo com as Diretrizes da prática de eutanásia do Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os tecidos foram criopreservados em N_2 (-196°C) até a sua utilização.

Todos os procedimentos descritos acima foram aprovados pelo Conselho de Ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o nº de processo 7018/2015-85.

2.3 Extração de RNA

As amostras de tecido hepático criopreservados em N_2 foram descongeladas sob temperatura de refrigeração (4°C) e em seguida, foram utilizados pistilos para a lise física do tecido juntamente ao reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, USA) para lisar as células quimicamente. Logo após, foi utilizado o Clorofórmio (Sigma-Aldrich, USA) para a separação dos ácidos nucléicos, proteínas e lipídios em fases diferentes. Após o isolamento do ácido nucléico de interesse, a molécula foi submetida ao reagente Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) para precipitação da mesma e em seguida, submetida a lavagens com Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA) para a retirada de algum resquício de moléculas não desejáveis na extração, sendo o RNA eluído em água livre de nucleases posteriormente.

2.4 Quantificação por Espectrofotometria de luz UV e Síntese de DNA Complementar (cDNA)

Após a etapa de extração de RNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria de luz ultravioleta utilizando o equipamento NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Science, USA), o qual determina a concentração da amostra através de absorbância em um comprimento de onda de 260nm. Para verificar a pureza da amostra, foi utilizada a razão entre as absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm (razão A_{260}/A_{280}).

Sendo assim, as amostras que obtiveram uma concentração satisfatória e pureza ideal, foram submetidas a síntese do cDNA, com o auxílio do kit comercial

High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA), conforme as instruções do fabricante.

2.5 Clonagem Molecular e Purificação

A partir do cDNA sintetizado, bem como os primers específicos para o gene da β -Actina confeccionados, foi realizada a PCR convencional utilizando o kit comercial GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), segundo as instruções do fabricante. Foram realizadas reações de PCR com gradiente de temperatura na etapa de anelamento dos primers. Após a amplificação gênica, foi realizada a eletroforese utilizando um gel de agarose com concentração de 1,2%, buscando separar os fragmentos amplificados.

Visando obter uma amostra com concentração e pureza ideais para o Sequenciamento pelo método de Sanger Automatizado, foi realizada uma etapa de purificação utilizando o kit comercial illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, USA), conforme as instruções do fabricante.

2.6 Sequenciamento

As amostras purificadas a partir do gel de agarose com concentração de 1,2% foram utilizadas para realizar a reação de Sequenciamento pelo método de Sanger Automotizado. Foi utilizado o kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA), para a amplificação exponencial do fragmento de interesse através da utilização dos primers específicos e também pela adição de dNTPs e ddNTPs. Os procedimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

Para a purificação foi utilizado o kit comercial BigDye® XTerminator™ Purification (Applied Biosystems, USA), conforme as instruções do fabricante. Com as amostras devidamente purificadas, o sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural da UFPel, utilizando o equipamento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer® (Life Technologies, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de RNA extraídas com TRIzol®, a partir de tecido hepático apresentaram uma concentração média de 200 ng/ μ l e um grau de pureza de $A_{260}/A_{280} >1,8$. Posteriormente, pode-se verificar que os primers confeccionados foram eficazes, pois houve anelamento e amplificação do fragmento de interesse no tamanho esperado de 448bp o qual foi visualizado em gel de agarose.

Dessa forma, para obter uma amplificação ainda mais precisa, foi realizado uma segunda rodada da PCR, porém desta vez com gradiente de temperatura que

variou de 60 a 70°C. É importante realizar gradiente de temperatura para verificar o padrão de amplificação da banda, podendo assim, descartar temperaturas nas quais possa haver ampliações inespecíficas, evitando o sequenciamento de um fragmento inesperado. Logo após, com a constatação de que a melhor temperatura de amplificação foi de 64,7°C, pôde-se realizar a purificação utilizando colunas de sílica comerciais disponíveis no kit de purificação. Com o produto da PCR puro, procurou-se a melhor diluição do produto purificado, para realizar o Sequenciamento. A diluição do produto da PCR selecionado para o Sequenciamento, foi a diluição 10^{-7} (Fig.1), pois apresentou uma banda com boa concentração, compacta e livre de ampliações inespecíficas visíveis em gel de agarose.

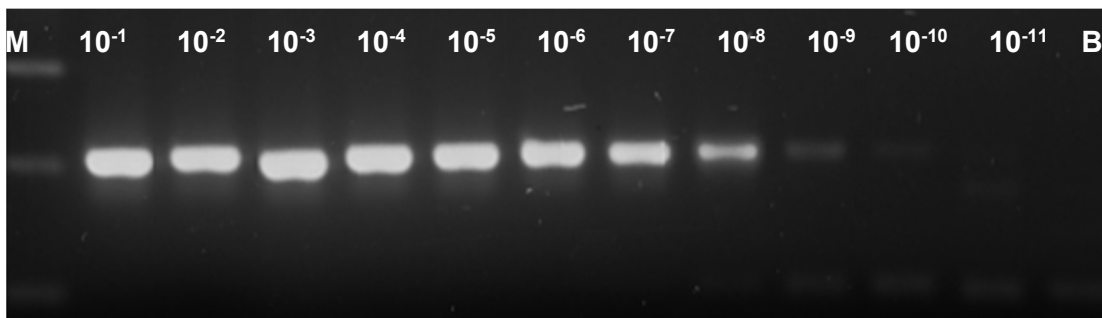


Fig. 1: Visualização em gel de agarose com concentração de 1,2% dos fragmentos amplificados por PCR com diluições, variando de 10^{-1} a 10^{-11} e controle negativo (B).

Com a amostra concentrada, pura e diluída, foi realizado o Sequenciamento pelo método de Sanger Automatizado, originando uma sequência consenso de 350bp (Fig.2), que após análise por bioinformática, apresentou identidade superior a 90% com sequências de β -Actina de outras espécies, confirmando que o gene sequenciado foi realmente o da β -Actina. Assim, a sequência gênica da β -Actina de *Odontesthes humensis* foi depositada no Genbank® sob o número de acesso KX060039.

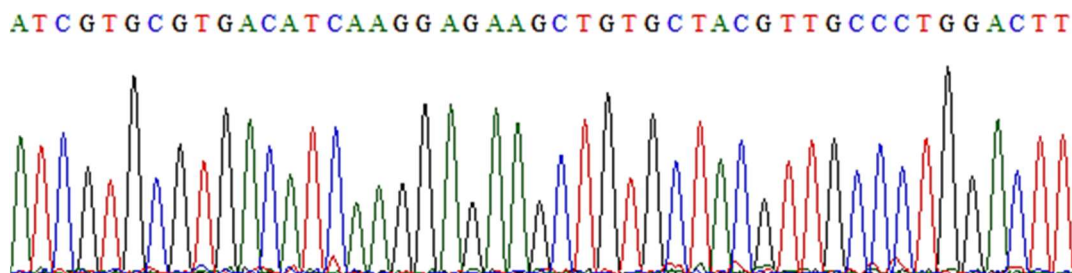


Fig. 2: Eletroferograma representativo do sequenciamento do gene da β -Actina.

4. PERSPECTIVAS

Este estudo tem como perspectiva a avaliação da eficiência da β -Actina como um gene de referência, bem como os citados ao longo do texto em peixe-rei (*Odontesthes humensis*), a fim de utilizá-los em futuros estudos como gene de

referência em quantificações relativas da expressão gênica através da qPCR.

REFERÊNCIAS

CHAPMAN, J; WALDENSTRÖM, J. **With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies.** PLoS ONE, v.1, n.1, p.1, 2015.

CHOI, C. Y.; AN, K. W. **Cloning and expression of Na⁺/K⁺-ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 149, n. 1, p. 91-100, 2008.

DUNDAS, J; LING, M. **Reference genes for measuring mRNA expression.** Theory in Biosciences, v.131, n.1, p. 215-223, 2012.

LIN, C.-H. et al. **Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation.** Journal of Experimental Zoology, v. 301A, p. 85-96, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method.** Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

NAWATA, C. M. et al. **Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure.** The Journal of experimental biology, v. 213, n.18, p. 3150-3160, 2010.

NILSEN, T. O. et al. **Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase alpha- and beta-subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*.** The Journal of experimental biology, v. 210, n.16, p. 2885-2896, 2007.

PATTERSON, J.; BODINIER, C.; GREEN, C. **Effects of low salinity media on growth, condition, and gill ion transporter expression in juvenile Gulf killifish, *Fundulus grandis*.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology, v. 161, n. 4, p. 415-421, 2012.

PUROHIT, G; MAHANTY, A; MOHANTY, B; MOHANTY, S. **Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in the murrel *Channa striatus* under high-temperature stress.** Fish Physiology and Biochemistry, v.1, n.41, p. 695-704, 2015.

SINHA, A. K. et al. **Hypo-osmotic stress-induced physiological and ion- osmoregulatory responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) are modulated differentially by nutritional status.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 181, p. 87-99, 2015.

SCOTT, G. R. et al. **Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer.** American Journal of Cell Physiology, v. 287, p. 300-309, 2004.

STURZENBAUM, S; KILLE, P. **Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.130, n.4, p. 281-289, 2001.

THELLIN, O; ZORZI, W; LAKAYE, B; DE BORMAN, B; COUMANS, B; HENNEN, G; GRISAR, T; IGOUT, A; HEINEN, E. **Housekeeping genes as internal standards: Use and limits,** v.75, n.1, p 291-295, 1999.

WENJING, R; MAODE, L. **Actin, a reliable marker of internal control?.** Clínica Chimica Acta, v. 385, n.1, p. 1-5, 2007.

XU, H; LI, C; ZENG, Q; AGRAWAL, I; ZHU, X; GONG, Z. **Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR.** Journal of Fish Biology, v.1, n 88, p. 2095-2110, 2016.

ZHENG, W.-J.; SUN, L. **Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).** Fish & shellfish immunology, v. 30, n. 2, p. 638–645, 2011.

ABSTRACT: Used as internal control of the qPCR technique, the reference genes must necessarily exhibit a constitutive standard to obtain a reliable result. Actins are highly conserved proteins and the evolution of this gene family has been studied, having the β isoform gene received prominence due to its housekeeping function. Among the species of teleosts with potential aquiculture, the pejerrey (*Odontesthes humensis*), which belongs to the family Atherinopsidae, being extremely demanding in terms of water quality. Thus, this animal has been receiving attention from researchers, since, when subjected to a stress situation, it ends up responding in a way that its molecular pathways are directed to the fish survival. In this context, this work aimed the molecular cloning, sequencing and characterization of the β -Actin gene in pejerrey. Was realized the preparation of specific primers for the amplification of β -Actin. Then, the molecular cloning of this gene was performed by PCR with temperature gradient and subsequent sequencing through the automated Sanger Sequencing method.

KEYWORDS: Reference gene, PCR, β -Actin and Sequencing.

CAPÍTULO VII

APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS UMA REVISÃO

**Ketlin Schneider
Fernanda Megiolaro
César Milton Baratto
Jane Mary Lafayette Neves Gelinski**

APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS UMA REVISÃO

Ketlin Schneider

UNOESC- Videira, PPG Mestrado em Ciência e Biotecnologia
Videira- SC.

Fernanda Megiolaro

UNOESC- Videira, PPG Mestrado em Ciência e Biotecnologia
Videira-SC.

César Milton Baratto

UNOESC- Videira, Vice- Coordenador do PPG Mestrado em Ciência e Biotecnologia,
Videira- SC.

Jane Mary Lafayette Neves Gelinski

UNOESC- Videira, Coordenadora do PPG Mestrado em Ciência e Biotecnologia,
Videira- SC.

RESUMO: A crescente preocupação na melhora da qualidade de vida, prevenção de doenças, diminuição do uso de substâncias conservantes, melhoria da qualidade sensorial de produtos tradicionais, estimula o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à caracterização molecular e tecnológicas de micro-organismos produtores de substâncias com potencial para aplicação como bioconservante, bactérias lácticas apresentam um grande potencial para a extensão da vida de prateleira de produtos, seu metabolismo produz inúmeros compostos com capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. O metabolismo fermentativo desse grupo de bactérias é caracterizado pelo acúmulo de ácidos orgânicos responsáveis pela acidificação e redução do pH do meio, de acordo com o produto final da fermentação de carboidratos, podem ser classificadas em homofermentativas e heterofermentativas, as características do metabolismo fermentativo são importantes para a fabricação de alimentos, geralmente o micro-organismos deve ser adicionado a produtos similares aos quais foram isolados, para melhor adaptação da cultura. Seu emprego principal é obtenção produtos fermentados preferivelmente produtos de origem láctea como leites fermentados, bebidas lácteas e queijos, sua aplicação nesses produtos deve-se a sua ocorrência natural na microbiota do leite e de produtos lácteos, a manutenção das características físico-químicas e microbiológicas durante a vida útil do produto, o desenvolvimento das características sensoriais do produto durante os processos de fermentação e maturação. O uso de tecnológico de bactérias lácticas para a fabricação de alimentos fermentados, apresenta novas possibilidades principalmente no que diz respeito a bioconservação, seja por sua aplicação direta em alimentos ou o uso de seus produtos metabólicos.

PALAVRAS-CHAVE: Metabolismo Fermentativo, Bacteriocinas, Bioconservação, substancias antimicrobianas, Lactobacillus sp.

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação na melhora da qualidade de vida, prevenção de doenças, diminuição do uso de substâncias conservantes, melhoria da qualidade sensorial de produtos tradicionais, tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à caracterização molecular e tecnológicas de micro-organismos produtores de substâncias com potencial para aplicação como bioconservante, as bactérias lácticas apresentam um grande potencial para a extensão da vida de prateleira de produtos, seu metabolismo produz inúmeros compostos com capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (DE SOUZA, 2006; HERMMANS, 2013).

Ao longo dos anos a indústria de laticínios vem se adaptando a esta tendência, buscando oferecer ao consumidor alternativas alimentares aliando as características tradicionais dos produtos a novos métodos de conservação, substituindo os conservantes químicos por alternativas naturais (O'CONNOR et al., 2015).

A seleção de um micro-organismo para utilização em um alimento deve estar baseada na observação de três fatores principais: segurança, características funcionais e características tecnológicas. Quanto à segurança, aspectos como a origem, não patogenicidade e resistência aos antibióticos devem ser verificados (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

As bactérias lácticas produzem peptídeos antimicrobianos que normalmente apresentam atividade antibacteriana contra os agentes patogênicos de origem alimentar, bem como bactérias deteriorantes. Portanto, eles têm atraído a maior atenção como ferramentas para bioconservação de alimentos. Em alguns países o uso de bactérias lácticas é amplamente difundido, seja como probióticos ou no processamento de alimentos com o intuito de bioconservação (MESSAOUDI et al., 2013).

As características tecnológicas de interesse estão relacionadas à produção de substâncias aromáticas, manutenção da viabilidade das células no produto ao longo do processo de fabricação, manterem e melhorar as características físico-químicas e microbiológicas do produto, sem causar alterações indesejáveis, inibição de micro-organismos contaminantes, garantir a manutenção da segurança alimentar do produto ao decorrer de sua vida útil (BOYLSTON et al., 2004; CASTRO et al., 2015).

Os produtos lácteos apresentam uma microbiota natural responsável por desenvolver características sensoriais, conservar produtos e auxiliar na manutenção da saúde humana. As bactérias lácticas apresentam uma elevada capacidade de transformar substratos. E pesquisas têm sido conduzidas na busca de culturas adequadas para fabricação de um determinado produto, ou em função de propriedades específicas como a produção de bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006; BOURDICHON et al., 2012).

O queijo minas frescal ocupa o terceiro lugar no ranking de consumo de queijos no Brasil (MIRAGAIA, 2013). Devido a intensa manipulação apresenta uma alta carga microbiana, a população microbiana desses queijos geralmente é

considerada patogênica (JAY, 2005).

A aplicação de substâncias antimicrobianas para a conservação de alimentos vem sendo estudada por serem produzidas a partir de micro-organismos de interesse industrial, as bactérias lácticas são amplamente empregadas na produção de alimentos fermentados de origem láctea, o que viabiliza o estudo do emprego dessas substâncias visto que é de interesse da indústria desenvolver alternativas para a conservação de alimentos (PARADA et al., 2007).

O conhecimento e o uso desses fatores combinados em um alimento formam a teoria de obstáculos (LEISTNER, 1992), que permite o controle do prazo de validade, a estabilidade microbiológica, bem como a prevenção da multiplicação e/ou produção de toxinas por micro-organismos patogênicos eventualmente presentes (DE MARTINIS et al., 2002).

A qualidade dos produtos desenvolvidos vai depender do conhecimento sobre os micro-organismos empregados e das características tecnológicas apresentadas pelos mesmos, e o estudo das substâncias produzidas por esses micro-organismos e a maneira como se comportam durante as etapas de elaboração de produtos alimentícios, a sua origem e a identificação molecular para comprovação das suas características (DE MARTINIS et al., 2003; CAMARGO, 2011).

Os mecanismos de resistências de bactérias contaminantes principalmente sobre a ação de antibióticos tem se intensificado nos últimos anos, contribuindo para um aumento na ocorrência de DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos), e dificultando os processos de eliminação desses micro-organismos, as bacteriocinas podem ser utilizadas no combate da proliferação desses micro-organismos, visto que, são substâncias naturais de um determinado grupo de micro-organismos amplamente empregados no processamento de alimentos (PARADA et al., 2007).

Uma série de pesquisas no campo da ciência dos alimentos tem se concentrado em novas tecnologias de conservação e produção de alimentos funcionais, poucos destes métodos de conservação e produção têm sido implementadas pela indústria de alimentos até agora (DEVLIEGHERE et al., 2004; MESSAOUDI et al., 2013).

2. BACTÉRIAS LÁTICAS

Os micro-organismos caracterizados como bactérias lácticas, geralmente apresentam-se como Gram positivas, microaerófilas, catalase negativa e usualmente não apresentam motilidade. São muito exigentes, os meios elaborados para seu cultivo devem ser ricos em hidrolisados proteicos, carboidratos, vitaminas e nucleotídeos, o pH geralmente é acidificado, contribuem para a fermentação e degradação de açúcares presentes no leite, seu efeito antagonista impossibilita a procriação de outras bactérias Gram positivas (KLANDER, 1983). É um grupo de bactérias muito utilizado na indústria de alimentos, por ter como principal característica a fermentação da glicose a ácido láctico (LIU, 2008; RAIEK, IBRAHIM,

2013).

O metabolismo fermentativo desse grupo de bactérias é caracterizado pelo acúmulo de ácidos orgânicos (ácido lático, acético e propiônico) responsáveis pela acidificação e redução do pH do meio, de acordo com o produto final da fermentação de carboidratos, podem ser classificadas em homofermentativas (produto final ácido lático) e em heterofermentativas (produto final ácido lático, etanol e dióxido de carbono), as características do metabolismo fermentativo são importantes para a fabricação de alimentos, geralmente o micro-organismos deve ser adicionado a produtos similares aos quais foram isolados, para melhor adaptação da cultura (DE SOUZA MOTTA, 2015).

O sabor e o aroma dos produtos fermentados estão relacionados com as bactérias lácteas, pois conferem à textura e outras características desejáveis nesses produtos. Produz uma grande diversidade de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que estão envolvidas na transformação de nutrientes fundamentais em compostos desejáveis (DE SOUZA MOTTA, 2015).

O fato de serem inócuas consideradas como GRAS (geralmente reconhecido como seguro do inglês “Generally recognized as safe”), faz com que seu uso para fabricação de produtos alimentícios possa ser viabilizado. O grupo das BAL compõe-se de doze gêneros: Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Lastosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pedicoccus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus e Wessella (JAY, 2005).

A indústria de alimentos tem interesse em alguns gêneros de bactérias lácticas sendo esses:

- Gênero Lactococcus: tem função de cultura iniciadora, principalmente na fabricação de queijo por serem responsáveis pela transformação da lactose em ácido lático, suas enzimas também contribuem para maturação, estando envolvidos como a proteólise e conversão de aminoácidos em substâncias voláteis, como também são as principais responsáveis pelas características organolépticas do queijo (PERRY, 2004), são cocos gram positivos, homofermentativo, requerem meios de culturas elaborados, crescem a temperaturas de 10°C a 45°C.

- Gênero Leuconostoc: muito utilizado na produção de picles e vegetais fermentados (AQUARONE et. al. 2001), são células esféricas gram positivas, heterofermentativo, a fermentação é restrita a mono e dissacarídeos.

- Gênero Pediococcus: muito utilizado como inóculo na indústria de fermentados cárneos, por inibir um grande número de micro-organismos patogênicos contaminantes desses produtos (SCHIFFNER et. al, 1978); são células que ocorrem alternadamente em dois planos com seus ângulos formando tetraedros, a fermentação da glicose produz ácido lático ou DL (+) – Lactato.

- Gênero Streptococcus: são bactérias responsáveis juntamente com as do gênero Lactobacillus pela produção do iogurte promovendo a acidificação do leite (NICKERSON et. al. 1978). Os Streptococcus são células esféricas ou ovais, ocorrem em pares ou em cadeia, seu metabolismo fermentativo produz ácido lático, não produzindo gás.

Uma grande diversidade de pesquisas tem sido conduzidas para a utilização

de bactérias lácticas como culturas iniciadoras ou coadjuvantes na fabricação de produtos alimentícios (Tabela 1), com o intuito de padronizar os processos produtivos, melhorar a segurança e a qualidade dos produtos, preservando suas características típicas (DE PREZZI, 2014; SOUZA MOTTA, 2015;).

Tabela 1: Bactérias lácticas isoladas de diversos ambientes, sua aplicação e benefícios promovidos em produtos alimentícios

Culturas autoctones	Produto	Benefícios
Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, e Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	Bebidas Fermentadas	Produção de ácidos orgânicos e melhor crescimento celular
Lactobacillus e Staphylococcus	Salsicha	Acidificação e redução de microbiota indesejável
L. lactis subsp. lactis, L. plantarum e L. mesenteroides subsp. mesenteroides	Queijos	Melhoria dos atributos sensoriais do produto
Pediococcus acidilactici e Staphylococcus vitulus	Salsichão e chouriço	Reduz a proliferação de Enterobactereacea e patógenos
L. sakei e S. equorum	Embutidos fermentados	Efeito benéfico nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais
S. thermophilus, L. delbrueckii subsp. lactis e L. helveticus	Queijo Romano Pecorino	Melhora as características físico-químicas mantendo as características do queijo Romano Pecorino

FONTE: (DE SOUZA MOTTA, 2015)

3. O GÊNERO LACTOBACILLUS

Bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam morfologia de bacilos, Gram positivos, microaerófilos, catalase negativa e não apresentam motilidade (GOLDBERG, 1994). Sua utilização em processos fermentativos agroalimentares é devida ao fato de serem inócuas consideradas como GRAS, relacionados com a produção de alimentos de alta e média acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação de leites fermentados, iogurtes e queijos.

Os *Lactobacillus* são empregados na fabricação de produtos lácteos com a função de melhorar a segurança do produto controlando agentes patogênicos pela competição entre eles; aumentar a vida útil do produto através da inibição de microorganismos deteriorantes; melhorar as propriedades sensoriais e promover benefícios à saúde (ALVES, 2011).

Os fatores intrínsecos e extrínsecos relacionado ao crescimento de *Lactobacillus* são bastante amplos, apresentando capacidade de crescer em

diferentes temperaturas e valores de pH, toleram O₂ e diferentes concentrações de NaCl e NO₂⁻, estas características fisiológicas são ideais para que seu uso não seja limitado as condições de processamento (DE MARTINS, 2003).

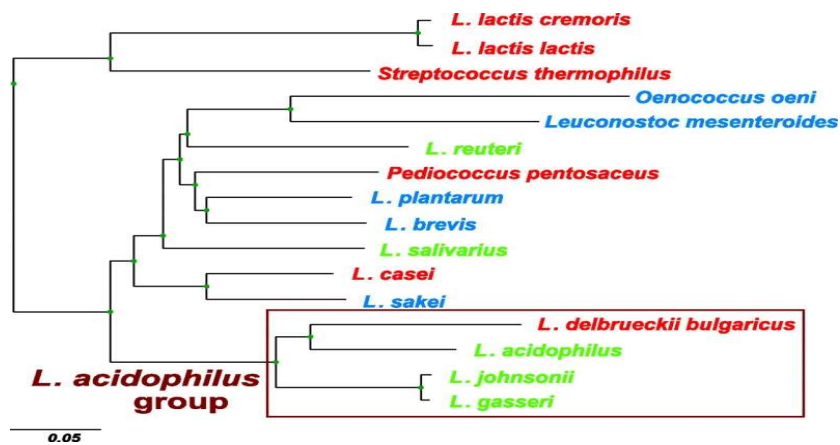
À rápida acidificação produzida na matéria prima e a produção de substâncias antimicrobianas destacando-se os ácidos orgânicos (C₃H₆O₃ e CH₃COOH), H₂O₂ e bacteriocinas, pode interferir no desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis nos alimentos, através da competição por oxigênio, competição por sítios de ligação. A vida de prateleira dos alimentos pode ser controlada pelos fatores intrínsecos (pH, sal, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período de armazenamento, atmosfera da embalagem), e a utilização desses fatores combinados pode prolongar a vida de prateleira, a estabilidade microbiológica e impedir a produção de toxinas por micro-organismos patogênicos (DE MARTINS, 2003).

A necessidade de controlar bactérias patogênicas, devido à sua capacidade de sobreviver em condições de baixo pH, é um grave problema na produção de fermentados, nos últimos anos as pesquisas para a seleção de culturas com a capacidade de produzir bacteriocinas antagônicas às bactérias patogênicas tem se intensificado com o intuito de manutenção da segurança alimentar (JACOME et al., 2013).

4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LACTOBACILLUS SP

Genomas de Bactérias lácticas estão sendo sequenciados e as comparações entre a organização genética e o conteúdo informacional são importantes para a identificação entre os diversos membros desse grupo. Devido a grande importância relacionada à segurança alimentar os micro-organismos empregados em formulações de produtos alimentícios (Figura 1) devem ser identificadas para possibilitar a previsão do seu comportamento, durante o processo tecnológico (YEUNG et al., 2002).

Dendograma 1: Árvore filogenética de Bactérias Lácticas representando as várias origens ou usos de BAL: vermelho para a fermentação de laticínios, azul para outra fermentação, tais como cerveja, vinho, plantas, ou carne, e verde para as bactérias do trato gastrointestinal.



Fonte: LIU et al. (2008)

A identificação do genoma de bactérias lácticas é uma oportunidade para estudo genômico e elucidação das rotas metabólicas de produção de compostos de sabor e aroma, bem como a produção de enzimas envolvidas nos processos de degradação de proteínas e lipídios (LIU et al., 2008).

O sequenciamento da porção genômica do rDNA 16S permite a identificação de diferentes espécies de bactérias lácticas, por ser uma região conservada e comum a diversas espécies (BARATTO et al., 2012).

O estudo molecular de bactérias lácticas no Brasil ainda é incipiente. A diversidade desse grupo de bactérias faz com que diferentes grupos de pesquisa desenvolvam estudos nos mais variados aspectos. Existem vários métodos de tipagem genética de micro-organismos, entretanto estes devem permitir a diferenciação clara entre isolados, e principalmente, deve ter uma elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos moleculares de caracterização são igualmente eficazes, diferindo normalmente na capacidade discriminatória entre os níveis taxonômicos. Como tal, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida, seja: identificação ou diferenciação, ou outros aspectos como reprodutibilidade, poder discriminatório, custos envolvidos, etc. (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; CANHOS et al., 1999; AMANN et al., 1995).

Uma das principais dificuldades em classificar as bactérias por métodos fenotípicos é a capacidade de elas apresentarem diferentes características em diversas condições. Uma forma mais concreta para se identificar as bactérias é a abordagem polifásica que consiste em testes bioquímicos e morfológicos apoiados em métodos de análises moleculares (PRAKASH et al., 2007).

Entre as técnicas baseadas na análise de DNA as modificadas a partir da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR- Polymerase Chain Reaction) têm demonstrado boa aplicabilidade para as bactérias lácticas (CUSICK; O'SULLIVAN, 2000; DRAKE et al., 1996; TENOVER et al., 1995), e estão cada vez mais tornando-se simples e utilizadas na maioria dos estudos sobre identificação de micro-organismos de difícil classificação taxonômica, a partir de perfis obtidos por

eletroforese (FARBER, 1996).

O uso de técnicas moleculares vem desde alguns anos atrás demonstrando que podem auxiliar na identificação de micro-organismos. Segundo Lee et al. (2008) a amplificação do gene 16S do RNAr seguido do seu sequenciamento tem demonstrado boas vantagens, pois com esse método é possível realizar uma análise filogenética bem detalhada das cepas em questão.

A amplificação da região 16S RNAr permite fazer análises filogenéticas e identificações de espécies mais confiáveis por ter essa região do gene bem conservada e com domínios variados. É possível realizar um alinhamento entre as sequências analisadas, e assim comparar os pares de bases que uma contém e a outra não, dando características diferenciadas entre as espécies (COCOLIN; RANTSIOU, 2007). Pelos genes desta região serem muito conservados e estarem presentes em maior quantidade nas espécies pode-se ter uma maior certeza e precisão quanto a sua caracterização.

Muitas análises moleculares permitem ainda diferenciar isolados da mesma espécie, usando primers específicos para cada análise de PCR. A amplificação do gene 16S permite observar a diversidade entre grupos de bactérias investigadas mesmo quando a presença desses organismos é em pequenas quantidades no ecossistema. Estas técnicas possuem importância por possibilitarem uma caracterização dos isolados mais rápida e de maior segurança (COCOLIN; RANTSIOU, 2007).

Existem várias técnicas moleculares que podem ser utilizadas para a caracterização de *Lactobacillus* sp., esses métodos devem permitir a diferenciação das espécies assim como a investigação da presença de proteínas ou genes de importância tecnológica.

O método ARDRA é uma ferramenta comumente empregada para estudar a diversidade microbiana, que se baseia no polimorfismo do DNA. Assim, clones contendo fragmentos do gene 16S rDNA, obtidos através do uso de iniciadores universais ou específicos, são amplificados por PCR e clivados por endonuclease de restrição. A seguir os fragmentos são separados em gel de agarose de alta densidade ou gel de acrilamida. Os perfis resultantes são utilizados para classificar a comunidade em grupos genotípicos específicos ou para a tipagem de linhagens (SKLARZ, 2009).

Esta análise consiste na otimização da reação de amplificação para obtenção de bandas únicas (amplicon único) do gene rRNA 16S (JENSEN et al., 1993), e após clivagem com enzimas de restrição.

Ela também tem como princípio do primer se ligar a fitas opostas de DNA alvo e ocorrer a amplificação desse segmento entre os dois primers adjacentes junto com a enzima Taq polimerase. Os sítios de ligação dos primers devem ter certo limite de pares de bases, pois eles não são capazes de percorrer segmentos maiores durante a amplificação (WU et al., 2006).

5. METABOLISMO FERMENTATIVO DOS LACTOBACILLUS SP

Um dos principais fatores que contribui para a utilização de *Lactobacillus* na fabricação de produtos lácteos fermentados é a produção do ácido lático, e de acordo com o produto final do metabolismo da glicose, os *Lactobacillus* estão agrupados em:

- **Homofermentativo:** fermenta a glicose pela via glicolítica de Embden-Meyerhof, possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, com deficiência da enzima fosfocetolase

De acordo como Bergey's Determinative Bacteriology, Holt et al. (1996) os *Lactobacillus* homofermentativos, produzem 85% de ácido lático a partir da glicose, a presença da enzima aldolase inibe à formação de gás durante a fermentação, a fermentação direta da glicose a ácido lático, converte 1 mol/L⁻¹ de glicose em 2 mol/L⁻¹ de ácido lático.

- **Heterofermentativo:** fermenta a glicose pela via alternativa da pentose ou hexose monofosfato, produzem a enzima fosfocetolase, porém não produzem as enzimas aldolase e hexose isomerase produzindo além do ácido lático, o dióxido de carbono, o ácido acético e ou etanol.

Os *Lactobacillus* com metabolismo heterofermentativo produzem 1 mol/mol/L⁻¹ de ácido lático; 1 mol/L⁻¹ de dióxido de carbono e 1 mol/L⁻¹ de etanol ou ácido acético a partir da glicose.

Tendo enfoque na produção de componentes de aroma e sabor o diacetil é desejável no processo de fabricação de iogurtes e alguns tipos de queijo, empregando os *Lactobacillus* heterofermentativos, já os *Lactobacillus* homofermentativos são empregados principalmente na fabricação de queijos.

6. BACTERIOCINAS

Os *Lactobacillus* são amplamente utilizados para a fermentação e preservação de produtos lácteos. Produzem compostos antimicrobianos, sendo essenciais para a garantia da inocuidade e extensão de vida de prateleira.

A grande maioria dessas bactérias produz uma variedade de fatores antagônicos durante o processo fermentativo, tais como substâncias antibióticas, proteínas bactericidas e produtos finais do metabolismo, como o ácido lático (DEEGAN et al., 2006, BOURDICHON et al., 2012).

As bacteriocinas são proteínas bacterianas com propriedades bacteriostáticas sobre diversas espécies de micro-organismos. Algumas delas do grupo das bactérias lácticas tem sido identificadas e caracterizadas e podem ser divididas em bacteriocinas com espectro inibitório limitado, afetando apenas espécies geneticamente próximas e as com espectro inibitório amplo, podendo afetar diversas espécies de micro-organismos Gram positivos.

São classificadas em lantibióticas e não lantibióticas, de acordo com suas características estruturais. As lantibióticas contém aminoácidos incomuns, tais como

deidroalanina, deidrobutirina e anéis de lantionina e as não lantibióticas contém apenas aminoácidos não modificados.

A ação das bacteriocinas depende da ligação a receptores da superfície celular bacteriana, com permeabilização da membrana citoplasmática e formação de canais iônicos que causam o efluxo rápido de componentes celulares de baixo peso molecular. A produção de bacteriocinas é em geral feita por plasmídios, assim como é plasmidial a resistência de bacteriocinas (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Estão distribuídas em 4 classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas:

- Classe I (lantibióticos): é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (19 a 38 resíduos de aminoácidos) que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina (COTTER; HILL; ROSS, 2005). A principal representante desta classe é a nisina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

- Classe II: é composta por peptídeos de baixo peso molecular (< 10 kDa) termoestáveis. Possuem um espectro de inibição limitado. Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e morte celular (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As bacteriocinas pertencentes a esta classe encontram-se subdivididas em:

- ✓ Classe II a: é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *L. monocytogenes*. Seus representantes possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos. Esta classe também é conhecida por família das pediocinas, devido a pediocina ser a predecessora das bacteriocinas dessa classe (AYMERICH; HUGAS; MONFORT, 1998).

- ✓ Classe II b: é constituída por bacteriocinas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos, com um mecanismo de ação que envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade bacteriocinogênica muito baixa se forem empregados individualmente (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

- ✓ Classe II c: as bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica. São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina 6 (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

- Classe III: esta classe é composta por grandes proteínas (> 30 kDa) que são sensíveis ao tratamento térmico (60-100 °C por 15 minutos) e complexas quanto à atividade e à estrutura proteica. O mecanismo de ação destas bacteriocinas se diferencia das demais classes por promover a lise celular através da lise da parede celular do micro-organismo alvo (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

- Classe IV: encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Contudo, Cleveland et al. (2001) acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas.

As bacteriocinas mais estudadas são a nisina, a pediocina, e a sakacina

produzidas por *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus sakei*, o estudo da aplicação de culturas produtoras de bacteriocinas com o intuito de realizar a bioconservação tem sido realizada principalmente em produtos lácteos e carnes fermentados.

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis. lactis*, e a única cujo uso em alimentos é autorizado pela “United States Food and Drug Administration”(FDA). É utilizada na preservação de alimentos em vários países (FRANCO, LANDGRAF, 2005).

7. EMPREGO DE LACTOBACILLUS SP. NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS

A bioconservação de alimentos, através da adição de micro-organismos ou de substâncias naturais, é uma alternativa interessante para aumentar a vida de prateleira, garantir a segurança microbiológica, reduzir o uso de aditivos sintéticos, mantendo as características sensoriais e nutricionais de produtos perecíveis. Esta tecnologia de conservação alimentar é amplamente utilizada nos EUA, onde conta com a aprovação da FDA, porém esta tecnologia de conservação não está regulamentada na legislação europeia. A legislação Brasileira prevê o uso de substâncias com ação antimicrobiana na conservação de alguns alimentos de origem animal como fermentados lácteos, entretanto não possui legislação específica para o uso desse tipo de tecnologia (CARVALHO, 2016).

As principais vantagens referentes aos usos desta tecnologia relacionam-se com a menor limitação em relação aos conservantes químicos uma vez que esses micro-organismos ou substâncias naturais já estão naturalmente presentes nos produtos fermentados; não são conhecidas resistências e o impacto ambiental é mínimo já que são rapidamente eliminadas pela cadeia alimentar; possuem um espectro de ação muito definido; a sua atividade é potencializada pelo pH e apresentam um efeito sinérgico com outros agentes metabólicos antimicrobianos; sua utilização é compatível com a rotulagem de produto biológico já que a conservação é obtida sem conservantes químicos nem de síntese (FREIRE, 2010).

O processo de bioconservação pode apresentar como desvantagens a possível alteração das características sensoriais dos produtos alimentícios, pode apresentar custos elevados para produção e desenvolvimento de produtos, micro-organismos e substâncias com atividade antimicrobiana (FREIRE, 2010).

A aplicação de *Lactobacillus sp.* ou de suas substâncias antimicrobianas em um produto com função de bioconservação pode ocorrer com a utilização de técnicas “in situ” o micro-organismo desenvolve-se naturalmente no alimento, os *Lactobacillus sp.* produtores de substâncias antimicrobianas estarão sujeitos as condições de processamento do alimento tendo de competir com a microflora natural do alimento sem causar alterações físico-químicas e sensoriais no alimento, também podem competir com micro-organismos patogênicos protegendo o alimento em casos de abuso de temperatura (SAEED, SALAM, 2013).

Na utilização de técnicas “ex situ” o crescimento microbiano é controlado e

incorporado ao alimento as substâncias antimicrobianas produzidas, as bacteriocinas podem ser adicionadas na forma de concentrados obtidos do crescimento de *Lactobacillus* sp. ou as substâncias podem ser purificadas e adicionadas aos alimentos sendo possível controlar a dose a ser aplicada obtendo resultados mais confiáveis (PEREZ et al., 2014).

Os *Lactobacillus* sp. são empregados na fabricação de produtos de origem láctea, cárnea e vegetal, sendo os principais produtos fermentados obtidos por seu uso os produtos de origem láctea como leites fermentados, bebidas lácteas e queijos, sua aplicação nesses produtos deve-se a sua ocorrência natural na microbiota do leite e de produtos lácteos, a manutenção das características físico-químicas e microbiológicas durante a vida útil do produto (RESENDE et al., 2011), e o desenvolvimento das características sensoriais do produto durante os processos de fermentação e maturação (LIU et al., 2008; RAIEK; IBRAHIM, 2013).

O conhecimento do metabolismo dos *Lactobacillus* sp. para sua utilização como cultura bio-protetora é fundamental, visto que estará sujeito as condições de processamento que podem interferir no crescimento e produção de substâncias com efeito antagônico, os micro-organismos devem ser isolados e caracterizados quanto ao crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de NaCl, determinar a concentração mínima inibitória das substâncias produzidas contra patógenos para garantia do efeito inibitório desejado (JACOME et al., 2013).

O uso de bactérias lácticas como cultura iniciadora em produtos fermentados está relacionado a seu metabolismo primário que contribui para a rápida acidificação do produto e conservação durante o tempo de armazenamento (RAIEK, IBRAHIM, 2013), o metabolismo de proteínas e lipídios contribui para a evolução dos componentes de sabor e aroma de diversos fermentados lácteos, principalmente no queijo estão diretamente envolvidas no desenvolvimento do “flavor” no decorrer do processo fermentativo e de maturação (LIU et al., 2008).

Durante o processo fermentativo os micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras sofre autólise e nesse processo liberam para o meio extracelular componentes citoplasmáticos, esse processo parece exercer efeitos benéficos na modificação e manutenção dos atributos sensoriais e físico-químicos do produto, principalmente devido a atividade proteolítica exercida no produto (DE SOUZA, 2006).

A microbiota dos queijos contém naturalmente bactérias do gênero *Lactobacillus*, e sua aplicação industrial é de grande importância para a manutenção das características desejáveis do produto e da evolução dos atributos sensoriais durante o processo de maturação, onde esses micro-organismos são responsáveis pela conversão nutrientes fundamentais em componentes do aroma e sabor do produto (HERMMANS, 2013).

Para o desenvolvimento das características dos queijos, o metabolismo proteolítico dos *Lactobacillus* é de fundamental importância, durante o crescimento esses micro-organismos degradam a caseína presente no queijo formando peptídeos e aminoácidos livres que são os principais precursores dos compostos de sabor do queijo (DE SOUZA MOTTA, 2015).

8. CONCLUSÃO

O uso de tecnologia de bactérias lácticas para a fabricação de alimentos fermentados, hoje apresenta novas possibilidades principalmente no que diz respeito a bioconservação, seja por sua aplicação direta em alimentos ou o uso de seus produtos metabólicos.

Ajustes a legislação de alimentos devem promover o uso de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas acompanhando o desenvolvimento de pesquisas científicas no âmbito da produção dessas moléculas e sua aplicação como conservante na fabricação de produtos fermentados.

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* apresentam potencial para uso na fabricação de produtos alimentícios pois adaptam facilmente as características intrínsecas desses produtos desenvolvendo um ambiente indesejável para a reprodução de micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

Além dos aspectos de segurança alimentar os *Lactobacillus* sp. apresentam produção de substâncias que promovem a melhoria dos aspectos sensoriais dos produtos.

Novas pesquisas devem ser realizadas para o conhecimento do genoma, do comportamento desse grupo de bactérias na fabricação de alimentos e dos potenciais usos de suas substâncias para melhoria tecnológica dos processos de fabricação de alimentos.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. C. et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.

AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, 59: 143-169, 1995.

BARATTO, C. M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Lactobacillus curvatus* isolated from handmade Brazilian salami. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11721-11723, 2012.

BIELECKA, M.; et al.. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BOYLSTON, T. D. et al.. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, v.14, n.5, p.375-87, 2004.

CAMARGO, R.J.. **Ação de Bacteriocinas de Bactérias Láticas no Controle de *Listeria monocytogenes* e no Aumento da Vida de Prateleira de Mortadela Fatiada.** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

CANHOS, V. P., MANFIO, G. P., VAZOLLER, R. F., PELLIZARI, V. H. Diversidade do Domínio Bacteria. In: Carlos Alfredo Joly; Carlos Eduardo de Mattos Bicudo. (Org.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1 ed. São Paulo: **FAPESP**, 1999, v. 1, p. 1-14.

CARVALHO, A.S. et al.. Relevant Factors for the Preparation of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. **International Dairy Journal**. v. 14, n° 10, p. 835-847, October, 2004.

CASTRO, J. M., M.. “Biocheese: A Food Probiotic Carrier,” **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 723056, 11 pages, 2015.
doi:10.1155/2015/723056

COCOLIN, L., RANTSIOU, K. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.76 (6): 1403-11, 2007.

DEEGAN, L.H., et.al.. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058–1071, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P., et al.. Bioconservação de Alimentos. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**. v. 29, n.1: 114-119, 2003.

DE MARTINIS E.C.P., et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Braz J Microbiol**, 32(1), 32-37, 2001.

DE SOUZA, C H B.. Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

DE SOUZA MOTTA, Amanda; GOMES, Melina Da Silva Mesquita. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias láticas: a importância destes micro-organismos para alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.

DEVLIEGHERE, F.; et al.. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p, 273-285, apr., 2004.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141864>
Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 13/05/2011.

DRAKE, M., SMALL, C. L., SPENCE, K. D., SWANTSON, B. G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v.59 (10) : 1031-1036, 1996.

ELKINS, C. A.; MULLIS, L. B.. Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7200-7209, 2004.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, v.59, p.1091-1101, 1996.

FRANCO, B. D. G de M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap.4, p. 48-60.

GOLDBERG, I. (Ed). Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Functional Foods, New York : Chapman & Hall Inc., cap. 9,14 e 20, 1994.

HERMANN, Gislaine. Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite e queijos artesanais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

HOLT, J. G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual determinative bacteriology**. 9. ed.: Willians & Wilkins, Baltimore, 787p,1994.

JENSEN, M. A.; et al.. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-952. Abr, 1993.

KLANDER, O., Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Ant van Leuw.*, v.49,p.209-224, 1983.

LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, n. 2, p. 151-158, 1992.

LIU, M. et al. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4590-4600, 2008.

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; MÄTTÖ, Jaana; SAARELA, Maria. Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T.; et al.. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MESSAOUDI, S.; et al.. Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 296-304, dec, 2013.

PARADA, J.L.; et.al. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 32: 521-542, Maio 2007.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. **Indian J. Microbiol.**47:98-108, 2007.

PREZZI, LÍgia Eleonor. **Efeito da adição de Lactobacillus rhamnosus em queijos Minas frescal sobre as contagens de Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014

SAMBROOK, J.; RUSSEL. D. W. Molecular cloning: a Laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SCHIFFNER, E.. HAGEDORN, W.. OPPEL, K.. **Cultivos Bacterianos en las Industrias Carnicas**. p. 3-66. Zaragoza: Acribia, 1978.

SKLARZ, M. Y.; et al.. Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities Antonie van Leeuwenhoek, 2009.

TENOVER, F., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B. Interpretinf chromosomal DNA Restriction Patterns Ptroduced by Pulsed-field Gel electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, 33(9): 2233-2239, 1995.

WU, X. Y.; et al. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of Bacillus species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, n. 1, p. 107-119. Jan, 2006.

YEUNG, O.S.; et.al. Species-specific identification of commercial probiotic strains. **Journal of Dairy Science**. v. 85, n. 5, p. 1039-1051. May, 2002.

ABSTRACT: The growing concern about improving quality of life, preventing diseases, reducing the use of preservatives, improving the sensorial quality of traditional products, has stimulated the development of research related to the molecular and technological characterization of microorganisms producing substances with potential For application as a bioconservative, lactic acid bacteria have a great potential for extending shelf life of products, their metabolism produces numerous compounds capable of inhibiting the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms. The fermentative metabolism of this group of bacteria is characterized by the accumulation of organic acids responsible for the acidification and reduction of the pH of the medium, according to the final product of the fermentation of carbohydrates, can be classified into homofermentative and heterofermentative, the characteristics of the fermentative metabolism are Important for the manufacture of food, generally the micro-organisms should be added to similar products to which they have been isolated, for better adaptation of the culture. Its main use is in obtaining fermented products obtained by its use products of milk origin such as fermented milks, dairy drinks and cheeses, its application in these products is due to its natural occurrence in the microbiota of milk and dairy products, maintenance of the characteristics Physical-chemical and microbiological characteristics during the life of the product, and the development of sensorial characteristics of the product during fermentation and maturation processes. The technological use of lactic acid bacteria for the manufacture of fermented foods presents new possibilities, especially regarding the bioconservation, either by its direct application in foods or the use of its metabolic products.

KEYWORDS: Fermentative Metabolism, Bacteriocins, Bioconservation, antimicrobial substances, Lactobacillus sp..

CAPÍTULO VIII

ESTABILIDADE DO COMPOSTO ANTIMICROBIANO DE Pleurotus sajor-caju FRENTE A CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

**Camila Ramão Contessa
Nathiéli Bastos de Souza
Guilherme Battú Gonçalo
Luciano Almeida
Ana Paula Manera
Caroline Costa Moraes**

ESTABILIDADE DO COMPOSTO ANTIMICROBIANO DE *Pleurotus sajor-caju* FRENTE A CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Camila Ramão Contessa

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

Nathiéli Bastos de Souza

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

Guilherme Battú Gonçalo

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

Luciano Almeida

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

Ana Paula Manera

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

Caroline Costa Moraes

Universidade Federal do Pampa

Bagé – RS

RESUMO: Os basidiomycotas tem por seu representante fungos macroscópicos, os cogumelos, que além das suas características nutricionais e terapêuticas, destacam-se pela produção de agentes antimicrobianos, como é o exemplo do *Pleurotus sajor-caju*, cogumelo comestível de origem asiática que possui alto valor nutricional e propriedade antimicrobiana. Neste trabalho, o extrato de *Pleurotus sajor-caju* foi extraído e avaliado quanto à estabilidade do composto antimicrobiano quando submetido a congelamento, frente a micro-organismo gram-negativo (*Escherichia coli*) e gram-positivo (*Staphylococcus aureus*). A extração do composto foi feita a partir do micélio de *Pleurotus sajor-caju* cultivado por fermentação em estado sólido, submetido a congelamentos e descongelamentos sucessivos e periódicos, A atividade antimicrobiana foi analisada pelo método de microplacas descrito na norma NCCLS (2003). Através dos resultados obtidos pode-se observar que ambos os compostos aumentaram sua efetividade após os congelamentos, pois a técnica permite a perda da atividade biológica de alguns compostos da amostra, permitindo assim a concentração do composto de interesse, resultando em um aumento de 96% de inibição contra o *Staphylococcus aureus* e 62% sob *Escherichia coli* no segundo congelamento. Conclui-se que o composto diferiu quanto a porcentagem de inibição ao micro-organismos utilizados, sendo mais eficaz ao gram-positivo, onde que para este o extrato manteve-se com estabilidade até o terceiro congelamento.

PALAVRAS-CHAVE: cogumelo ostra; compostos bioativos; purificação.

1. INTRODUÇÃO

A presença de fungos é de suma importância na área alimentícia, sendo essenciais na elaboração de alimentos, assim como enzimas produzidas por estes, onde que são empregados principalmente na elaboração de bebidas alcoólicas como cervejas e vinhos, panificação e produção de queijos, onde muitos têm valor agregado em decorrência da presença destes (ORLANDELLI, et al., 2012).

Dentre os diversos organismos pertencentes ao reino fungi, tem-se os cogumelos, descritos com aproximadamente 45 mil espécies, e destas 2.000 são classificadas como sendo comestíveis, sendo apenas 25 comercializadas. Estes fungos são conhecidos e utilizados na alimentação desde a pré-história onde civilizações gregas, egípcias, romanas, chinesas e mexicanas os utilizavam em refeições especiais e rituais religiosos (MOURA, 2008). Sabe-se atualmente do seu alto valor nutricional, sendo uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos, fibras, possuindo pouca gordura trans, saturada e colesterol, com isso a inserção deste alimento na dieta da população torna-se cada vez mais frequente (DIAS, et al., 2003).

Cogumelos são seres heterotróficos, com isso têm a necessidade da absorção de compostos orgânicos para obtenção de energia, manutenção e desenvolvimento (MARINO, et al., 2008). Sua capacidade de reprodução e desenvolvimento está associada as condições de cultivo, como meio de cultura, acidez, temperatura e outras variáveis consideráveis (AKINYELE & ADETUYI, 2005). Para que seu desenvolvimento seja eficiente, tem-se a necessidade de oferecer as condições adequadas de desenvolvimento, visando a simulação do meio ambiente, quando cultivado em laboratório, por exemplo, pois os valores nutricionais assim como os medicinais dependem das condições de cultivo (CURVETTO, 2002).

Além de ser nutritivo e possuir sabor agradável os cogumelos são caracterizados quanto as suas propriedades farmacológicas (MIYAJI & CÓLUS, 2001), capacidade terapêutica (BERNARDI et al., 2010), antioxidante (OYETAYO, 2009), e antimicrobiana (KITZBERGER, 2005), sendo que algumas espécies são fisiologicamente benéficas com efeito inibidor de alguns tipos de tumores, assim como capacidade bactericida contra alguns micro-organismos causadores de doenças (MIZUNO & ZHUANG, 1995). Antimicrobianos naturais assim como os sintéticos, agem inibindo ou destruindo o desenvolvimento de microrganismos indesejados, e estes quando purificados permitem a obtenção de compostos isolados, visando maior eficácia antimicrobiana (TEIXEIRA, 2007).

Neste sentido, este trabalho visou extrair e analisar o extrato de *Pleurotus sajor-caju* quanto à estabilidade do composto antimicrobiano quando submetido a congelamento, frente a micro-organismo gram-negativo (*Escherichia coli*) e gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) comumente encontrados na indústria de alimentos, contudo justifica-se a aplicação deste composto em embalagens de produtos destinados a este fim.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Cogumelos

A produção e consumo de cogumelos no Brasil começou no estado de São Paulo, com produção restrita a pequenas propriedades, sendo hoje sul e sudeste as principais regiões produtoras, esse cultivo ainda é baixo quando comparado a outros países, porém atualmente encontra-se em ampla expansão (SILVA, 2011). Dentre as principais vantagens na produção de cogumelos tem-se a utilização de resíduos agroindústrias no seu cultivo, enriquecimento da dieta populacional pela excelente fonte nutricional, e a fonte de renda para produtores (MAIO, 2003).

Cogumelos são pertencentes ao filo Basidiomycota, sendo a sua principal característica a presença de basídios, que são estruturas de reprodução sexuada, dando suporte aos basidiósporos. Em sua maioria são miceliais, onde são formados por filamentos conhecidos como hifas onde apresentam-se de forma contínua ou com ramificações, podendo ser septadas ou asseptadas, o conjunto dessas hifas forma uma massa que é denominada micélio, podendo também apresentar-se na estrutura leveduriforme, que são células únicas delimitadas de tamanho pequeno, onde suas colônias são semelhantes as das bactérias, apresentam aspecto pastoso e coloração variada (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Cogumelos comestíveis de maneira geral são considerados uma excelente fonte de proteínas digeríveis, com valores superiores aos encontrados nos vegetais e um pouco abaixo dos encontrados em produtos de origem animal, onde que o teor de proteínas assim como os demais nutrientes varia de espécie para espécie assim como as condições de cultivo (RINCÃO, 2008).

2.2. *Pleurotus sajor-caju*

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem Agaricales e à família Agaricaceae, *Pleurotus sajor-caju* é um cogumelo comestível de origem asiática (DIAS et al., 2003), geralmente comercializado “in natura” ou industrializado em pedaços, como por exemplo, em ingrediente de sopas, sendo raramente utilizado em conservas por possuir tamanho e geometria inconveniente aos padrões de estética usualmente utilizados nestes produtos (MODA, 2003). Possui sabor suave é rico em aminoácidos e proteínas (DIAS et al., 2003).

É recomendado para iniciantes no hábito de consumir cogumelos, por apresentar sabor suave, saboroso e extremamente saudável, (DIAS et al., 2003). Além disso, são cogumelos de fácil produção, utiliza-se de resíduos agrícolas como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz, umedecidos e pasteurizados (FELINTO, 1999).

Apresenta propriedade terapêutica e antimicrobiana, sendo que alguns polissacarídeos extraídos do cogumelo fresco apresentam propriedade antitumoral contra o sarcoma 180 em camundongos, demonstrando sua aplicação na área

farmacêutica (MIZUNO & ZHUANG, 1995). Segundo Carbonero et al. (2003) as β -glucanas, polissacarídeos presentes no cogumelo, tem a capacidade de atuar como imunomoduladores e antimutagênicos nos sistemas biológicos.

2.3. Antimicrobianos e Purificação destes compostos

A ação antimicrobiana de micro-organismos é conhecida a muito tempo, há centenas de anos médicos chineses utilizavam de fungos para o tratamento de feridas infecciosas, porém estas substâncias receberam destaque em 1929, quando descobriu-se o que se conhece hoje como penicilina, o fato deu-se a partir de ensaios laboratoriais com o intuito de cultivar bactérias, porém os ensaios foram contaminados com um fungo do gênero *Penicillium*, em observação Alexander Fleming observou que ao redor do fungo as bactérias cultivadas sofriam lise celular. O cientista então isolou o fungo e verificou que o mesmo secretava substância antimicrobiana, a qual hoje é purificada e comercializada (CARVALHO, 2007).

Atualmente tem-se uma forte tendência na exploração de compostos obtidos de fungos, como enzimas, proteínas e polissacarídeos, pois são substâncias que apresentam propriedades tecnológicas (ALEXANDRE et al., 2010). Estas substâncias muitas vezes são submetidas a técnicas de purificação que tem por finalidade a concentração do composto de interesse. A etapa de purificação é baseada nas diferentes propriedades das moléculas como a solubilidade, afinidade com água, tamanho molecular, afinidade, dentre outras (ALBANI, 2008).

O método de purificação por congelamento, é baseado através da perda da atividade biológica de alguns constituintes do meio, pois com a diminuição da temperatura durante o processo de congelamento há a desestabilização de algumas estruturas, fazendo assim com que as mesmas tenham uma perda da sua atividade, sendo assim é uma técnica muito eficiente quando se tem contaminantes sensíveis a baixa temperatura (MARINELLO, 2009).

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção do extrato de *Pleurotus sajor-caju*

Utilizou-se o micélio do fungo, o qual foi cultivado em placa de Petri contendo Ágar Batata Dextrose, a temperatura de 25 °C em estufa. O extrato foi obtido a partir do micélio jovem com desenvolvimento radial desenvolvido, onde foi adquirido por raspagem mecânica com auxílio de alça de platina e solvente, foi então submetido a agitação de 100 rpm em agitador orbital a uma temperatura de 60 °C por 1 h, passado o tempo de extração, realizou-se o processo de filtração com membrana de 0,45 μ m. Todo o processo foi realizado com esterilidade dos meios e matérias, assim como ambiente de manipulação.

3.2. Purificação por congelamento

Uma quantidade de 25 ml do extrato foi acondicionada em recipiente inerte e submetido a congelamento lento a temperatura de -14°C por 24 h, passado este tempo o mesmo foi descongelado a 4°C e submetido a análise antimicrobiana. O volume restante foi submetido a novo congelamento sob as mesmas condições, sendo realizada uma nova análise antimicrobiana após 24 h de congelamento a partir do primeiro teste, e assim sucessivamente até que se verificasse ação antimicrobiana do extrato sob a microbiota utilizada.

3.3. Análise antimicrobiana

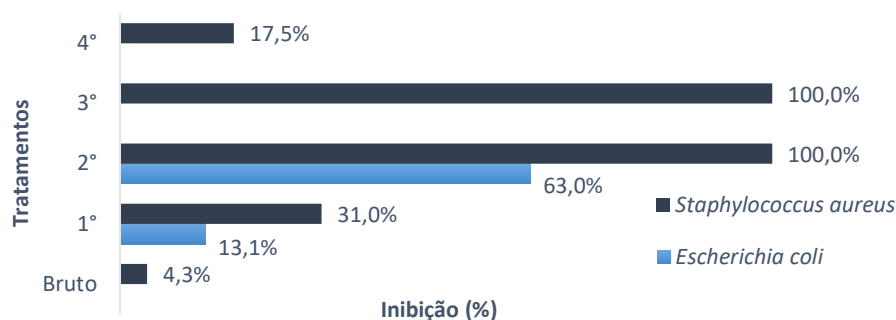
As análises antimicrobianas foram realizadas pelo método de microplacas descrito na NCCLS (2003), onde que a microplaca utilizada contém 96 poços, e cada poço uma capacidade de 400 μL , nestes foram adicionados 145 μL de caldo Mueller Hinton, caldo adequado para o desenvolvimento da microbiota contaminante, 135 μL do extrato antes da purificação e após a purificação, (analisados separadamente) e 20 μL da cultura contaminante, onde utilizou-se como representante gram-negativo *Escherichia coli* ATCC® (11229) e *Staphylococcus aureus* ATCC® (12598) como representante gram-positivo. Baseando-se no fato que o desenvolvimento microbiano ocasiona a turvação do meio fez-se leitura de absorbância após a inoculação e passados 16h, com a utilização de leitora de Elisa, em um comprimento e onda de 630nm.

Para avaliação dos resultados foi considerada a diferença da leitura inicial com a realizada após 16h, da amostra controle e das que continham o extrato (bruto e purificado), onde que os poços com menor variação de leitura indicaram possível ação antimicrobiana do extrato sob os micro-organismos, a diferença destes chamou-se de porcentagem de inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através do Resultados encontrados é possível constatar de que o processo de purificação por congelamento lento foi eficiente ao extrato obtido de *Pleurotus sajor-caju*, onde o mesmo proporcionou uma maior concentração do composto de interesse, fato que pode ser observado na Figura 1.

Figura 1: Porcentagem de inibição do antimicrobiano obtido do extrato de *Pleurotus sajor-caju*, sob a microbiota testada.



Fonte: Os Autores, 2017

Pode-se observar que no eixo horizontal representado pela porcentagem de inibição, no segundo congelamento obteve-se o máximo de inibição contra os dois micro-organismos, porém o extrato testado contra a *E.coli* perdeu sua atividade quando submetido ao próximo congelamento, contudo o comportamento difere quando testado sob *S. aureus* que teve um decréscimo de inibição partir do 4° congelamento.

Contudo o composto aumentou seu poder de inibição após os congelamentos, este fato resulta em um aumento de 96% de inibição contra o *Staphylococcus aureus* em relação ao extrato bruto e 62% sob *Escherichia coli*, no segundo congelamento. Nota-se que a eficácia de inibição difere em magnitude em relação aos micro-organismos utilizados, segundo Silveira et al, 2006, este fato pode ser explicado devido a sensibilidade de bactérias gram-positivas ser maior do que as gram-negativas, sendo assim o composto se mostrou-se mais eficaz contra as bactérias gram-positivas e apresentou potencial biológico até o 3° ciclo de congelamento.

Este mesmo fato ainda pode ser explicado devido ao metabolismo dos diferentes tipos de bactérias, as quais respondem de maneira adversa sob a presença de determinado agente inibidor, como relatado por Santos (2004), que destaca a resistência de *S. aureus* à meticilina, antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas, que até então era um sucesso no controle de doenças infecciosas causadas por bactérias gram-positivas, assim como, ressalta-se a resistência de uma bactéria gram-positiva do gênero *Enterococcus* que apresenta-se imune à vancomicina, antibiótico utilizado no tratamento de infecções bacterianas.

O decréscimo da atividade biológica após 3 ciclos de congelamento pode ser explicado devido ao mesmo fato descrito por Colla e Hernandez (2003) em seus estudos sobre congelamento e descongelamento, os autores ressaltam que na formação de gelo de forma lenta no meio extracelular ocorre a concentração do soluto na fase não congelada e a pressão de vapor diminui gradativamente. Como algumas propriedades das células impedem a entrada aparente dos cristais de gelo, ocorre a difusão da água do interior das células, causando a desidratação dessas e

o seu depósito sobre a superfície dos cristais extracelulares. Assim congelamentos por longos períodos resultam em considerável encolhimento das células e a formação de grandes cristais no meio extracelular, fatos que acarretam a perda das atividades biológicas do composto.

O processo de congelamento causa a formação de cristais de gelo dentro das células e entre células, e tem como vantagem a formação de poros na parede celular, permitindo assim o aumento da extração de compostos intracelulares (LEE, LEWIS; ASHMAN, 2012).

Segundo Alexandre (2015) a biomassa fúngica pode ser uma fonte promissora de moléculas com potencial biológico e em seus estudos obteve sucesso na extração de B-D-glucanas com ligações 1-3, 1-6 e fucomanogalactana, estas extraídas após o extrato aquoso ser submetido a ciclos de congelamento e descongelamento de maneira a separar o material insolúvel da fração solúvel. Ambos os polissacarídeos foram testados e apresentaram ação citotóxica contra células tumorais de cólon humano.

Lopes (2014) observou que após o processo de congelamento de biomassa das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* foi possível uma maior recuperação e concentração de carotenóides quando utilizado em conjunto com técnicas de homogeneizador sônico e nitrogênio líquido. Estes resultados foram possíveis pois o processo de congelamento lento causa a formação de macrocristais no interior da célula aumentando a extração dos compostos intracelulares, pela perda de fluido citoplasmático pela célula. E conforme Voda et al. (2012) o congelamento rápido feito através de nitrogênio líquido forma pequenos cristais no interior da célula, porém no processo com utilização de nitrogênio líquido provoca a formação de rachaduras na parede celular, aumentando assim os danos a estrutura da célula.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível no presente trabalho comprovar a existência de composto antimicrobiano no extrato obtido do cogumelo *Pleurotus sajor-caju*, o qual apresentou inibição tanto para micro-organismo gram-positivo, como para gram-negativo, havendo uma eficácia mais evidente sob *Staphylococcus aureus*. O composto após o processo de purificação por congelamento se destacou de forma significativa, tendo um aumento em magnitude de 96% de inibição contra o *Staphylococcus aureus* em relação ao extrato bruto e 62% sob *Escherichia coli*, ambos no 3º congelamento, o que demonstra que a técnica é uma boa alternativa quando se pretende concentrá-lo, sendo assim conclui-se que o extrato é eficiente contra a microbiota usada, sendo mais eficaz à micro-organismos gram-positivos e que o mesmo se mantém estável até pelo menos 3 congelamentos sucessivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo (310385/2013-0), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa e ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, campus Bagé – RS, pelo espaço físico.

REFERÊNCIAS

AKINYELE, B.J., ADETUYI, F.C. **Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volva-riella volvacea***. African Journal of Biotechnology, v.4, n.12, p.1390-1395, 2005.

ALBANI, S. M. F.; **Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação Inter unidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2008.

ALEXANDRE, S., M. A., SILVA, M. L. C.; EXPOSTI, D. T. D.; SELVEIRO, G. A.; HIRAÍWA, P. A.; **Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*: extrato e purificação**. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Departamento de Física, Química e Biologia, Presidente Prudente, 2010.

BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; COSTA, E. L. G.; NASCIMENTO, J. S. **Entomofauna associada ao cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer (Agaricales: acaricacea) no município do Capão do Leão, RS, Brasil**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 77, n.3, p. 465-469, jul. /Set., 2010.

CARBONERO, E. R.; SILVA, E. V.; KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M.; **Análise química da β -glucana (1→3) (1→6) isolada do corpo de frutificação do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju***. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

CARVALHO, M. P. de **Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauriderma* sp e *Pycnoporus sanguineus***. 102p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

CURVETTO, N. R., FIGLAS, D., DEVALIS, R., DELMASTRO, S. **Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn (II)**. Bioresource Technology, Essex, v.84, n.2, p.171-176, 2002.

DIAS, E. S., SILVA, R., CHWN, R. F., KOSHIKUMO, E. M., DIAS, E. S., **Cultivo do**

cogumelo Pleurotus sajor-caju em diferentes resíduos agroindustriais. 2003 Ciênc. agrotec., Lavras.V27, n6, p.1363-1369, nov./dez, 2003.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2ª edição revisada e ampliada. Caxias do Sul: Educs, 2010.

FELINTO, A. S. **Cultivo de cogumelos comestíveis do gênero Pleurotus spp em resíduos agroindustriais.** 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.

KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de extrato de cogumelo Shiitake (Lentinula edodes) com CO₂ a alta pressão.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MAIO, C. S, da S. **Influência da composição do substrato sobre o valor nutricional do cogumelo Pleurotus ostreatus e seu potencial na redução de hipercolesterolemia experimental.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

MARINELLO, M; **Rompimento celular;** Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS, Unidade Bento Gonçalves; Bento Gonçalves; Rio Grande do Sul. Brasil, 2009.

MARINO, R. H., ABREU, L. D., MESQUITA, J. B., RIBEIRO, G. T. **Crescimento e cultivo de diferentes isolados de Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 75, n.1, p.28-36, jan./mar., 2008.

MIYAJI, C. K., CÓLUS, I. M. S., **Shiitake, um cogumelo mutagênico ou antimutagênico?** Semina: Ci. Biol. Saúde, Londrina, v. 22, p. 11-17, jan./dez. 2001.

MIZUNO, T.; ZHUANG, C. **Houbitake, Pleurotus sajor-caju: antitumor activity and utilization.** Food Review International, New York, v. 11, n. 1, p. 185-187, 1995.

MODA, E. M. **Produção de Pleurotus sajor-caju em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação “in natura”.** Dissertação e Mestrado, São Paulo – SP, 2003.

MOURA, P. L. C. **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons.** Dissertação de mestrado na área de tecnologia nuclear. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2008.

NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição,** v. 23, n.1, 2003.

ORLANDELLI, R. C. SPECIAN, V. FERLBER, A. C. PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., ISSN:1980-0002, 2012.

OYETAYO, V.O. **Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild.** Brazilian Journal of Microbiology 40: 380-386, 2009.

PATAPOFF, T. W.; OVERCASHIER, D. E. **The importance of freezing on lyophilization cycle development.** Biopharm International, v. 3, p. 16–21, 2002.

RINCÃO, V. P.; **Ação de extratos de Lentinula edodes e β -glucana isolada de Agaricus brasiliensis na replicação de poliovirus e herpesvírus bovino.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Unifersidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SANTOS, N. Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** 13(n.esp):64-70., 2004.

SILVA, M. M. **Cultivo de cogumelos comestíveis pela técnica de Junção.** 2011. 41p. Monografia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SILVEIRA, G. P., NOME, F. GESSER, J. C., MONDOLESI, M. **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana.**Quim. Nova, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

TEIXEIRA, M. L., **Purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por Bacillus liqueniformis.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – centro de biotecnologia. Outubro, 2007.

VODA, A.; HOMAN, N.; WITEK, M.; DUIJSTER, A.; VAN DALEN, G.; VAN DER SMAN, R.; NIJSSE, J.; VAN VLIET, L.; VAN AS, H.; VAN DUYNHOVEN, J. **The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot.** Food Research International, v. 49, p. 687-693, 2012.

ABSTRACT: The basidiomycotas have as their representative the macroscopic fungi, mushrooms that in addition to their nutritional and therapeutic characteristics stand out for the production of antimicrobial agents, as is the example of Pleurotus sajor-caju, an edible mushroom of Asian origin that has high nutritional and antimicrobial value property. In this work, the extract of Pleurotus sajor-caju was extracted and evaluated for the stability of the antimicrobial compound when submitted to freezing, against gram-negative (*Escherichia coli*) and gram-positive (*Staphylococcus aureus*) microorganisms. The extraction of the compound was made from the mycelium of the Pleurotus sajor-caju cultured by solid-state fermentation, subjected to successive and periodic freezing and thawing, the antimicrobial activity was analyzed by the microplate method described in NCCLS (2003). By the results obtained it's possible to observe that both compounds increased their effectiveness after the freezes

because the technique allows the loss of the biological activity of some compounds of the sample, thus allowing the concentration of the compound of interest, resulting in an increase of 96% inhibition against *Staphylococcus aureus* and 62% against *Escherichia coli* in the second freeze. It is concluded that the compound differed in the percentage of inhibition to the microorganisms used, being more effective to the gram-positive, where for this extract remained stable until the third freezing.

KEYWORDS: Oyster mushroom, bioactive compounds, purification.

CAPÍTULO IX

PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS A PARTIR DE FUNGOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

**Priscila Molinares dos Santos
Lisiane de Marsillac Terra**

PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS A PARTIR DE FUNGOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Priscila Molinares dos Santos

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Engenharia Química
Santa Maria - Rio Grande do Sul

Lisiane de Marsillac Terra

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Engenharia Química
Santa Maria - Rio Grande do Sul

RESUMO: Os corantes (naturais ou sintéticos) são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, visando principalmente, conferir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos. Atualmente, a maioria é produzida artificialmente, entretanto, alguns deles podem ser tóxicos, cancerígenos ou causar graves danos aos órgãos vitais. Devido a isso, existe um grande interesse em pigmentos naturais produzidos a partir de fonte microbiana. Os fungos constituem uma fonte alternativa devido à alta produtividade em processos fermentativos, maior estabilidade e solubilidade. Tendo como objetivo explorar a diversidade e o potencial de fungos do Bioma Pampa, foi avaliada a produção de pigmentos de três fungos (FA, FB, e FC) isolados próximo aos municípios de São Sepé-RS e Dom Pedrito-RS. Os fungos foram cultivados em placas de Petri a 28 °C em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e em quatro meios líquidos sintéticos (MS1, MS2, MS3 e MS4) com composições diferentes. Após 10 dias de fermentação, observou-se a formação de pigmento amarelo e vermelho. Dentre os parâmetros cinéticos, a maior velocidade de crescimento radial foi a do fungo FA, $V_{cr} = 0,0496 \text{ cm.h}^{-1}$. A velocidade máxima específica de crescimento para o fungo FB foi de $\mu_{max} = 0,0133 \text{ h}^{-1}$, sendo a maior entre os demais. O fungo FB apresentou o menor tempo de geração, 52h e a maior produtividade máxima de células, $P_x = 0,2535 \text{ g.h}^{-1}$. Os resultados mostram que os fungos são uma fonte promissora de produção de corantes naturais.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos; corantes naturais; pigmento; fermentação.

1. INTRODUÇÃO

O uso de corantes alimentares como aditivos na indústria de alimentos é um fator significativo na determinação da aceitabilidade dos alimentos processados. Os corantes podem ser divididos em sintéticos ou naturais. Atualmente, o uso de corantes alimentares é baseado em pigmentos sintéticos que, por sua vez, são controlados por uma legislação vigente que varia em cada país. No entanto, ao longo das últimas décadas, os corantes sintéticos passaram a ser considerados indesejáveis pelos consumidores devido aos efeitos nocivos de alguns deles sobre a saúde humana, incluindo reações alérgicas, mutagênicos e potencial cancerígeno. Por isso, o mercado de corantes naturais vem crescendo e, conseqüentemente, induzindo ao desenvolvimento de fontes alternativas para a produção de pigmentos

(CARO et al., 2012; LOPES et al., 2013; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

O custo de produção e a dependência de condições climáticas favoráveis é o grande obstáculo em relação à produção/obtenção de pigmentos a partir de plantas e insetos. Os fungos proporcionam uma fonte alternativa mais rentável, pois, através de técnicas de fermentação em biorreatores pode-se obter alta produtividade em qualquer época do ano. Além disso, os pigmentos microbianos são muitas vezes mais estáveis e solúveis em água do que os de fontes vegetais (CARO et al., 2012; DUFOSSÉ et al., 2014; MAPARI, 2011 (US 2011/0250656 A1); TORRES, 2016; ZANETTE 2013; ZUNINO, 2013 (BR 10 2012 000756-8 A2)).

Visando a obtenção de pigmentos naturais a partir de fungos isolados do Bioma Pampa, realizou-se o cultivo de culturas de fungos em placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Agar) e, posteriormente fermentou-se em quatro meios líquidos diferentes denominados MS1, MS2, MS3 e MS4. Avaliou-se a coloração em placa, a formação de biomassa a partir de parâmetros cinéticos e a produção de pigmentos em meio líquido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Screening das culturas isoladas

As culturas utilizadas nesse trabalho fizeram parte de um estudo anterior realizado nos Laboratórios de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria. Com o objetivo de identificar microrganismos autóctones do Bioma Pampa e que sejam de interesse industrial, os fungos foram coletados próximo aos municípios de São Sepé-RS e Dom Pedrito-RS.

Uma quantidade inicial de oito culturas já isoladas, mas ainda não identificadas, cuja coloração em placa foi observada visualmente, foram pré-selecionadas para a reativação. As culturas estavam conservadas em placas de Petri a 4 °C em refrigerador. A reativação das culturas foi feita mediante repique das placas de Petri originais. Um disco de 10 mm foi cortado de cada placa e transferido para meio BDA. O experimento foi realizado em duplicata.

Após 12 dias de cultivo em estufa a 28 °C apenas três culturas apresentaram boa reativação e coloração satisfatória, as demais foram descartadas.

2.2 Fermentação submersa

Além da coloração em placa, foi estudada a produção de pigmentos em meio líquido. Para isso, os três fungos foram testados em quatro diferentes meios com a seguinte composição:

- Meio sintético 1 (MS1): 16 g de glicose; 12 g de extrato de levedura; 16 g de peptona; 3,2 g de sulfato de amônia; 0,8 g de sulfato de magnésio; 1,6 g de sulfato ferroso e 1,6 g de sulfato de manganês para 1,6 L de

água destilada (MEINICKE, 2008; PINHEIRO, 2015).

- Meio sintético 2 (MS2): 0,2g de sacarose; 0,2g de glicose; 1g de sulfato de amônio; 1g de fosfato monopotássico; 0,5g de sulfato de magnésio; 0,5g de cloreto de potássio para cada litro de água destilada (MENEZES e HANLIN, 1997).
- Meio sintético 3 (MS3): 20g de glicose; 5g de nitrato de amônio; 5g de fosfato monopotássico; 5g de fosfato dipotássico; 0,1g de cloreto de cálcio; 0,5g de sulfato de magnésio; 0,01g sulfato de ferro (II); 0,01g de sulfato de zinco e 0,03g de sulfato de manganês para cada litro de água destilada (MEINICKE, 2008).
- Meio sintético 4 (MS4): 10g de dextrose; 5g de peptona; 1g fosfato monopotássico e 0,5g de sulfato de magnésio para cada litro de água destilada (MENEZES e HANLIN, 1997).

Todo o material, inclusive o meio, foi autoclavado a 120°C por 20 minutos. Para facilitar a coleta de amostra, foram utilizados 10 frascos de Erlenmeyer para cada meio testado. Verteu-se 150 mL de meio em frascos de Erlenmeyer, inoculou-se um disco de Agar de 10 mm de cada fungo nos respectivos meios e incubou-se em shaker modelo Incubator Shaker Series Innova 44 a 28°C e 128 rpm durante 10 dias.

2.3 Determinação da biomassa

A cada 24h foi retirado um frasco de amostra para análise. O meio foi filtrado com auxílio de papel filtro Whatman n° 1. A biomassa foi colocada em micro-ondas por 15 min na potência de 180 W para secagem e determinação da concentração celular por gravimetria (BÜHLER et al., 2015; MEINICKE et al., 2012).

2.4 Parâmetros cinéticos

Para análise do crescimento do micélio, repicaram-se as culturas a partir de um disco de 15 mm no centro da placa de Petri e com auxílio de uma régua mediram-se diariamente os diâmetros. A velocidade de crescimento do micélio do fungo foi determinada pelo coeficiente angular da reta obtida por regressão linear, conforme Equação 1 (CAMPOS et al., 2011; MEINICKE, 2008; OLIVEIRA et al., 2016):

$$d(t) = a + V_{cr} \cdot t \quad (1)$$

Em que: $d(t)$ é o diâmetro da colônia (cm); a é o coeficiente angular da reta; V_{cr} é a velocidade de crescimento radial ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$); t é o tempo de cultivo (h).

Para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento, adotou-se o crescimento do fungo na fase exponencial, de acordo com a Equação 2 (SCHMIDELL

et al, 2001):

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\max}t \quad (2)$$

Em que: X é a biomassa na fase exponencial (g.L⁻¹); X₀ é a biomassa no início da fase exponencial (g.L⁻¹); μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹) e t é o tempo (h).

O intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular é conhecido como tempo de geração e é definido pela Equação 3 (SCHMIDELL et al, 2001):

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

A produtividade máxima em células (P_x) foi calculada pela diferença entre a maior concentração de biomassa em um instante t e a concentração de biomassa inicial dividida pelo intervalo de tempo correspondente conforme Equação 4 (SCHMIDELL et al, 2001):

$$P_x = \frac{X_{\max} - X_0}{t - t_0} \quad (4)$$

Em que: P_x é a produtividade máxima de biomassa (em g.h⁻¹) no instante de tempo (t - t₀); X_{max} é a máxima formação de biomassa no instante de tempo t; X₀ é a formação de biomassa no instante de tempo t₀; t é o tempo para atingir o valor máximo de formação de biomassa; t₀ é o tempo inicial do cultivo.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de pigmentos em meio sólido

Após o cultivo em estufa por 12 dias, as três culturas que tiveram o processo de reativação satisfatório, apresentaram coloração em meio sólido BDA. A Figura 1 ilustra a forte coloração obtida pelo fungo FB: amarela laranjada no verso da placa e hifas aéreas de coloração branca. Todas as culturas apresentaram hifas aéreas e aspecto algodinoso, característica típica dos fungos filamentosos de acordo com Gomes (2015).

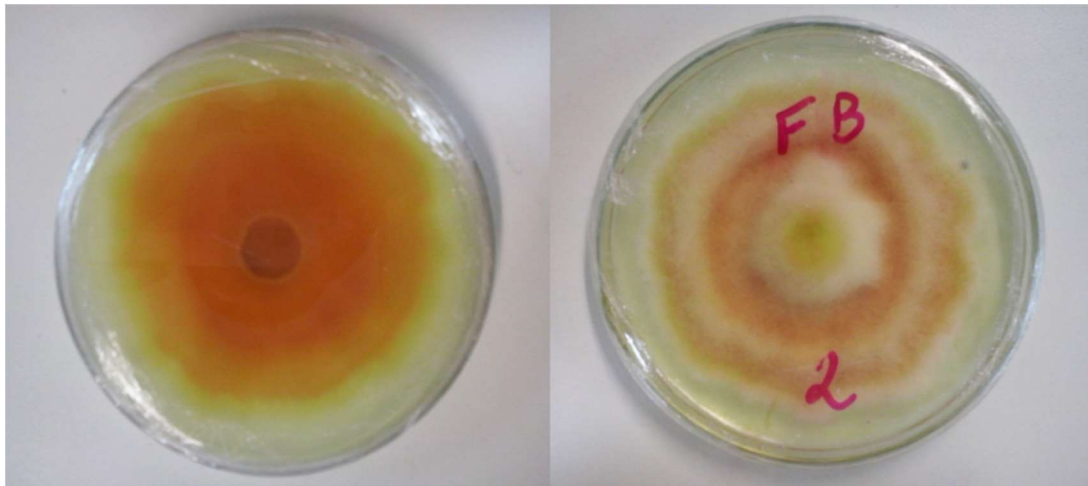


Figura 1 - Verso e frente da placa de Petri mostrando a coloração obtida após 12 dias de cultivo em estufa a 28 °C do fungo FB.

A Tabela 1 apresenta os valores para o crescimento do micélio dos fungos estudados. Observou-se que todos tiveram um comportamento semelhante, no entanto, o fungo FA se destacou dos demais e apresentou velocidade de crescimento radial mais rápida ($V_{cr} = 0,0496 \text{ cm.h}^{-1}$). Os valores do coeficiente de regressão (R^2) indicam que os dados se ajustam bem a equação da reta.

Tabela 1 - Equações de regressão linear, velocidades de crescimento do micélio (V_{cr}) e coeficiente de regressão (R^2) para os fungos estudados em meio sólido BDA

Fungo	Equação de regressão	$V_{cr} (\text{cm.h}^{-1})$	$V_{cr} (\text{mm.dia}^{-1})$	Coefficiente de regressão (R^2)
A	$y = 0,0496x + 0,7278$	$0,0496 \pm 0,13$	11,90	$R^2 = 0,9712$
B	$y = 0,0358x + 1,1389$	$0,0358 \pm 0,13$	8,60	$R^2 = 0,9889$
C	$y = 0,0394x + 0,8306$	$0,0394 \pm 0,06$	9,46	$R^2 = 0,9738$

Fonte: a autora

3.2. Fermentação submersa e parâmetros cinéticos

Todos os meios líquidos utilizados foram baseados em estudos anteriores e são indicados para o cultivo de fungos. No entanto, algumas cepas são mais exigentes com relação aos nutrientes do meio e, por isso, houve um meio que foi o mais adequado para cada cepa. O fungo FA desenvolveu-se melhor no meio MS3 enquanto o meio MS4 foi o mais adequado para os fungos FB e FC. A Figura 2 ilustra a coloração amarela obtida pelo fungo FB em meio MS4 após 10 dias de fermentação. Nota-se um meio amarelo límpido devido à filtração do caldo fermentado.

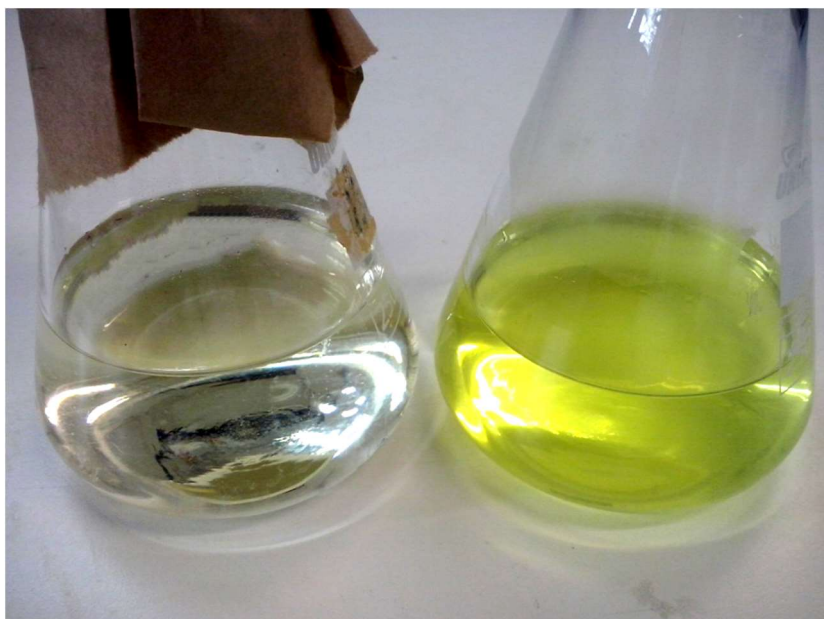


Figura 2 - Coloração amarela do meio MS4 em comparação com o branco (meio sem inoculo) após 10 dias de fermentação e após filtração.

A cinética da biomassa e a formação de pigmentos para todos os fungos estudados apresentaram comportamento conforme descrito por Schmidell e colaboradores (2001). Inicialmente houve uma fase de adaptação da cultura ao meio, na qual não houve reprodução celular, somente crescimento celular e sintetização de enzimas. Observou-se que com a liberação das enzimas o meio tornou-se turvo. Em seguida, iniciou-se a fase logarítmica em que o crescimento celular foi máximo e obtiveram-se os parâmetros cinéticos conforme apresentados na Tabela 2. O fungo FB apresentou a maior velocidade máxima de crescimento e, conseqüentemente, o menor tempo de geração, ou seja, em aproximadamente 52h dobrou a sua concentração celular. Além disso, a produtividade máxima em células também foi a maior ($P_x = 0,2535 \text{ g.h}^{-1}$).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos calculados para os fungos estudados: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), tempo de geração (tg) e produtividade máxima em células (P_x)

Fungo	Meio	$\mu_{max} (\text{h}^{-1})$	tg (h^{-1})	$P_x (\text{g.h}^{-1})$
A	MS3	0,0086	80,48	0,01712
B	MS4	0,0133	52,15	0,02535
C	MS4	0,0070	99,70	0,01088

Fonte: a autora

Ao final da fase logarítmica e início da fase estacionária, observou-se a formação de pigmento, evidenciando um crescimento parcialmente associado à formação de produto, característica típica dos metabólitos secundários (SANTOS et al., 2013; SCHMIDELL et al., 2001). Somente a partir do sexto dia é que a coloração aumentou, intensificando-se no décimo dia (Figura 2).

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a produção de corantes a partir de fungos é uma alternativa viável para substituir os corantes sintéticos. As colorações obtidas tanto em placa quanto em meio líquido podem vir a ter aplicações na indústria de alimentos. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para extração do pigmento e testes de toxicidade visando à eliminação de efeitos nocivos à saúde humana.

A partir das etapas futuras de identificação das cepas de fungos e, posteriormente do metabólito responsável pela coloração, será possível uma otimização dos meios de cultura, bem como os diversos parâmetros da fermentação e assim, aumentar a escala e a produção de corantes naturais a partir de fungos.

AGRADECIMENTOS

Ao doutorando em Engenharia Agrícola, Jair João Daniel Júnior por ter cedido as cepas para este experimento.

REFERÊNCIAS

BÜHLER, R. M. M. et al. **Influence of light intensity on growth and pigment production by *Monascus ruber* in submerged fermentation.** [Applied Biochemistry Biotechnology](#), v. 176, p. 1277-1289, 2015.

CAMPOS, C. S. et al. **Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 141-145, 2011.

CARO, Y. et al. **Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview.** Natural Products and Bioprospecting, v. 2, p. 174-193, 2012.

DUFOSSE, L. et al. **Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry.** Current Opinion in Biotechnology, v. 26, p. 56-61, 2014.

GOMES, A. C. S. **Cinética de crescimento do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 em cultivo no estado sólido.** 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2015.

LOPES, F. C. et al. **Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 171, p. 616-625, 2013.

MAPARI, S. A. S. et al. **Production of Monascus-like azaphilone pigment.** US Pat. 2011/0250656 A1, 13 out. 2011. 13p.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por Monascus ruber CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso.** 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

MEINICKE, R. M. et al. **Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by Monascus ruber in submerged fermentation.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, p. 238–242, 2012.

MENEZES, M.; HANLIN, D. M. W. S. **Guia prático para fungos fitopatogênicos.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Imprensa Universitária, 1997. 106 p.

OLIVEIRA, C. F. D. et al. **Bagaço de malte como substrato para produção de biopigmentos produzidos por Monascus ruber CCT 3802.** *Revista de Agricultura Neotropical*, v. 3, n. 3, p. 6-9, 2016.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. **Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review.** *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 70-76, 2015.

PINHEIRO, U. V. **Produção de ácido giberélico por fermentação em estado sólido empregando substratos agroindustriais.** 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2015.

SANTOS, E. et al. **Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated Penicillium purpurogenum DPUA 1275.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 6, p. 802-810, 2013.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 542 p. vol.2.

TORRES, F. A. E. et al. **Natural colorants from filamentous fungi.** [Applied Microbiology Biotechnology](#), v. 100, p. 2511-2521, 2016.

ZANETTE, G. F.; **Pigmentos Naturais produzidos por fungos filamentosos isolados de**

Theobroma grandiflorum (Willd. Ex Spreng.) Schum. (cupuaçu). 2013. 110f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2013.

ZUNINO, C. et al. **Método de obtenção de corantes naturais em pó, os corantes assim obtidos e suas aplicações.** BR Pat.10 2012 000756-8 A2, 26 nov. 2013. 13p.

ABSTRACT: The dyes (synthetic and natural sources) are largely applied by the food industry, aiming to grant, repair and intensify the original food color. Currently the major dyes are synthetic, however, some of them may be toxic, carcinogenic or cause serious damage to vital organs. Due to this, there is a great interest in natural pigments produced from microbial source. Fungi are an alternative source due to the high productivity in fermentative processes, greater stability and solubility. In order to explore the diversity and fungus potential of the Pampa Biome, we evaluated the pigments production of three fungus (FA, FB, and FC) isolated from São Sepé-RS and Dom Pedrito-RS. The fungi were cultivated in Petri dishes 28 ° C in PDA (Potato Dextrose Agar) medium and in four synthetic liquid media (SM1, SM2, SM3 and SM4) with different compositions. After 10 days of fermentation, yellow and red pigment was obtained. Among the kinetic parameters, the highest radial growth rate was that of the fungus FA, $V_{cr} = 0.0496 \text{ cm.h}^{-1}$. The maximum specific growth rate for FB fungus was $\mu_{max} = 0.0133 \text{ h}^{-1}$, the highest of the others. The FB fungus presented the shortest generation time, 52h and the highest maximum cell productivity, $P_x = 0.2535 \text{ g.h}^{-1}$. The results showed that the fungi are possible alternative source for the production of the natural dyes.

KEYWORDS: Fungi; natural dye; pigment; fermentation.

CAPÍTULO X

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DE CARÇAÇAS DE FRANGO DESOSSADAS MANUALMENTE UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

**Mari Silvia Rodrigues de Oliveira
Felipe de Lima Franzen
Nelcindo Nascimento Terra**

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DE CARÇAÇAS DE FRANGO DESOSSADAS MANUALMENTE UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

Universidade Federal de Santa Maria, Campus Sede, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Santa Maria – RS

Felipe de Lima Franzen

Universidade Federal de Santa Maria, Campus Sede, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Santa Maria – RS

Nelcindo Nascimento Terra

Universidade Federal de Santa Maria, Campus Sede, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Santa Maria – RS

RESUMO: O emprego de hidrolisados proteicos, oriundos de fontes animais e vegetais, em formulações específicas, é uma área de crescente interesse. O objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes hidrolisados liofilizados com alto valor proteico, obtidos a partir da hidrólise enzimática de carcaças de frango manualmente desossadas (CMD). Antes de serem processadas, foram descongeladas e cortadas em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Foram utilizadas três enzimas comerciais, Papaína®, Flavourzyme® e Protamex®. A hidrólise ocorreu em banho termostatizado com temperatura, tempo e pH controlados. Foi realizada a composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados, atividade de água dos hidrolisados liofilizados e as seguintes análises de controle da hidrólise: grau de hidrólise, teores de proteínas, sólidos totais, cinzas, caracterização de aminoácidos, rendimento, percentual de hidrólise e cor dos hidrolisados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias. O grau de hidrólise maior foi com a Protamex, seguido da Papaína e da Flavourzyme. O teor de proteínas após os 120 minutos de hidrólise não variou estatisticamente ($p > 0,05$) entre a Papaína e a Flavourzyme. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle. Concluiu-se que os hidrolisados proteicos obtidos da carcaça manualmente desossada (CMD) de frango apresentaram alto conteúdo proteico, caracterizando-se como matéria-prima promissora na formulação de dietas especiais.

PALAVRAS-CHAVE: Carcaça de frango manualmente desossada (CMD); Hidrolisado proteico; Hidrólise enzimática.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, a produção brasileira de

carne de frango no ano de 2015 totalizou 13,146 milhões de toneladas, volume 3,58% superior ao registrado no ano de 2014. Com isso, o Brasil se consolidou como segundo maior produtor de carne de frango do mundo, superando a China que produziu 13,025 milhões de toneladas no mesmo ano, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ABPA, 2016).

A presença do Brasil no cenário mundial da exportação da carne de frango justifica-se pela expansão das plantas industriais avícolas, pela produção de cortes especiais, porções ou peças diferenciadas ao invés do frango inteiro, produtos com alto valor agregado, produtos congelados, carnes pré-cozidas, empanados e hambúrgueres de frango associados ao baixo custo de produção, ocasionado principalmente pela disponibilidade de matérias-primas indispensáveis à produção, como o milho e a soja, possibilitam a entrada do produto brasileiro em novos mercados consumidores (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

A estrutura óssea final da desossa manual pode servir de fonte proteica para a obtenção de hidrolisados proteicos, utilizados em formulações específicas tais como produtos alimentares geriátricos, suplementos energéticos, dietas para controle de peso ou terapêuticas ou ainda dietas entéricas (SLIZYTE et al., 2005). A grande maioria dos hidrolisados utilizados, atualmente, são obtidos da caseína e da proteína de soja.

As metodologias mais usuais para a obtenção dos hidrolisados proteicos são a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

No método enzimático, o princípio básico para a obtenção do hidrolisado proteico envolve a quebra hidrolítica das longas cadeias de moléculas proteicas pela adição de enzimas vegetais ou por proteases microbianas. A catálise enzimática possui benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, a redução dos custos de laboratório e de maquinário, visando, com isto, à melhoria ou à obtenção de produtos diferenciados na indústria alimentícia (MUSSATTO et al., 2007).

Os hidrolisados proteicos são utilizados principalmente na gestão nutricional de indivíduos que não conseguem digerir totalmente a proteína pura. Principalmente os hidrolisados ricos em peptídeos de baixo peso molecular, especialmente di - e tripeptídeos, com o mínimo possível de aminoácidos livres, demonstram possuir mais utilizações alimentares, devido aos seus valores nutricionais e terapêuticos aumentados (BHASKAR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar hidrolisados liofilizados, obtidos a partir da hidrólise de carcaças de frango manualmente desossadas (CMD), utilizando diferentes enzimas proteolíticas, e também o processo de obtenção destes pela composição proximal, grau de hidrólise e rendimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

A matéria-prima utilizada foi a estrutura óssea oriunda da desossa manual, adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil, aqui denominada de carcaça de frango manualmente desossada (CMD) e congelada, obtida de animais abatidos com aproximadamente 42 dias de vida e com peso médio de 2,5 kg. Antes da sua utilização, foi descongelada sob temperatura de refrigeração e cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. As amostras de carne utilizadas para a realização da composição proximal foram obtidas pela remoção da carne aderida na estrutura com uma faca de aço inox comum e posteriormente homogeneizadas em liquidificador. As amostras experimentais apresentaram um pH médio de 6,34.

2.2. Enzimas

As enzimas utilizadas neste experimento são as mesmas descritas em Oliveira et al. (2014). A papaína comercialmente pura denominada Papain, From Papaya Látex-1,5 units/MG solid (Sigma Aldrich®) é uma cisteína protease da família C1-peptidase. Foi utilizada também a Flavourzyme, que é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae* e utilizada para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. A Flavourzyme1000 L® é uma exopeptidase com uma atividade de 1 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de leucina-p-nitroanilida por minuto. A terceira enzima testada foi Protamex® que é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. As duas últimas enzimas mencionadas foram fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.

2.3. Composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal da carcaça manualmente desossada de frango (CMD) e dos diferentes hidrolisados obtidos foi determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (CUNNIFF, 1995). A quantidade de proteína presente foi determinada pelo método de determinação de nitrogênio total, Kjeldahl ($N \times 6,25$); lipídeos pelo método gravimétrico de extração a quente utilizando extrator de Soxhlet para a CMD e o método do Bligh e Dyer (1959) para os hidrolisados liofilizados; cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e a umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Para a realização do cálculo do valor calórico total,

foram utilizados valores de conversão, alimento/energia, sendo 4, 9 e 4 para carboidratos, lipídeos e proteínas, respectivamente, e, a seguir, foi realizado o somatório desses valores.

2.4. Processo de obtenção do hidrolisado proteico

2.4.1. Condições de hidrólise

Para a realização do processo de hidrólise, foram utilizados 250 g de carcaça manualmente desossada (CMD) /g ou mL de enzima acrescidos de 500 mL de água destilada (1:2) previamente aquecida e colocados em banho termostaticado (Banho Ultratermostaticado Marconi modelo MA 184). As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura e pH de máxima atividade catalítica de cada enzima de acordo com a literatura e estão descritas na Tabela 1 (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003). O pH das enzimas Flavourzyme e Protamex foi ajustado com solução de fosfato de sódio 0,2 M. Durante a hidrólise, as amostras foram continuamente agitadas com agitador mecânico (Agitador Marconi modelo MA 039) durante todo o tempo de hidrólise (120 minutos).

Durante a hidrólise da CMD, caldos de amostras foram coletados aos 60 e 120 minutos de hidrólise. Todos os hidrolisados coletados foram filtrados em uma tela plástica com abertura de malha de 10 mesh, filtrados novamente em uma gaze e, a seguir, centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga (Cetribio-Servilab) para remover todas as partículas sólidas (fundo) e a gordura (camada superior).

Depois da hidrólise, os resíduos ósseos foram pesados para a realização do cálculo de percentual de hidrólise.

A proteína hidrolisada foi então aquecida a 95 °C por 15 minutos para inativar a enzima e, em seguida, foi resfriada à temperatura ambiente, congelada e, então, liofilizada a uma temperatura de -54 °C em liofilizador (LD 1500 Terroni).

Tabela 1 – Sistemas enzimáticos de hidrólise.

Enzimas	[E]:[S] ^a	pH ^b	T °C ^c	Tempo (min.) ^d
Papaína	1:250	6,5	60	120
Flavourzyme	1:250	7,0	50	120
Protamex	1:250	7,0	50	120

^aRelação Enzima/Substrato (p/p); ^bpH ótimo de ação das enzimas; ^cTemperatura ótima de ação das enzimas; ^dTempo total de hidrólise. Fonte: Elaboração dos autores.

2.4.2. Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Alíquotas de hidrolisado durante os tempos indicados foram retiradas e a reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Depois de repouso de 10 minutos e filtração para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), expresso em mg de albumina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo SP-220–Biospectro) a 650 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merritt (1994) e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), sendo expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg/g, segundo a Equação 1.

$$\text{GH} = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA 10\%} \times 100}{\text{Proteína Total da Amostra}} \quad (1)$$

2.4.3. Determinação do teor de sólidos, cinzas e proteínas totais

Durante a hidrólise proteica foram retiradas alíquotas de amostras como mencionado no processo de obtenção de hidrólise e após a inativação enzimática foram encaminhadas para as análises de determinação do teor de sólidos solúveis totais em estufa a 105 °C, de cinzas em mufla a 550 °C e proteínas solúveis pelo método de Kjeldhal.

2.4.4. Determinação do percentual de hidrólise e do rendimento da hidrólise

O percentual de hidrólise (o quanto de carne foi retirada da carcaça) foi avaliado por diferença de peso da carcaça manualmente desossada (CMD) antes e depois do tempo de hidrólise de 60 minutos e 120 minutos. Para o cálculo do rendimento do hidrolisado liofilizado, fez-se uma proporção da quantidade total de amostra (CMD) em relação ao hidrolisado liofilizado obtido.

2.5. Determinação dos aminoácidos dos hidrolisados proteicos

As proteínas constituintes das amostras foram hidrolisadas com HCl 6 N durante 24 horas a 110 °C. Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida reagem com Fenilisotilcianato (PITC), separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e detectados por ultravioleta (UV). A quantificação foi feita por calibração interna multinível segundo a metodologia descrita por LAMIC (2012).

2.6. Análise objetiva da cor dos hidrolisados proteicos

A avaliação objetiva da cor dos hidrolisados obtidos foi realizada através do sistema CIE, utilizando-se o aparelho Minolta Chroma Meter, CR-300 (MINOLTA), através dos parâmetros L* (luminosidade), a* (direção para o vermelho) e b* (direção para o amarelo), segundo ANSOARENA et al. (1997).

2.7. Determinação da atividade de água

Para a determinação da atividade de água (Aa), foi utilizado o aparelho Aqualab® modelo CX-2 (DECAGON DECIVE, 2003), para a realização da leitura direta.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo Sistema IBM® SPSS® Statistcos (Versão 20).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição proximal da matéria-prima utilizada na hidrólise e dos hidrolisados liofilizados

A Tabela 2 mostra as características da matéria-prima utilizada no experimento (CMD). Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-TACO (UNICAMP, 2011), os valores encontrados foram diferentes dos valores citados para a amostra de frango cru inteiro com pele, cujos valores são de 66,5% de umidade, 16,4% de proteína, 17,3% de lipídeos e 0,7% de cinzas.

Tabela 2 - Média da composição proximal e valor calórico da carcaça manualmente desossada (CMD) utilizadas no experimento.

Determinações(b.u)	Carcaça Manualmente Desossada (CMD)
Umidade (%)	58,87 ± 0,19
Cinzas (%)	0,63 ± 0,05
Lipídeos (%)	26,79 ± 4,00
Proteínas (%)	13,25 ± 0,48
Carboidratos (%)	0,46 ± 0,05

Os dados apresentados neste trabalho estão próximos aos relatados por Trindade et al. (2004), para CMS de galinha, em que citam várias composições centesimais de carne mecanicamente separada de frangos e galinhas. O teor de lipídeos apresentado na [Tabela 2](#) pode ser explicado pela utilização de pele e de todas as gorduras corporais que a carcaça apresentava. Ao se comparar a carne retirada manualmente da carcaça resultante da desossa manual, verificou-se que esta possui uma composição diferenciada da carne mecanicamente separada. Gonçalves et al. (2009) analisaram 20 amostras de CMS de frango e encontraram valores médios de 16% de proteína, 17% de lipídeos, 61% de umidade e 1,17% de cinzas. A diferença pode estar relacionada ao tipo de corte utilizado e também ao processo empregado na obtenção da CMS, pois a fabricação de CMS pode ser realizada com várias partes da carcaça. Quando são utilizadas partes do peito, o produto obtido é de melhor qualidade. O processo também influencia, pois o sistema hollow drum (tambor oco) é melhor que o sistema auger (rosca sem fim), já que com este processo o produto caracteriza-se pelo alto conteúdo de cálcio e de fragmentos de ossos e cartilagens (HENCKEL et al., 2004).

A composição química dos alimentos tem um importante papel no fornecimento de nutrientes essenciais para a manutenção da saúde humana. A [Tabela 3](#) apresenta os dados da composição proximal dos hidrolisados obtidos da CMD com as diferentes enzimas proteolíticas. O teor de umidade foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os hidrolisados liofilizados obtidos, os quais variaram de 4,58% a 8,51%. A maioria dos estudos realizados com proteína hidrolisada de peixes apresenta teores de umidade inferiores a 10% (OVISSIPOUR et al., 2009; CHALAMAIAH et al., 2010; FOH et al., 2011). Os baixos percentuais de umidade apresentados pelos hidrolisados proteicos são determinados pelas metodologias de secagem, assim como pelo tipo de amostra empregada (BUENO-SOLANO et al., 2009).

O teor de cinzas foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os hidrolisados obtidos e variaram de 4,81% a 12,86% ([Tabela 3](#)). Os teores maiores de cinzas apresentados pelos hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex justificam-se pelo emprego da solução de fosfato de sódio 0,2 M para o ajuste de pH.

Tabela 3 – Composição proximal dos hidrolisados liofilizados de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas.

Enzima	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteína (%)	Valor CAL (Kcal/100g)
Papaína	4,58 ^c ±0,15	4,81 ^c ±0,03	6,81 ^a ±0,63	79,36 ^a ±0,32	396,47 ^a ±2,69
Flavourzyme	8,51 ^a ±0,24	12,86 ^a ±0,06	5,45 ^a ±0,47	67,86 ^b ±0,66	341,79 ^b ±2,44
Protamex	6,23 ^b ±0,31	11,07 ^b ±0,09	3,27 ^b ±0,97	68,21 ^b ±0,62	347,12 ^b ±3,42

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em b.s. Fonte: Elaboração dos autores.

O conteúdo de lipídeos não variou entre os hidrolisados obtidos com a Papaína e Flavourzyme, mas estes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do hidrolisado obtido com a enzima Protamex, porém todos se apresentaram menores que o teor de lipídeos da matéria-prima inicial (CMD). Rossi et al. (2009), ao hidrolisarem carne mecanicamente separada de frango com a enzima Alcalase 2,4 L FG, obtiveram um hidrolisado com 1,08% de lipídeos, indicando que o processo de retirada da gordura na centrifugação foi extremamente eficiente.

Os teores de proteínas (Tabela 3) apresentados pelos hidrolisados proteicos obtidos pela hidrólise com a enzima Flavourzyme e Protamex foram semelhantes, porém diferiram ($p < 0,05$) significativamente do resultado obtido com a Papaína. A composição química do hidrolisado obtido com a Papaína assemelhou-se aos resultados obtidos por Fonkwe e Singh (1996), que obtiveram aproximadamente 78% de proteínas em uma hidrólise do resíduo da carne mecanicamente separada de peru. Já os resultados apresentados por Rossi et al. (2009) assemelham-se aos obtidos neste estudo para as enzimas Flavourzyme e Protamex.

Os teores de proteínas apresentados pelos hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas proteolíticas são maiores que os apresentados pela matéria-prima inicial utilizada neste experimento. O procedimento normal de utilização destas carcaças gera a carne mecanicamente separada de frango (CMS), cujos teores proteicos são de aproximadamente 13% (BRASIL, 2000). Com este processo de hidrólise enzimática, tem-se a produção de um hidrolisado em pó com grandes possibilidades de uso tanto pela indústria de alimentos como pela indústria farmacêutica para a produção de produtos geriátricos, dietas para controle de peso, terapêuticas ou dietas entéricas, além de suplementos energéticos para atletas.

Chalamaiah et al. (2012) realizaram uma extensa revisão bibliográfica, nela estão reunidos dados da composição proximal dos hidrolisados proteicos de diversas espécies de peixes, obtidos com as mais diferentes enzimas proteolíticas, porém não são comuns dados na literatura sobre hidrolisados proteicos obtidos a partir do residual ósseo gerado da desossa manual de carne de frango.

3.2. Grau de Hidrólise (GH)

O grau de hidrólise fornece uma ideia do mensuramento da extensão da

proteína clivada, o que vai influenciar as propriedades funcionais destes hidrolisados (LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999). Os resultados obtidos para o grau de hidrólise, utilizando-se como enzimas proteolíticas Papaína, Flavourzyme e Protamex e como substrato a carcaça manualmente desossada (CMD) de frango, estão apresentados na Tabela 4. No final da hidrólise (120 minutos), observam-se valores de 43%, 20% e 51% de GH para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente. Com o mesmo substrato e a mesma quantidade de enzima, o GH apresentado pela Protamex foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o da Papaína e Flavourzyme.

Herpandi et al. (2012) utilizaram diferentes enzimas proteolíticas (Alcalase® 2.4L FG, Protamex®, Neutrase® 1,5 mg e Flavourzyme® 500 mg) para hidrolisar atum (*Katsuwonus pelamis*) e constataram que a Alcalase® 2.4L FG apresentou o maior grau de hidrólise entre todas as proteases, seguido da Protamex®, Flavourzyme 500MG® e Neutrase® 1,5 mg.

Charoenphun et al. (2013) utilizaram diferentes enzimas, entre elas a Papaína e a Flavourzyme, e obtiveram graus de hidrólise de 41,6% e 35,6%, respectivamente, após 6 horas de hidrólise de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Mesmo utilizando matérias-primas diferentes, o resultado para a Papaína assemelha-se muito com o encontrado neste estudo no tempo de 60 minutos, indicando que talvez não fosse necessário um tempo tão longo de hidrólise para esta protease. Entretanto, os resultados apresentados para a Flavourzyme foram extremamente maiores, indicando que esta exopeptidase necessita de um tempo maior para obter melhores resultados de hidrólise para esta enzima.

No entanto, Santos (2006), que analisou o grau de hidrólise obtido com a enzima Flavourzyme na elaboração de hidrolisado de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) com uma concentração substrato/tampão de 1g/mL; 2% de enzima/substrato; pH 7 e 60 minutos de reação a 50 °C, encontrou um grau de hidrólise de 24,7%, utilizando uma concentração de enzima/ substrato bem maior que a empregada no presente estudo.

Como pode ser observado na Tabela 4, o tempo influencia positivamente o grau de hidrólise, isto está de acordo com o trabalho realizado por Schmidt e Salas-Mellado (2009), que obtiveram um efeito positivo para esta variável em um trabalho sobre a influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. Também Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999) observaram uma hidrólise rápida de carne de arenque (*Clupea harengus*), atingindo um GH de 24% em 20 minutos de incubação com a enzima Alcalase, a pH 8,0 e 50 °C, sendo que, após 60 minutos de incubação, o grau de hidrólise aumentou para 36%.

Tabela 4 – Grau de hidrólise apresentado durante 60 e 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos) /Grau de Hidrólise	
	60 min.	120 min.
Papaína	39,25 ^b ±4,97	43,19 ^b ±4,69
Flavourzyme	16,72 ^c ±1,89	20,25 ^c ±4,33

Protamex	47,12 ^a ±5,27	51,31 ^a ±4,61
-----------------	--------------------------	--------------------------

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

3.3. Teor de proteínas solúveis, sólidos totais e cinzas durante o tempo de hidrólise

Na Tabela 5, são apresentados os valores do teor de proteínas durante o tempo total de hidrólise para as três enzimas utilizadas no experimento. A enzima Papaína, aos 120 minutos de hidrólise, apresentou o maior percentual de proteínas, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da Protamex.

Os teores de proteínas obtidos neste estudo com as enzimas proteolíticas são semelhantes aos relatos de muitas pesquisas feitas com hidrolisados obtidos de diferentes espécies de peixes que variaram de 60% a 90% da composição total (DONG et al., 2005; CHOI et al., 2009; KHANTAPHANT et al., 2011). Os altos teores de proteínas apresentados neste trabalho demonstram que estes hidrolisados possuem grande potencial para serem utilizados como suplementos proteicos na nutrição humana.

Tabela 5 – Teor de proteínas dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Proteínas (%)	
	Tempo de Hidrólise (minutos)	
	60 min.	120 min.
Papaína	74,37 ^a ±10,45	75,08 ^a ±6,70
Flavourzyme	61,58 ^b ±9,79	66,80 ^{ab} ±8,87
Protamex	63,99 ^{ab} ±6,36	63,96 ^b ±5,29

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base seca).

Na Tabela 6, podem ser observados os valores dos teores de sólidos solúveis de hidrolisados de CMD de frango e da atividade de água dos hidrolisados liofilizados obtidos durante o tempo de hidrólise para as três enzimas proteolíticas utilizadas.

Os teores de sólidos solúveis totais (Tabela 6) nos tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as enzimas Papaína e Protamex, porém a enzima Flavourzyme apresentou um percentual de sólidos solúveis estatisticamente menor ($p < 0,05$) que os valores obtidos com as outras duas enzimas.

Tabela 6 – Percentual de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos com diferentes enzimas e a atividade de água dos hidrolisados liofilizados.

Enzimas	Tempo de Hidrólise		Atividade de água do Hidrolisado Liofilizado (Aa)
	(minutos)/Percentual de Sólidos Solúveis		
	60 min.	120 min.	120 min.
Papaína	7,11 ^a ±0,74	8,55 ^a ±0,32	0,1408 ^c ±0,0123

Flavourzyme	5,49 ^b ±1,10	6,34 ^b ±0,71	0,2884 ^b ±0,0178
Protamex	7,32 ^a ±1,03	8,07 ^a ±1,55	0,3273 ^a ±0,0147

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base úmida).

Os teores de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos pela hidrólise realizada com as enzimas Papaína e Protamex são semelhantes aos relatados por Oliveira (1991), que, ao determinar as condições ideais da hidrólise da proteína de carne com suco de abacaxi (carne/suco 1:1), obteve um teor de sólidos de 7,6 g/100g. Nota-se um aumento da solubilidade das proteínas durante a hidrólise e isto ocasiona um aumento da concentração dos sólidos solúveis ao longo do tempo, mas não se pode afirmar que sejam diferentes (FONKWE; SINGH, 1996).

A medida da atividade de água é de fundamental importância, para o controle de qualidade dos alimentos, visto que, por meio dela, podem ser previstas reações químicas, enzimáticas e desenvolvimento de microrganismos. A partir do conhecimento da atividade de água, pode-se, também, propor sistemas adequados de embalagens para diferentes produtos alimentícios (FELLOWS, 2006). Os hidrolisados proteicos são altamente perecíveis principalmente devido ao alto conteúdo de proteínas e, portanto, necessitam de metodologias para a sua preservação como secagem por pulverização ou liofilização.

Os valores encontrados para a atividade de água para os hidrolisados liofilizados obtidos da CMD com diferentes enzimas proteolíticas (Tabela 6) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. A Papaína produziu o hidrolisado liofilizado com a menor atividade de água (0,14). Valor de atividade de água, maior que estes resultados, foi encontrado por Kurozawa et al. (2009), que relataram um valor de atividade de água de 0,43 ao estudarem o efeito dos agentes de suporte durante a secagem por pulverização sobre as propriedades físico-químicas de um hidrolisado proteico de carne de frango obtido pela ação da Alcalase® 2.4L.

A Tabela 7 apresenta os resultados de cinzas dos diferentes hidrolisados para os tempos de hidrólise de 60 e 120 minutos.

Tabela 7 – Valores percentuais de cinzas dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango com o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos)/Percentual de Cinzas	
	60 min.	120 min.
Papaína	4,80 ^b ±0,36	4,68 ^b ±0,48
Flavourzyme	7,97 ^a ±1,44	6,76 ^a ±0,99
Protamex	7,24 ^a ±1,69	7,08 ^a ±1,28

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base úmida).

Os resultados apresentados nos primeiros 60 minutos variaram significativamente ($p < 0,05$) e, aos 120 minutos, o hidrolisado obtido com a Papaína

apresentou teores significativamente menores de cinzas ($p < 0,05$), quando comparados aos outros hidrolisados. A maior concentração de cinzas verificada nos hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e com a Protamex (6,76% a 7,97%) é decorrente do ajustamento do pH durante a hidrólise enzimática.

Da mesma forma outros autores obtiveram níveis elevados de cinzas nos experimentos de hidrólise que foram atribuídos ao ajustamento do pH para uma melhor ação das enzimas (DINIZ; MARTIN, 1997; LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999; NEVES et al., 2004; MARTINS et al., 2009).

3.4. Percentual de hidrólise e do rendimento da hidrólise

Os valores dos percentuais de hidrólise após 60 e 120 minutos de processo hidrolítico e os rendimentos dos hidrolisados submetidos ao processo de liofilização estão demonstrados na Tabela 8. Depois de 60 minutos de hidrólise, todos os hidrolisados apresentaram percentuais de hidrólise significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), e a Papaína apresentou o maior percentual. Porém, aos 120 minutos, os hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), enquanto o hidrolisado obtido com a Flavourzyme apresentou diferença significativa das outras enzimas, sendo o de menor percentual (58,20%). Uma justificativa para isto poderia estar relacionada ao fato de a Papaína, uma sulfidrilo protease, ou seja, uma enzima que possui um grupo de enxofre no seu sítio ativo, apresentar baixa especificidade, hidrolisando ligações amida e éster, tanto em peptídeos como em proteínas (LIENER, 1974; REED, 1975).

O rendimento do hidrolisado liofilizado (Tabela 8) obtido aos 60 minutos pela hidrólise com a Flavourzyme diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex, apresentando a mesma tendência dos resultados de percentual de hidrólise que foram obtidos aos 120 minutos. Santos (2011), em um trabalho sobre a produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria pesqueira, encontrou aproximadamente 10% de rendimento utilizando como enzima proteolítica a Neutrase®.

Tabela 8 – Valores do percentual de hidrólise e do rendimento total dos hidrolisados liofilizados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Hidrólise (%)		Rendimento (%)
	60 min.	120 min.	120 min.
Papaína	80,61 ^a ±5,49	86,13 ^a ±2,24	10,55 ^a ±0,04
Flavourzyme	34,83 ^c ±5,79	58,20 ^b ±5,65	4,84 ^b ±0,46
Protamex	67,69 ^b ±4,12	78,03 ^a ±3,61	10,32 ^a ±0,09

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%.

3.5. Aminoácidos dos hidrolisados proteicos

A Tabela 9 apresenta os valores da composição dos aminoácidos dos hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas proteolíticas. O valor nutritivo das proteínas dietéticas é determinado pelo padrão e quantidade de aminoácidos essenciais (XIA et al, 2007).

Tabela 9 – Valores da composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carcaça manualmente desossada de frango (CMD) em comparação com as recomendações da FAO (1985).

Aminoácidos (mg/g)	Enzimas				
	Papaína	Flavourzyme	Protamex	FAO (2-5 anos)	FAO (adultos)
Não essenciais					
Ácido aspártico	73,7	49,6	62,5	-	-
Ácido glutâmico	117,6	92,7	107,7	-	-
Serina	30,1	20,6	25,7	-	-
Glicina	52,3	44,1	46,4	-	-
Arginina	54,8	9,90	46,4	-	-
Treonina	28,1	30,1	26,6	34	5
Alanina	46,2	35,5	43,6	-	-
Prolina	43,9	33,4	37,4	-	-
Essenciais					
Histidina	22,4	19,5	20,6	19	16
Tirosina	24,4	13,6	18,2	-	-
Valina	36,8	23,3	28,9	35	13
Metionina	37,2	16,2	30,6	24*	17*
Cistina	1,00	1,00	1,00	-	-
Isoleucina	34,1	19,3	25,7	28	13
Leucina	63,3	39,5	51,6	66	19
Fenilalanina	39,3	26,2	34,1	63**	19**
Lisina	76,0	57,8	71,8	58	16
Triptofano	-	-	-	11	9

*Dados que somam metionina+cistina. **Dados que somam fenilalanina+tirosina- FAO (1985).

A presença de um ou mais aminoácidos essenciais em quantidades suficientes aumenta o valor nutritivo da proteína (RANGEL et al., 2004). O perfil das proteínas dos diferentes hidrolisados foi verificado e comparado com o da FAO (1985), que estima as necessidades de aminoácidos para crianças e adultos. O perfil de aminoácidos dos hidrolisados de carne manualmente desossada de frango (CMD) obtida pela hidrólise enzimática com a Papaína continha quantidades mais elevada de todos os aminoácidos essenciais, exceto para triptofano (eliminado pela metodologia), quando comparado com a referência da OMS para adultos. Portanto, o hidrolisado que mais se aproxima das quantidades de aminoácidos recomendados pela FAO (1985) é o obtido pela hidrólise com a Papaína.

A análise de aminoácidos realizada por Sun et al. (2010) em um estudo sobre a utilização de um hidrolisado obtido enzimaticamente do resíduo de carne mecanicamente separada de frango, em uma salsicha tipo cantonês, revelou que a glicina foi o aminoácido encontrado em maior quantidade neste tipo de hidrolisado (21,46%), além do ácido glutâmico, prolina, ácido aspártico, treonina e a lisina.

3.6. Análise objetiva da cor dos hidrolisados proteicos

Os valores da determinação da cor dos hidrolisados liofilizados obtidos com diferentes enzimas proteolíticas encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios da determinação de cor dos hidrolisados proteicos de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos pela hidrólise com diferentes enzimas, expressos como L* (luminosidade), a* (índice vermelho) e b* (índice amarelo).

Enzimas	L*	a*	b*
Papaína	76,50 ^b ±0,34	-1,45 ^c ±0,75	26,44 ^a ±2,96
Flavourzyme	79,24 ^a ±0,23	2,98 ^b ±0,07	17,45 ^b ±0,11
Protamex	71,09 ^c ±0,44	5,04 ^a ±0,10	18,72 ^b ±0,14

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%.

Os valores de L* (brilho) e de a* (índice vermelho) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) para as três enzimas utilizadas. O parâmetro de cor vermelha (a*) foi maior com o hidrolisado obtido com a enzima Protamex. Segundo Bueno-Solano et al. (2009), a hidrólise de proteínas produz peptídeos com cor acastanhada que podem gerar uma alteração de cor nos produtos alimentícios nos quais estes hidrolisados são adicionados.

O parâmetro de cor amarela não variou entre os hidrolisados (Tabela 10) obtidos com a Flavourzyme e a Protamex, porém estes diferiram significativamente ($p < 0,05$) do hidrolisado obtido com a Papaína que apresentou maior intensidade para o amarelo. Os hidrolisados liofilizados obtidos apresentaram cores suaves que podem contribuir para sua aceitabilidade, quando utilizados em formulações para as mais variadas finalidades.

Sun et al. (2010) concluíram que o hidrolisado do resíduo de carne mecanicamente separada de frango, obtido por hidrólise enzimática com Pancreatina, pode ser um excelente precursor para a reação de Maillard devido à distribuição do peso molecular, do perfil de aminoácidos e da quantidade de aminoácidos livres.

4. CONCLUSÃO

Os hidrolisados proteicos obtidos da carcaça manualmente desossada (CMD) de frango apresentaram alto conteúdo proteico caracterizando-se como uma matéria-prima promissora na formulação de dietas especiais. A enzima Protamex apresentou o melhor grau de hidrólise seguida da Papaína e da Flavourzyme. Quanto ao percentual de hidrólise e rendimento total, os hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex apresentaram maiores valores que com a Flavourzyme. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle que avaliam o valor nutricional de uma proteína pelos tipos de aminoácidos que a compõem.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Artigos: Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. São Paulo, SP. 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic hydrolysis of food proteins**. Barking: Elsevier Applied Science, 1986. p. 427.

ANSORENA, D.; DE PEÑA, M. P.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Colour evaluation of chorizo de Pamplona, a Spanish dry fermented sausage: Comparison between the CIE L*a*b* and the Hunter Lab systems with illuminants D 65 and C'. **Meat Science**, Barking, v. 46, n. 4, p. 313-318, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00025-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00025-9). PMID:22062314.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso – NEMO**, Maringá, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.017>. PMID:16457999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959. PMID:13671378.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa Nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento

técnico para fixação de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, bovinos e suínos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 abr. 2000. p. 6-7.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 3, p. 671-675, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.029>.

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, p. 937-944, 2003.

CHALAMAIAH, M.; KUMAR, B. D.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, London, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>. PMID:22980905.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G. N.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. Proteinhydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 3, p. 652-657, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.057>.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP, B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 236, n. 1, p. 57-63, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1860-2>.

CHOI, Y. J.; HUR, S.; CHOI, B. D.; KONNO, K.; PARK, J. W. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. C17-C24, 2009. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x). PMID:19200081.

CUNNIFF, P. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995.

DECAGON DEVICES. **AquaLab – Water Activity Meter: operator’s manual**. Version 2.0. Pullman, 2003.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 48, n. 3, p. 191-200, 1997. PMID:9205594.

DONG, Y.; SHENG, G.; FU, J.; WEN, K. Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 12, p. 2033-2039, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2219>.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento dos alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FOH, M. B. K.; KAMARA, M. T.; AMADOU, I.; FOH, B. M.; WENSHUI, X. Chemical and physicochemical properties of *Tilapia (Oreochromis niloticus)* fish protein hydrolysates and concentrate. **International Journal of Biological Chemistry**, Pakistan, v. 5, n. 1, p. 21-36, 2011. <http://dx.doi.org/10.3923/ijbc.2011.21.36>.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically Deboned Turkey residue by Enzymic Hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, v. 6, p. 605-616, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/ UNU Expert Consultation**. Geneve: World Health Organization, 1985.

GONÇALVES, R. M., GONÇALVES, J. R.; GONÇALVES, R. M.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, R. A.; LAGE, M. E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 553-559, 2009.

HENCKEL, P.; VYBERG, M.; THODE, S.; HERMANSEN, S. Assessing the quality of mechanically and manually recovered chicken meat. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie = Food Science and Technology**, London, v. 37, p. 593-601, 2004.

HERPANDI, HUDA, N.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. **International Food Research Journal**, Toronto, v. 19, n. 3, p. 863-867, 2012.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x>.

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Antioxidative and ACE inhibitor activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 1, p. 318-327, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.005>.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 94, n. 3-4, p. 326-333, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.025>.

LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS– LAMIC. **Metodologias do LAMIC**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/web/>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x>.

LIENER, I. E. The sulfhydryl proteases. In: WHITAKER, J. R. (Ed.). **Food related enzymes**. Washington: American Chemistry Society, 1974. p. 202-219. (Advances in Chemistry Series, 136).

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. PMID:14907713.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100012>.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia – enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000100019>.

OGAWA, N. B. P.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430 p.

OLIVEIRA, M. N. **Otimização do processo biotecnológico de hidrólise de carne bovina**. 1991. 193 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

OLIVEIRA, M. S. R.; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 291-302, 2014.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R.; SHAHIRI, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 1, p. 238-242, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>.

RANGEL, A.; SARAIVA, K.; SCHWENGBER, P.; NARCISO, M.; DOMONT, G.; FERREIRA, S.; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 4, p. 491-499, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.023>.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press, 1975. 573 p.

ROSSI, D. M.; FLÔRES, S. H.; VENZKE, J. G.; AYUB, M. A. Z. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 6, p. 879-885, 2009.

SANTOS, M. F. G. **Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – aplicações**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos)–Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche, 2011.

SANTOS, S. D. **Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000500012>.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 2021-2033, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016>.

SUN, W.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, Q.; YANG, B. Effect of Maillard reaction products

derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant, textural and sensory properties of Cantonese sausages. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 2, p. 276-282, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.014>. PMID:20510531.

TRINDADE, M. A.; FELÍCIO, P. E.; CASTILLO, C. J. C. Mechanically separated meat of broilers breeder and white layer spent hens. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 234-239, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000200018>.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: UNICAMP; NEPA, 2011.

XIA, S. H.; WANG, Z.; XU, S. Y. Characteristics of *Bellamya purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 3, p. 1188-1196, 2007.

ABSTRACT: The use of protein hydrolysates, derived from animal and vegetable sources, in specific formulations, is an area of growing interest. The goal of this study was to develop different freeze-dried powder hydrolysates with high protein value, obtained from the enzymatic hydrolysis of manually deboned chicken carcasses (MDC). Before use, they were thawed under refrigeration, and cut into smaller pieces with a stainless steel knife for easier mixing during the hydrolysis time. Three commercial enzymes, Papain®, Flavourzyme® and Protamex® were used. Hydrolysis occurred in a thermostatic bath with controlled temperature, time and pH. The proximal compositions of the raw material and freeze-dried hydrolysates and the water activity of the freeze-dried hydrolysates were determined, and the following analyses to control the hydrolysis were performed: degree of hydrolysis, protein, total solids and ash contents, characterization of the amino acids in the hydrolysates, yield, percent hydrolysis and colour of the hydrolysates. The results were evaluated by the analysis of variance and Tukey's means comparison test. The degree of hydrolysis was highest with Papain, followed by Protamex and Flavourzyme and after 120 minutes of hydrolysis the protein content did not vary significantly ($p > 0.05$) between Papain and Flavourzyme. The amino acid composition showed that the hydrolysate obtained with papain had a composition closer to that recommended by the control authorities. It was concluded that the protein hydrolysates obtained from manually deboned chicken carcasses (MDC) had a high protein content, characterizing them as a promising raw material for the formulation of special diets. **KEYWORDS:** Manually deboned chicken carcass (MDC); Protein hydrolysate; Enzymatic hydrolysis.

CAPÍTULO XI

PRODUÇÃO DE LACASES POR *Marasmiellus palmivorus* VE-111 EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

**Camila Cantele
Roselei Claudete Fontana
Aldo José Pinheiro Dillon**

PRODUÇÃO DE LACASES POR *Marasmiellus palmivorus* VE-111 EM BIORREATOR DE AGITAÇÃO MECÂNICA E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

Camila Cantele

Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Enzimas e Biomassa
Caxias do Sul - RS

Roselei Claudete Fontana

Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Enzimas e Biomassa
Caxias do Sul - RS

Aldo José Pinheiro Dillon

Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Enzimas e Biomassa
Caxias do Sul - RS

RESUMO: A produção de lacases por *Marasmiellus palmivorus* foi avaliada em biorreator de agitação mecânica em diferentes condições de pH: pH não controlado, fixo 5,0; 6,0 e 7,0; e permitido oscilar livremente, sendo controlado após atingir naturalmente pH 5,0; 6,0 e 7,0. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade do complexo enzimático bruto da linhagem *M. palmivorus* VE-111 de descolorir corantes sintéticos. Foram observados valores superiores de lacases nos cultivos de *M. palmivorus* em biorreator de agitação mecânica nas condições de pH livre ($1950,6 \pm 42,7$ U.mL⁻¹), livre - pH 6 ($1901,2 \pm 85,5$ U.mL⁻¹) e em fixo - pH 7 ($1851,8 \pm 0,0$ U.mL⁻¹). Nos testes de descoloração com o extrato enzimático bruto, foram obtidos percentuais de descoloração superiores para os corantes Reactive blue 220 ($93,87 \pm 0,09\%$) e Acid Blue 80 ($89,01 \pm 0,29\%$). Diante dos resultados, evidencia-se que *M. palmivorus* é capaz de secretar elevadas concentrações de enzimas com potencial para aplicações biotecnológicas.

PALAVRAS-CHAVE: lacases, *Marasmiellus palmivorus*, biorreator de agitação mecânica, biorremediação, corantes têxteis.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos da degradação branca (Basidiomycota: Agaricomycotina), são assim denominados devido à capacidade de seu sistema enzimático de degradar a lignina presente na madeira. No complexo enzimático dos fungos da degradação branca estão presentes as fenol-oxidases lacases (Lac), lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP). Em decorrência da complexidade e estrutura polimérica fenilpropanoica aleatória da lignina, enzimas envolvidas na sua decomposição precisam apresentar ampla especificidade para o substrato (ZANIRUN et al., 2015). As lacases (benzenodiol:oxigênio oxidoreductase – E.C. 1.10.3.2) são polifenol oxidases que contêm cobre em seu sítio ativo e pertencem à família das oxidases multicobre. Através da redução de oxigênio molecular a água, essas enzimas são capazes de oxidar uma variedade de substratos aromáticos e não-aromáticos (DING et al., 2016; GEORGIU et al., 2016).

Fungos envolvidos na decomposição da madeira e suas enzimas têm sido extensivamente estudados desde os anos 1980 como fontes de biocatalisadores industriais com aplicações potenciais em indústrias químicas, têxteis, alimentícias e de papel e celulose, bem como em biorremediação e na degradação de contaminantes orgânicos de diferentes processos industriais (LETTERA et al., 2016; LI et al., 2015).

Um dos mais importantes desafios atualmente é desenvolver tecnologias de tratamento e de biorremediação eficientes para o controle e redução da poluição da água (RAMÍREZ-MONTOYA et al., 2015). A descarga de águas residuais provenientes de indústrias de tecido, papel, curtimento de couro, processamento de alimentos, plásticos, cosméticos, borracha, impressão e tingimento em recursos hídricos é uma causa significativa de poluição da água devido à presença de corantes sintéticos (YAGUB et al., 2014). Estes representam uma preocupação ambiental por sua alta visibilidade, recalcitrância e impacto tóxico (MEZOHEGYI et al., 2012). A presença de corantes na água pode afetar as plantas aquáticas, uma vez que os mesmos reduzem a transmissão da luz solar através da água. Além disso, quase todos os corantes sintéticos possuem efeitos tóxicos, carcinogênicos e/ou mutagênicos (SALLEH et al., 2011; VAKILI et al., 2014).

O descarte de resíduos industriais repletos de corantes tóxicos, em conjunto com a resistência de muitos deles às técnicas de remoção físico-químicas – como coagulação, floculação, adsorção, troca iônica, oxidação, flotação, separação por membranas e métodos eletroquímicos (KHLIFI et al., 2010) – evidencia a necessidade de desenvolver métodos biológicos ou enzimáticos para a degradação desses compostos. O uso da biodegradação enzimática tem demonstrado ser potencialmente eficaz no tratamento dessa fonte de poluição por conta da diminuta quantidade de energia necessária e o reduzido impacto sobre os ecossistemas. Lacases, particularmente, têm demonstrado grande aptidão nesta área (BAGEWADI et al., 2017; SHARMA et al., 2015).

Em virtude das diversas aplicações biotecnológicas das lacases, enfatiza-se a necessidade de seu processo de produção ser economicamente viável, o que pode ser obtido por meio da seleção apurada de organismos que as produzam, assim como os meios de cultivo para aperfeiçoar sua produção (PATEL et al., 2014; MORE et al., 2011). Além de sua composição, o pH do meio de cultivo é um importante fator na síntese de lacases, podendo interferir na atividade e estabilidade enzimáticas (COUTO et al., 2002).

Diante da diversidade de microrganismos com potencial para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, poucos são os gêneros estudados para a produção de lacases, destacando-se *Pleurotus* (PATEL et al., 2014), *Trametes* (WANG et al., 2014) e *Pycnoporus* (FOKINA et al., 2015), enquanto poucos trabalhos retratam a espécie *Marasmiellus palmivorus* (PANDIYAN et al., 2014; SINGH et al., 2014). Em face do exposto, faz-se necessário avaliar a potencialidade de espécies que não sejam extensivamente estudadas, as quais podem apresentar características mais promissoras em relação às comumente utilizadas. Os poucos relatos de produção de enzimas lignolíticas por *M. palmivorus* evidenciam que essa

espécie apresenta atividade enzimática elevada, enfatizando a necessidade de investigar os meios de aperfeiçoar as condições de produção enzimática. Nesse contexto, foi avaliada a produção de lacases pela linhagem *M. palmivorus* VE-111 em biorreator de agitação mecânica com distintas condições de pH: pH livre, pH fixo 5,0; 6,0 e 7,0; e cultivos onde o pH foi permitido oscilar até atingir naturalmente os valores de 5,0; 6,0 e 7,0; após, o pH foi controlado nesses valores. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade do complexo enzimático de *M. palmivorus* de descolorir corantes sintéticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e corantes

A linhagem *Marasmiellus palmivorus* VE-111 foi utilizada nos testes de descoloração de corantes, tendo sido obtida a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul, sendo mantida em meio BDA (batata-dextrose-ágar).

Foram utilizados dois corantes pertencentes ao grupo antraquinona: Reactive blue 220 (RB) e Acid blue 80 (AB); e nove corantes da classe azo: Reactive red 198 (RR), Reactive yellow 15 (RY), Acid red 315 (AR), Disperse orange 30 (DO), Dianix yellow Seg (AD), Navy blue S2GRL (AM), Reactive red 4BL (VR), Remazol black B (PR) e Foron Rubine RDGFL (RF).

2.2. Meio de cultivo

O meio de cultivo do inóculo de *M. palmivorus* foi formulado com caldo proveniente de 200 g.L⁻¹ de batata, 50 mL.L⁻¹ de solução mineral (MS 20 ×) (MANDELS; REESE, 1957) e 10 g.L⁻¹ de glicose. Por sua vez, o meio de cultivo do biorreator de agitação mecânica foi composto pelo caldo resultante de 180 g.L⁻¹ de batata, 50 mL.L⁻¹ de solução mineral (MS 20 ×) e 20 g.L⁻¹ de glicose.

A solução de sais descrita por Mandels e Reese (1957) tem a seguinte composição (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 10 g; MgSO₄.7H₂O, 6 g; CO(NH₂)₂, 6 g; CaCl₂, 6 g; FeSO₄.7H₂O, 0,1 g; MnSO₄.H₂O, 0,0312 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,028 g; e CoCl₂.6H₂O, 0,04 g. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 min.

2.3. Condições experimentais

Os cultivos em biorreator (New Brunswick, modelo BioFlo®/CelliGen® 115) foram realizados com 5 L de meio de cultivo. Os biorreatores foram inoculados com 10% (v/v) da cultura, proveniente do inóculo obtido do micélio crescido em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo, iniciado de dois discos

de micélio (\varnothing 1,5 cm) e mantidos a 28°C, em agitação recíproca de 180 rpm, por 96 h.

Durante os cultivos em biorreator, a velocidade da agitação foi variada entre 200 e 800 rpm e a vazão específica de ar entre 0,2 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto). A temperatura foi mantida em 28°C e o pH foi mantido usando a adição automática de NH_4OH (2 mol.L⁻¹) e H_2SO_4 (1 mol.L⁻¹). Amostras foram coletadas até 168 h de cultivo, com intervalos de 24h.

Os cultivos em biorreator de agitação mecânica foram realizados com diferentes valores de pH: pH livre, pH fixo 5,0; 6,0 e 7,0; e cultivos onde o pH foi permitido oscilar até atingir naturalmente os valores de 5,0; 6,0 e 7,0; após, o pH foi controlado nesses valores.

Os extratos foram centrifugados por 20 min, a 4°C e 3220 g. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da atividade enzimática de lacases, bem como para os experimentos de descoloração de corantes sintéticos.

2.4. Análises enzimáticas

As análises de lacases, conforme Wolfenden e Willson (1982), foram realizadas utilizando tampão acetato de sódio (0,2 mol.L⁻¹, pH 5,0) e ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) 5 mmol.L⁻¹ ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 3,6 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) como substrato. A cinética foi analisada por 90 s a 25°C em 420 nm.

2.5. Descoloração de corantes sintéticos

A capacidade das lacases de *M. palmivorus* de degradar os corantes RB, RR, RY, AB, AR, DO, AD, AM, VR, PR e RF foi avaliada em placas de ELISA de 96 poços contendo 300 μL de solução de corante em uma concentração de 0,25 mg.mL⁻¹ e 100 μL de extrato enzimático obtido da condição em pH 7 fixo com uma atividade de lacases de 30, 50 ou 100 U.mL⁻¹.

Os testes foram conduzidos por 24 h à temperatura de 28°C. Os controles consistiram na substituição do extrato enzimático por água destilada. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

A descoloração foi avaliada por meio da alteração na absorvância utilizando espectrofotômetro e comparando os resultados com seus respectivos controles. Foi mensurada a absorvância em 490 nm para os corantes RF, VR, AD, DO e RR; 530 nm para os corantes AM e PR; 570 nm para os corantes RB e AB; e 440 nm para os corantes RY e AR.

A eficiência de descoloração (decolorization efficiency – DE) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $DE (\%) = (A1 - A2) / A1 \times 100$, em que A1 representada a absorvância do controle; A2 representa a absorvância da amostra tratada correspondente; e DE indica a taxa de remoção de cor do corante.

2.6. Análises estatísticas

A partir dos resultados da análise das triplicatas das amostras, foram calculadas a média e o desvio padrão. Alguns resultados foram submetidos ao teste de normalidade Dunkey-Smirnoff e a significância estatística dos dados foi avaliada através de uma análise unidirecional de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$) usando o software GraphPad Prism 5 ® (Graph Pad Software, San Diego, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do pH na produção de lacases por *M. palmivorus* em biorreator de agitação mecânica

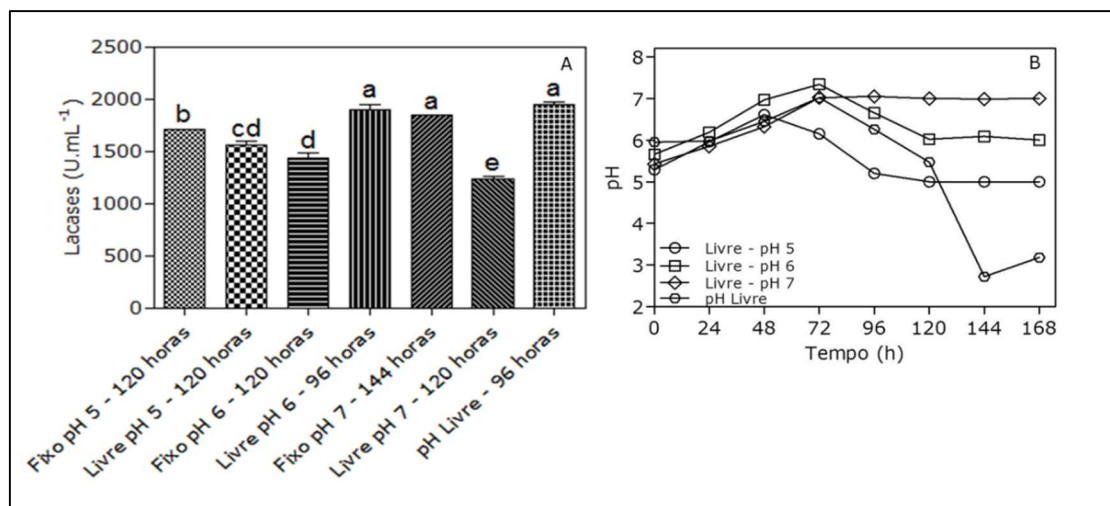
Na Figura 1 estão apresentadas as atividades de lacases e as variações de pH durante o cultivo de *M. palmivorus*. As condições que apresentaram maior atividade de lacases foram: pH livre ($1950,6 \pm 42,7$ U.mL⁻¹) em 96 h, livre - pH 6 ($1901,2 \pm 85,5$ U.mL⁻¹) em 96 h e fixo - pH 7 ($1851,8 \pm 0,0$ U.mL⁻¹) em 144 h. A condição livre - pH 7 apresentou títulos inferiores, sendo observado o pico da atividade ($1234,5 \pm 42,7$ U.mL⁻¹) em 120 h. Entretanto, na condição de pH livre há uma queda acentuada do pH em 144 h. Essa queda é acompanhada pela diminuição da atividade enzimática de lacases, fazendo com que essa condição não seja a mais vantajosa, pois a atividade enzimática não é mantida. Por sua vez, a condição fixo - pH 7 apresentou alta atividade de lacases ($1728,39$ U.mL⁻¹) até 168 h de cultivo, mostrando ser uma condição que favorece a produção e manutenção da atividade enzimática. Destaca-se também que extratos enzimáticos obtidos de cultivos com pH 7 (fixo) apresentam maior estabilidade durante longos períodos de armazenamento (-20°C) para a linhagem *M. palmivorus*.

Comparando a atividade máxima de lacases de *M. palmivorus* VE-111 com as principais espécies utilizadas, aquela apresenta atividade consideravelmente superior: *Trametes versicolor* apresentou atividade máxima de $0,8$ U.mL⁻¹ em 48 h, em meio contendo 0,5% de serragem de carvalho (BERTRAND et al., 2015); Liu et al. (2013) relataram atividade máxima de 72 U.mL⁻¹ por *Pycnoporus* sp. em 6 dias de cultivo em reator airlift; *Cotylidia pannosa* apresentou atividade máxima de $9,3$ U.mL⁻¹ utilizando-se farelo de trigo como substrato (SHARMA et al., 2015). Contudo, microrganismos com atividades de lacases semelhantes ou superiores também são encontrados: Kandasamy et al. (2016) apresentaram um novo isolado de *Hexagonia hirta*, a linhagem MSF2, que alcança uma atividade máxima de lacase de $1944,44$ U.mL⁻¹ utilizando meio de glicose e extrato de levedura otimizado com Cu^{2+} . Atividades ainda mais consideráveis foram atingidas quando houve adição do indutor fenólico 2,5-xilidina. Dessa maneira, destaca-se que a linhagem de *M. palmivorus* é relativamente nova para a produção de lacases, indicando a necessidade de novos estudos a fim de aperfeiçoar as condições de produção enzimática e avaliar a

aplicação em diferentes setores biotecnológicos.

Pandiyan et al. (2014) isolaram e identificaram a linhagem PK-27 de *M. palmivorus*, a qual foi utilizada para a produção de lacases ($69,1 \text{ U.mL}^{-1}$). Além de relatos para a produção de lacases por *M. palmivorus*, essa linhagem é utilizada no pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica (PANDIYAN et al. 2014; SINGH et al. 2014).

Figura 1 - Variação da atividade de lacases (A) e do pH (B) em cultivo de *M. palmivorus* em biorreator de agitação mecânica.



Fonte: os autores.

3.2 Descoloração de corantes sintéticos por extrato enzimático bruto de *M. palmivorus*

Na Tabela 1 são apresentados os percentuais de descoloração dos corantes sintéticos por extrato enzimático bruto após 24 h. Entre os corantes avaliados, foram obtidos percentuais superiores de descoloração para os Reactive blue 220 e Acid Blue 80. Quando foi avaliada a capacidade de descoloração em três concentrações de lacases de *M. palmivorus*, ($30, 50$ e 100 U.mL^{-1}) para os diferentes corantes, os percentuais de descoloração foram semelhantes, indicando que após 24 h o máximo de descoloração é atingido, independentemente da atividade enzimática aplicada.

Para os demais corantes não foi detectada redução de cor ou esta apresentou percentuais ínfimos. Ambos corantes, RB e AB, pertencem à classe antraquinona, sugerindo que nenhuma das isoformas foi eficaz no rompimento da ligação dupla de nitrogênio presente nos corantes azo testados neste trabalho. Diferentemente, Ashrafi et al. (2013) relataram que quase todos os corantes azo e antraquinona selecionados de diferentes grupos de corantes industriais reativos, ácidos, dispersos e diretos foram eficientemente descoloridos, embora não na mesma extensão, utilizando a lacase purificada de *Paraconiothyrium variabile* após um período de 3 h de incubação. Os corantes azo podem ser classificados em monoazo, diazo ou triazo, dependendo do número de ligações $\text{N}=\text{N}$ presentes, enquanto os corantes

antraquinona são constituídos por grupos carbonila em associação com um sistema conjugado de dois anéis de benzeno. Na maior parte dos casos, os corantes azo são identificados como recalcitrantes, enquanto as antraquinonas são reconhecidas como substratos fáceis para a oxidação de lacases (SARATALE et al., 2011; ZENG et al., 2011).

Nesse sentido, alguns trabalhos concluíram que lacases não são capazes de oxidar alguns corantes porque estes são moléculas muito grandes para acessar o sítio ativo da enzima ou porque têm um potencial redox particularmente elevado (BIBI; BHATT, 2012; CAMARERO et al., 2005).

Tabela 1 – Descoloração de corantes sintéticos por extrato enzimático bruto de *M. palmivorus*.

Corantes	Redução (%) 24h		
	VE-111 (30 U.mL ⁻¹)	VE-111 (50 U.mL ⁻¹)	VE-111 (100 U.mL ⁻¹)
Reactive blue 220	95,5±0,3	95,8±0,1	93,9±0,3
Reactive red 198	0,0±0,0	9,0±0,5	3,5±1,6
Reactive yellow 315	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Acid red 315	1,0±0,0	2,5±0,0	0,0±0,0
Acid blue 80	90,9±0,5	89,2±2,7	88,3±0,2
Disperse orange 30	3,0±0,4	3,8±0,0	2,9±0,0
Dianix yellow Seg	4,9±0,0	8,6±0,0	7,4±1,79
Navy blue S2GRL	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Reactive red 4BL	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Remazol black B	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Foron Rubine RDGFL	0,0±0,0	9,0±0,5	3,5±1,6

Fonte:os autores.

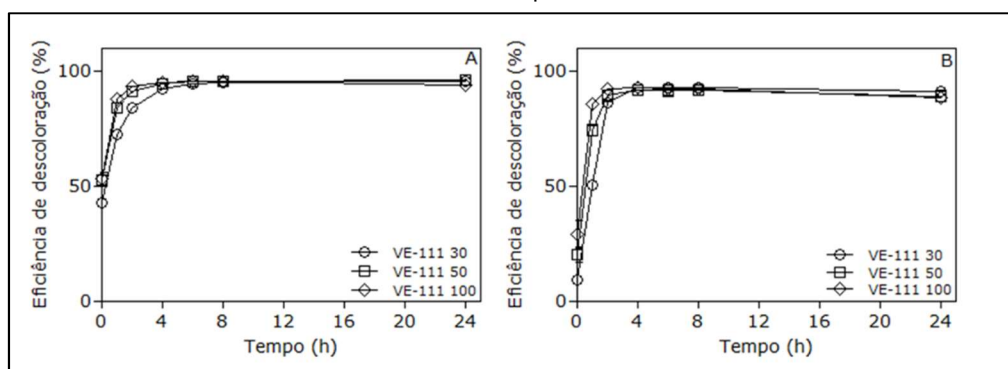
Nota: os valores correspondem à média de três repetições ± desvio padrão; os resultados foram obtidos após 24 h de processo.

Como foram utilizados sobrenadantes de extratos enzimáticos brutos para realizar os testes de descoloração, é possível que outras enzimas além das lacases estivessem presentes e envolvidas na descoloração dos corantes. A opção pelo uso de lacase bruta, em alguns casos, pode ser economicamente viável e rentável para a aplicação prática, tendo em vista que baixas cargas enzimáticas foram suficientes para a descoloração dos corantes RB e AB.

Na Figura 2 estão apresentados os percentuais de descoloração dos corantes Reactive blue 220 (A) e Acid Blue 80 (B) por extrato enzimático bruto de *M. palmivorus*. É possível observar que quando testadas diferentes quantidades de

lacases, a descoloração apresentou percentuais semelhantes, ou seja, em 24 h não há relação direta entre a atividade enzimática e a descoloração (Tabela 1). Entretanto, sabe-se que quando avaliada em tempos mais curtos, a atividade está inversamente relacionada ao tempo: quanto maior a atividade enzimática de lacase, menor será o tempo necessário para ocorrer a remoção da cor (Figura 2). Em apenas 2 h os índices de descoloração ultrapassaram os 80% para os corantes RB e AB, indicando que não há a necessidade de 24 h de descoloração, o que corrobora a aplicação das enzimas em um processo industrial, devido à efetividade e à agilidade do processo.

Figura 2 – Descoloração dos corantes Reactive Blue 220 (A) e Acid Blue 80 (B) por extrato enzimático bruto de *M. palmivorus* em 24 h.



Fonte: os autores.

Destaca-se que o *M. palmivorus* apresenta elevada produção de lacases em condições controladas de pH, apresentando a necessidade do controle deste parâmetro. O uso do extrato enzimático obtido de *M. palmivorus* resultou em considerável descoloração dos corantes RB e AB; entretanto, para outros corantes avaliados, não houve descoloração ou essa foi desprezível. Dessa forma, esses corantes devem ser novamente avaliados, visto que normalmente estão presentes em um mesmo efluente.

A degradação de um dado corante depende da sua estrutura, dos seus grupos cromóforos, da temperatura e do pH do processo de descoloração e do potencial redox do biocatalisador e do corante, além de poder ser otimizada pelo uso de mediadores, substratos facilmente oxidáveis que podem atuar como intermediários redox entre o sítio-ativo da enzima e um substrato não fenólico (ZILLE et al., 2004). Portanto, variações nesses parâmetros podem ser testadas, visando obter resultados mais satisfatórios de descoloração.

4. CONCLUSÃO

A busca por novas linhagens produtoras de lacases é promissora, tendo em vista a grande variedade de espécies já descritas, algumas extensivamente estudadas e outras com apenas alguns trabalhos. O isolado *M. palmivorus* apresenta elevada produção de lacases, destacando que outros parâmetros de produção

podem ser testados para elevá-la ainda mais. Foi possível observar que o pH influencia consideravelmente neste processo, permitindo uma manutenção da atividade mais efetiva. O extrato enzimático bruto mostrou-se eficaz em descolorir alguns corantes sintéticos utilizados industrialmente, corroborando a potencial aplicação de *M. palmivorus* e seu complexo enzimático em processos de biorremediação. Diante do exposto, evidencia-se que esses processos poderiam ser utilizados para fins comerciais na detoxificação de efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

ASHRAFI, S. D. et al. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variable*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p.173–181, 2013.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z; 2017. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017. <http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.00>

BERTRAND, B. et al. Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p.339–347, 2015.

BIBI, I.; BHATTI, H.N. Biodecolorization of reactive black 5 by laccase mediator system. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p.7464–7471, 2012.

CAMARERO, S et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.1775–1784, 2005.

COUTO, S.R. et al. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. **Process Biochemistry**, v. 38, p.249–255, 2002.

DING, H. et al. Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 307, p.350–358, 2016.

FOKINA, O. et al. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 175, p.445–453, 2015.

GEORGIU, R.P. et al. Decolorization of melanoidins from simulated and industrial molasses effluents by immobilized laccase. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p.1322–1331, 2016.

HE, F. et al. Characterization of laccase isoenzymes from the white-rot fungus *Ganoderma sp.En3* and synergistic action of isoenzymes for dye decolorization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, p.2265–2279, 2014.

KANDASAMY, S. et al. High Level Secretion of Laccase (LccH) from a Newly Isolated White-Rot Basidiomycete, *Hexagonia hirta* MSF2. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00707

KHLIFI, R. et al. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p.802–808, 2010.

LETTERA, V. et al. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 196, p.1272–1278, 2016.

LI, H. et al. Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p.227–233, 2015.

LIU, J. et al. Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. **Journal of Cleaner Production**, v. 39, p.154–160, 2013.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, p.269–278, 1957.

MEZOHEGYI, G. et al. Towards advanced aqueous dye removal processes: a short review on the versatile role of activated carbon. **Journal of Environmental Management**, v. 102, p.148–164, 2012.

MORE, S.S. et al. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus sp.* **Enzyme Research**, p.1–7, 2011. DOI:10.4061/2011/248735

PANDIYAN, K. et al. Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.55–64, 2014.

PATEL, H. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. **Biotech.**, v. 4, p.77–84, 2014.

RAMÍREZ-MONTOYA, L. A. et al. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p.30–37, 2015.

SALLEH, M. A. M. et al. Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: a comprehensive review. **Desalination**, v. 280, p.1–13, 2011.

SARATALE, R.G. et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. **Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineering**, v. 42, p.138–157, 2011.

SHARMA, D. et al. A novel laccase from newly isolated *Cotylidia pannosa* and its application in decolorization of synthetic dyes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p.661–666, 2015.

SINGH, S. et al. A. Screening and optimization of pretreatments for *Parthenium hysterophorus* as feedstock for alcoholic biofuels. **Applied Energy**, v. 129, p.195–206, 2014.

VAKILI, M. et al. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: a review. **Carbohydrate Polymers**, 113, p.115–130, 2014.

WANG, F. et al. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. **Bioresource Technology**, v. 166, p.602–605, 2014.

WOLFENDEN, B.S.; WILLSON, R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 2, p.805–812, 1982.

YAGUB, M. T. et al. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p.172–184, 2014.

YANG, X. Q. et al. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, v. 44, p.1185–1189, 2009.

ZANIRUN, Z. et al. Enhancement of fermentable sugars production from oil palm empty fruit bunch by ligninolytic enzymes mediator system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p.13–20, 2015.

ZENG, X. et al. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly

isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p.517–525, 2011.

ZILLE, A. et al. Predicting dye biodegradation from redox potentials. **Biotechnology Progress**, v. 20, p.1588–1592, 2004.

ABSTRACT: Production of laccase by *Marasmiellus palmivorus* in stirred tank reactor was assessed in various pH conditions: uncontrolled (free) pH, fixed at 5.0, 6.0 and 7.0; and controlled after reaching pH 5.0, 6.0 and 7.0. Additionally, decolorization efficiency of *M. palmivorus* VE-111 crude enzyme extract was evaluated using synthetic dyes. The highest laccase titers were observed for *M. palmivorus* stirred tank reactor culture grown in the following production conditions: uncontrolled pH ($1950.6 \pm 42.7 \text{ U.mL}^{-1}$), free - pH 6 ($1901.2 \pm 85.5 \text{ U.mL}^{-1}$) and fixed - pH 7 ($1851.8 \pm 0.0 \text{ U.mL}^{-1}$). As for the decolorization assays, the greatest decolorization percentages were obtained for the dyes Reactive blue 220 ($93.87 \pm 0.09\%$) and Acid Blue 80 ($89.01 \pm 0.29\%$). According to these results, it becomes evident that *M. palmivorus* is capable of secreting a highly concentrated enzyme extract, with potential biotechnological applications.

KEYWORDS: laccase, *Marasmiellus palmivorus*, stirred tank reactor, bioremediation, textile dyes.

CAPÍTULO XII

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO cfDNA ATRAVÉS DE qPCR COM OS PRIMERS L1PA2

**Alessandra Koehler
Danieli Rosane Dallemole
Alexandre Rieger**

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO cfDNA ATRAVÉS DE qPCR COM OS PRIMERS L1PA2

Alessandra Koehler

Universidade de Santa Cruz do Sul
Santa Cruz do Sul – RS

Danieli Rosane Dallemole

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre – RS

Alexandre Rieger

Universidade de Santa Cruz do Sul
Santa Cruz do Sul – RS

RESUMO: A presença de DNA livre de células (cfDNA) no plasma foi constatada em 1948, desde então, explora-se a sua utilização como um biomarcador de processos patológicos, pois o cfDNA origina-se, principalmente, da apoptose, gerando fragmentos curtos, ou da necrose, gerando fragmentos longos. A diferença nos tamanhos de fragmentos pode ser utilizada para avaliar a integridade do cfDNA (int-cfDNA). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver um método de determinação da int-cfDNA em amostras de 14 indivíduos saudáveis, através de qPCR utilizando os primers L1PA2. Duas etapas de centrifugação foram executadas para obtenção do plasma, do qual isolou-se o cfDNA com um método de colunas. O cfDNA isolado foi submetido à qPCR utilizando-se dois conjuntos de primers L1PA2, um para fragmentos curtos de 90pb e outro para fragmentos longos de 222pb. Para a quantificação foram feitas duas curvas padrão a partir de um pool de cfDNA de 10 amostras de indivíduos normais. A eficiência da curva de L1PA2 90pb foi de 100%, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,98 e para L1PA2 222pb foi de 99%, com $r^2=0,97$. A int-cfDNA média foi de $0,64\pm 0,28$; IC95%(0,45-0,83). Os resultados apontam que a qPCR com os primers L1PA2 pode ser utilizada na investigação de estados patológicos relacionadas com morte celular. No entanto, é necessário explorar a relação da integridade com os processos de origem desses fragmentos para determinar os limites entre o estado normal e alterado, e com isso validar a metodologia de biópsia líquida para o diagnóstico e prognóstico em situações patológicas.

PALAVRAS-CHAVE: cfDNA, integridade do cfDNA, biópsia líquida, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

O DNA circulante livre de células (cfDNA) foi descoberto em 1948 por Mandel e Métais, que o detectaram no plasma humano tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes (THIERRY et al., 2016). Em 1966, foi demonstrada a presença de cfDNA no plasma e soro sanguíneos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Esse DNA também foi encontrado em outras doenças relacionadas com danificação de tecidos, como hepatite, carcinoma metastático e tuberculose miliar. Assim, os

autores especularam que o cfDNA poderia ter origem em células de tecidos que sofrem destruição (TAN et al., 1966).

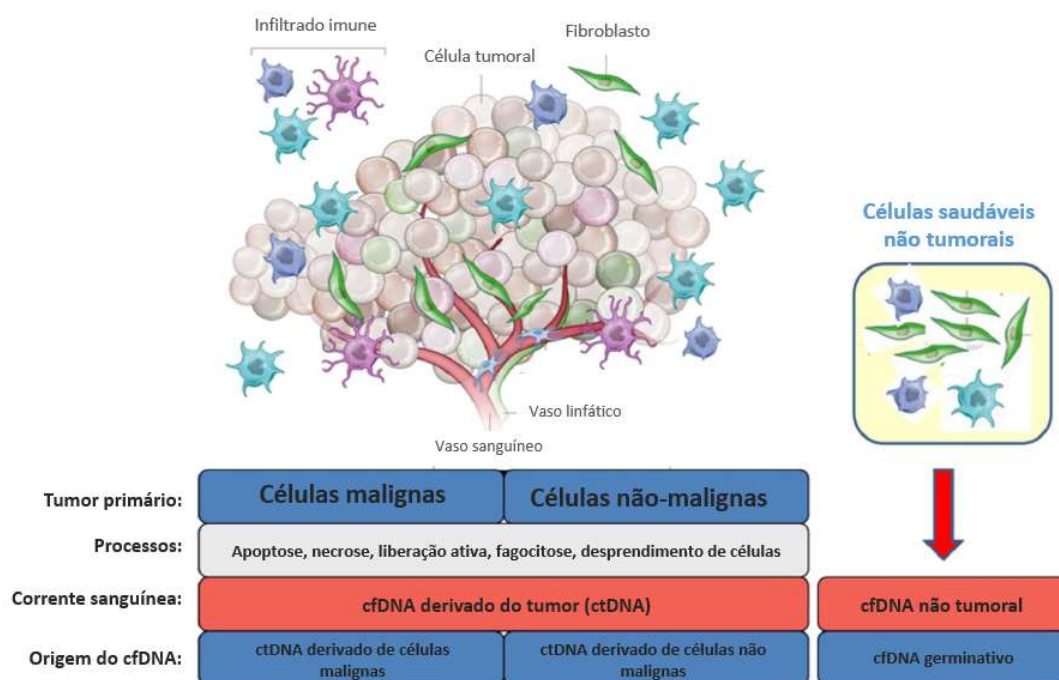
Já em 1977, foi evidenciada a presença de níveis elevados de cfDNA no soro, comparado com os níveis em indivíduos saudáveis, em pacientes que apresentavam diversos tipos de câncer (LEON et al., 1977). Todos os pacientes que apresentaram altos valores de DNA circulante possuíam câncer metastático. Além disso, em todos os indivíduos que tiveram bons resultados com o tratamento de radioterapia, a quantidade de cfDNA no soro decresceu. Esse foi o primeiro trabalho que demonstrou a possível aplicação do cfDNA como biomarcador em doenças humanas.

Posteriormente, inúmeros trabalhos investigaram a utilização do cfDNA em diversas situações: diagnóstico pré-natal, infecções virais e bacterianas, fisiologia do exercício, rejeição tecidual, fator prognóstico em casos de AVC, entre outras (TYNAN et al., 2011; OUTINEN et al., 2012; HUTTUNEN et al., 2011; HA et al., 2011; BREITBACH et al., 2012; VLAMINCK et al., 2014; BUSTAMANTE et al., 2016). Apesar disso, o seu uso em estudos acerca de diferentes tipos de câncer sempre foi prevalente. Mais recentemente, foram feitos muitos avanços nas pesquisas acerca das possíveis aplicações do cfDNA. Atualmente, diversos trabalhos exploram o potencial de detectar mutações no DNA circulante que são provenientes do tumor, aumentando seu poder diagnóstico e prognóstico (SUHAIMI et al., 2015; PESTRIN et al., 2015; THIERRY et al., 2014).

A partir dessas aplicações, surgiu o termo “biópsia líquida”, ou seja, é possível avaliar mutações associadas a tumores apenas com uma coleta de sangue, sem ser necessária uma biópsia tecidual (CROWLEY et al., 2013). Esse conceito já existe desde 1994, pela realização de um trabalho que encontrou mutações específicas de células tumorais no cfDNA. Entretanto, o termo passou a ser utilizado apenas mais recentemente, com o avanço das pesquisas acerca dessa aplicação.

Apesar de ser muito estudado, ainda não há um consenso sobre a origem do cfDNA. Existem muitos trabalhos avaliando suas aplicações, entretanto poucos estudos possuem como foco as suas propriedades biológicas. Algumas possibilidades são sua liberação passiva na morte celular, seja por apoptose ou necrose, ou sua liberação ativa realizada pelas células (Figura 1). Na morte celular, a hipótese é que esses fragmentos seriam liberados quando uma nuclease quebra o DNA genômico. Há um consenso de que fragmentos possivelmente liberados por apoptose são menores que 200 pb, enquanto os liberados por outros processos de morte celular, como a necrose em situações patológicas, são maiores que 250 pb (JIANG, LO, 2016; MA et al., 2017).

Figura 1 - Origem dos fragmentos de cfDNA (adaptado de Thierry et al., 2016)



Recentemente, foi demonstrado que o cfDNA liberado por cultura celular, pode apresentar fragmentos de aproximadamente 2000 pb (BRONKHORST et al., 2016). Comparando com outros trabalhos, esse tamanho não se relaciona com apoptose ou necrose. Assim, os autores sugeriram que esses fragmentos de cfDNA estavam sendo liberados ativamente pelas células, possivelmente associado a um complexo proteico. Alguns outros trabalhos já exploraram também a liberação ativa do cfDNA por meio de microvesículas ou exossomos (THIERRY et al., 2016).

Apesar destas evidências de diferentes origens do cfDNA, a hipótese de sua liberação a partir de células apoptóticas ou necróticas e a diferença de tamanho entre os fragmentos traz a possibilidade verificar sua integridade. A aplicação prática disso é o fato de que, em situações patológicas, assume-se que a necrose está mais presente que a apoptose. Assim, espera-se que nestes casos a integridade do cfDNA seja maior, ou seja, predominem fragmentos longos. Esse método é muito promissor em casos de câncer, para diferenciar tumores benignos e malignos, avaliar o prognóstico e acompanhar a resposta ao tratamento. Além disso, também é utilizado em outras situações patológicas e em diagnóstico pré-natal (YU, GU, JU, 2014).

Um dos primeiros trabalhos a avaliar a integridade do cfDNA utilizou pacientes com câncer ginecológico e de mama (WANG et al., 2003). Neste trabalho, encontrou-se que o índice de integridade do cfDNA dos pacientes com câncer foi significativamente maior que aquele calculado para o grupo controle, sugerindo que uma integridade maior está relacionada com essa situação patológica. A amplificação de dois tamanhos diferentes da sequência repetitiva ALU, um de 115 pb e outro de 247 pb utilizando qPCR também foi utilizada para calcular a integridade do cfDNA em pacientes de câncer de colorretal (UMETANI et al., 2006). Neste trabalho, novamente foi calculada uma integridade significativamente maior nos

pacientes com câncer.

Posteriormente, diversos outros trabalhos utilizaram uma metodologia semelhante, com os mesmos primers citados acima, para avaliar a integridade do cfDNA em diversos tipos de situações patológicas com malignidade: câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de mama, carcinoma hepatocelular e efusão pleural maligna (FENG et al., 2013; DELGADO et al., 2013; FAWZY et al., 2016; HAO et al., 2014; IQBAL et al., 2015; HUANG et al., 2016; SRIRAM et al., 2012). Em todos estes trabalhos, verificou-se que a integridade do cfDNA, isoladamente ou em conjunto com outras análises, possui potencial para ser uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico em diferentes condições patológicas.

Apesar de diversos trabalhos recentes terem encontrado uma integridade maior do cfDNA em amostras de pacientes com câncer, há algumas controvérsias em relação à essa técnica. Elas se devem principalmente à falta de uma padronização no processamento inicial das amostras, seja na coleta ou no isolamento do cfDNA. Isso leva a resultados contraditórios, prejudicando o valor diagnóstico e prognóstico da técnica. De fato, uma revisão publicada em 2016 evidenciou que alguns trabalhos encontraram que o cfDNA derivado de tumores é altamente fragmentado, composto por fragmentos menores que 145 pb. O padrão de fragmentação do cfDNA pode ser uma espécie de “assinatura” que indica o tecido de origem desse DNA circulante. Essa fragmentação também indica que ocorreu degradação do cfDNA após sua liberação, uma vez que espera-se que, quando liberado por necrose, seu tamanho seja maior do que quando originado por apoptose (THIERRY et al., 2016).

Ainda que os dados encontrados na literatura sejam contraditórios, é importante desenvolver trabalhos que avaliem a integridade do cfDNA, a fim de elucidar melhor sua estrutura, auxiliando a esclarecer suas origens biológicas e a aprimorar seu potencial diagnóstico e prognóstico. Nesse sentido, é importante a utilização de técnicas eficientes que permitam essa avaliação. Além dos primers para sequências ALU citados acima, outros também podem ser utilizados para quantificar e avaliar a integridade do cfDNA, entre eles os desenvolvidos por Breitbach et al. (2014). Estes primers, nomeados L1PA2, amplificam as sequências com o mesmo nome, que são uma subfamília de sequências repetitivas LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements). Um dos pares amplifica fragmentos de 90 pb, enquanto o outro amplifica fragmentos de 222 pb. Ambos os pares apresentaram uma boa eficiência na qPCR, entretanto, foram utilizados apenas para quantificação. Portanto, no presente estudo, o objetivo foi testar um método de avaliação da integridade do cfDNA utilizando estes pares de primers, para um possível uso posterior em biópsias líquidas.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras, coleta do sangue e separação do plasma

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes de 14 voluntários saudáveis. O sangue foi coletado por punção venosa em tubos contendo EDTA. Após, obteve-se o plasma por duas etapas sucessivas de centrifugação. A primeira foi realizada em até 2 horas após a coleta, a 1.500g por 15 minutos. A segunda foi realizada a 15.000g por 15 minutos. O sobrenadante das amostras foi transferido para microtubos e armazenado a -20 °C até ser realizada a extração do cfDNA.

2.2. Extração e quantificação do cfDNA

A extração do cfDNA foi realizada a partir de 200 µL de amostra de plasma. Para isso, utilizou-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (©Qiagen) seguindo as instruções do fabricante, apenas sendo modificada a etapa final (eluição com 50 µL de tampão TE). O cfDNA extraído foi quantificado no fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific®), cujo resultado foi expresso em ng/mL. Após, as amostras foram armazenadas a -20 °C até a realização da qPCR.

2.3. PCR em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada com os seguintes pares de primers: L1PA2 90 pb senso 5'-TGCCGCAATAAACATACGTG-3' e antisenso 5'- GACCCAGCCATCCCATTAC-3'; L1PA2 222 pb senso 5'- TGCCGCAATAAACATACGTG-3' e antisenso 5'- AACAACAGGTGCTGGAGAGG-3' (BREITBACH et al., 2014).

Todas as reações foram realizadas no equipamento DTprime (DT-96) Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology®). Em cada reação, foram adicionados 10 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (2X) (Applied Biosystems®), 0,3 µM do primer senso, 0,3 µM do primer antisenso e 5 µL de amostra de cfDNA, completando com água ultrapura até volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo a 50 °C por 2 minutos, seguido de um ciclo a 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos com duas etapas sucessivas de 60 °C por 30 segundos cada. A curva de dissociação para a confirmação da amplificação seguiu 100 ciclos com variação de 0,5°C de temperatura por ciclo de 15 segundos no intervalo de 90 °C a 40 °C.

Os resultados da amplificação também foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, visualizado em transiluminador.

2.4. Curva de quantificação e eficiência da qPCR

Para a quantificação das sequências L1PA2 curtas e longas e posterior cálculo do índice de integridade, foram feitas duas curvas padrão, cada uma para um tamanho de sequência. As curvas foram realizadas com diluição seriada de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64 a partir de um pool de cfDNA feito com 10 amostras de indivíduos saudáveis. Assim, considerou-se que o pool de amostras não diluído representava 100%, enquanto o diluído a 1/2 representava 50% e assim sucessivamente

As curvas de eficiência da reação de qPCR foram feitas com o software Real Time_PCR v7.7 (<http://www.dna-technology.ru/eng/support/>), considerando o Ct (threshold cycle) e o logaritmo na base 10 da concentração das sequências L1PA2 90 pb e 222 pb presentes no pool de amostras.

2.5. Cálculo do índice de integridade do cfDNA

O índice de integridade do cfDNA (int-cfDNA) é calculado pela razão entre a concentração de fragmentos de cfDNA longos e curtos (UMETANI et al., 2006). No presente trabalho, isso foi obtido pela razão entre a concentração dos amplicons das sequências L1PA2 222 pb e L1PA2 90 pb, sendo utilizado o software GraphPad Prism 6 (©GraphPad Software).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação do cfDNA foi realizada por meio de fluorimetria, método mais adequado para pequenas quantidades de DNA, que é o caso do DNA circulante livre de células. O resultado das quantificações foi em média $2,26 \pm 0,22$ ng/ μ L, variando de um mínimo de 1,92 até 2,56 ng/ μ L, valores que são esperados em relação ao cfDNA. Entretanto, isso pode variar consideravelmente dependendo do método de isolamento utilizado e também do método de quantificação (BRONKHORST et al., 2015). No caso deste estudo, utilizou-se um kit comercial baseado em colunas, o que sabidamente reduz o rendimento de cfDNA isolado. Entretanto, este é o método de extração mais utilizado nesse tipo de trabalho.

Em relação à eficiência da qPCR, os valores obtidos estão de acordo com as diretrizes do MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (BUSTIN et al., 2009). Para L1PA2 90 pb, a eficiência da qPCR foi calculada em 100%, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9808 (Figura 2). Já para L1PA2 222 pb, a eficiência calculada foi de 99%, com r^2 igual a 0,9739 (Figura 3). De acordo com as orientações acima citadas, a eficiência da qPCR deve ser determinada por meio de curvas de calibração, pois isso garante a sensibilidade analítica e a robustez do ensaio.

Figura 2 – Curva de eficiência de L1PA2 90 pb

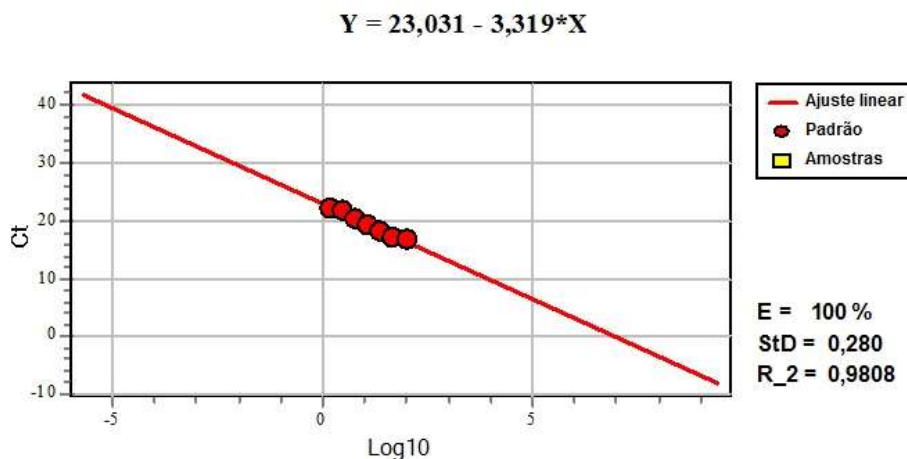
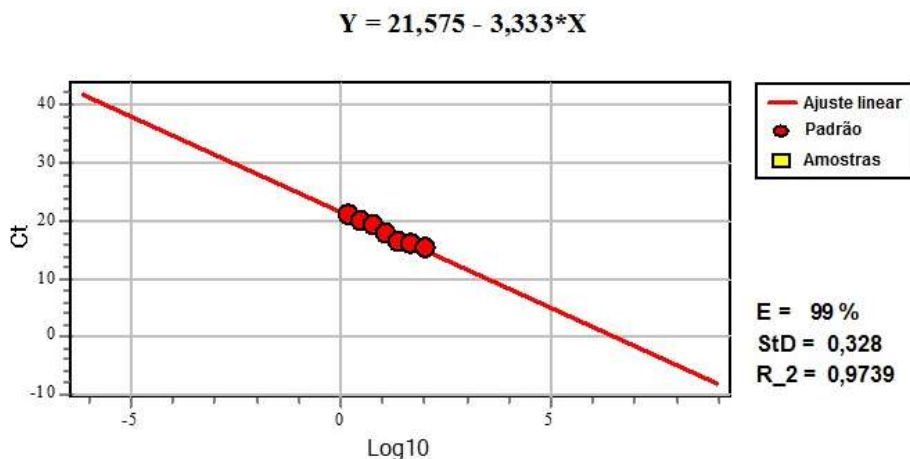


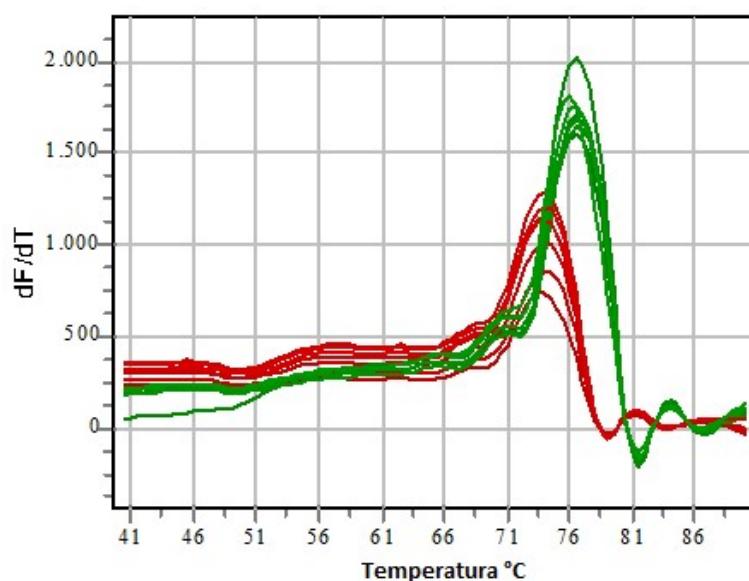
Figura 3 – Curva de eficiência de L1PA2 222 pb



A int-cfDNA calculada teve uma média de $0,64 \pm 0,28$; IC95%(0,45-0,83). Esse valor está de acordo com aquele encontrado para o grupo controle em outros trabalhos que utilizaram método semelhante para cálculo da integridade (TUG et al., 2014; BREITBACH et al., 2014). Entretanto, esses valores podem apresentar grande variação dependendo da forma de coleta, do método de isolamento, dos primers e do cálculo utilizados. De fato, o índice de integridade varia entre diferentes tipos de câncer e até mesmo entre diferentes indivíduos (YU, GU, JU, 2014; THIERRY et al., 2016).

A Figura 4 mostra as curvas de melting geradas a partir da amplificação das amostras das curvas padrão, evidenciando que os fragmentos de 90 pb e 222 pb possuem diferentes temperaturas de melting (T_m). Para 90 pb, a T_m média foi de $74,1 \pm 0,2$ °C. Para 222 pb, a T_m média foi de $76,6 \pm 0,3$ °C.

Figura 4 - Curvas de melting dos fragmentos curtos (vermelho) e longos (verde)



Como diferencial da técnica utilizada no presente trabalho, pode-se citar a preparação de um pool de cfDNA dos controles para realizar a quantificação das sequências L1PA2 curtas e longas e posterior cálculo de integridade. Em outros estudos, isso foi feito por meio de diluições seriadas de apenas uma amostra de controle (UMETANI et al., 2006) ou por meio de curva padrão externa obtida comercialmente (FATOUROS et al., 2010; FAWZY et al., 2016). No estudo de Szepechinski et al. (2016) foi realizado um pool de amostras de linfócitos obtidas de doadores saudáveis. Entretanto, no presente trabalho, esse pool foi feito com amostras de cfDNA extraídas dos indivíduos controle. A vantagem é que isso reduz as variações intrínsecas da técnica, pois todas as amostras estão submetidas às mesmas condições de extração e reação de qPCR.

Porém, a realização dessa técnica apresenta limitações. Entre elas pode-se citar a influência do processamento inicial das amostras nos resultados finais obtidos. Além disso, a ausência de uma padronização nos métodos utilizados para o cálculo da integridade em trabalhos diferentes dificulta a avaliação dos valores encontrados. Assim, coloca-se como perspectiva futura realizar um estudo incluindo amostras de pacientes oncológicos, para verificar qual será o valor de integridade encontrado e compará-lo com os controles. Isso auxiliará na maior validação da técnica e, através de padronizações futuras, permitirá que seja utilizada como ferramenta de diagnóstico e prognóstico através das biópsias líquidas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos percebe-se que a técnica pode ser aplicada para determinar a integridade do cfDNA, sendo essa uma importante ferramenta de triagem nos casos com suspeita de processos oncológicos, podendo ser incluída em

exames de rotina. No entanto, apenas o resultado da integridade não é capaz de prever se há ou não a proliferação tumoral, pois outros estados fisiológicos e patológicos podem promover a morte celular por necrose e alterar esse resultado.

Além disso, é necessário explorar a relação entre esses processos oncológicos, a fim de determinar um limite entre estado normal e alterado, uma vez que vários estudos apontam que em indivíduos saudáveis o valor da int-cfDNA é mais baixo do que em doentes, mas não há um consenso desses valores. Outra etapa importante para fazer do cfDNA um biomarcador, é padronizar todas as etapas de obtenção do plasma, extração e amplificação do cfDNA, pois a fonte de variação de valores entre os estudos pode ser devido as etapas de preparação o que afeta a reprodutibilidade do teste.

REFERÊNCIAS

BREITBACH, S. et al. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 2, p. 119-130, 2014.

BREITBACH, S. et al. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. **Journal of applied physiology** (Bethesda, Md. : 1985), v. 117, n. 2, p. 119-30, 2014.

BRONKHORST, A. J. et al. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 1, p. 157-165, 2016.

BUSTAMANTE, A. et al. Circulating cell-free DNA is a predictor of short-term neurological outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis. **Journal of Circulating Biomarkers**, v. 3, p.1849454416668791, 2016.

CROWLEY, E. et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 10, n. 8, p. 472-84, 2013.

DE VLAMINCK, I. et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 241, p. 241ra77-241ra77, 2014.

DELGADO, P. O. et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. **Tumor Biology**, v. 34, n. 2, p. 983-986, 2013.

FAWZY, A. et al. Quantitative analysis of plasma cell-free DNA and its DNA integrity in patients with metastatic prostate cancer using ALU sequence. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 28, n. 4, p. 235-242, 2016.

FENG, J. et al. Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen. **International Urology and Nephrology**, v. 45, n. 4, p. 1023-1028, 2013.

HA, T. T. N. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25969, 2011.

HAO, T. B. et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v.111, n. 8, p. 1482-1489, 2014.

HUANG, A. et al. Plasma Circulating Cell-free DNA Integrity as a Promising Biomarker for Diagnosis and Surveillance in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 13, p. 1798, 2016.

HUTTUNEN, R. et al. Fatal Outcome in Bacteremia is Characterized by High Plasma Cell Free DNA Concentration and Apoptotic DNA Fragmentation: A Prospective Cohort Study. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21700, 2011.

IQBAL, S. et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. **Springerplus**, v. 4, n. 1, p. 265, 2015.

LEON, S. A. et al. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. **Cancer Research**, v. 37, n. 3, p. 646–650, 1977.

OUTINEN, T. K. et al. Plasma Cell-Free DNA Levels Are Elevated in Acute Puumala Hantavirus Infection. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31455, 2012.

PESTRIN, M. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 4, p. 749-757, 2015.

SRIRAM, K. B. et al. Pleural fluid cell-free DNA integrity index to identify cytologically negative malignant pleural effusions including mesotheliomas. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 428, 2012.

SUHAIMI, N-A. M. et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 4, p. 850-860, 2015.

TAN, E. M. et al. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 11, p. 1732–1740, nov. 1966.

THIERRY, A. R. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. **Nature Medicine**, v. 20, n. 4, p. 430–5, 23 mar. 2014.

THIERRY, A. R. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 3, p. 347–376, set. 2016.

TYNAN, J. A. et al. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 251.e1-251.e6, 2011.

UMETANI, N. et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1062–1069, 2006.

WANG, B. G. et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. **Cancer Research**, v. 63, n. 14, p. 3966–8, 2003.

YU, J.; GU, G.; JU, S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. **Laboratory Medicine**, v. 45, n. 1, p. 6-12, 2014.

ABSTRACT: The presence of cell-free DNA (cfDNA) in plasma was first found in 1948 and, since then, it's utilization as a biomarker in pathologic processes, because cfDNA is originated, mainly, from apoptosis, generating short fragments, or from necrosis, generating long fragments. The difference in the size of the fragments can be used to evaluate the integrity of cfDNA (int-cfDNA). This way, the objective of this study was develop a method of int-cfDNA determination in 14 healthy individuals, using qPCR with L1PA2 primers. Two centrifugation steps were made to obtain plasma samples, from which cfDNA was isolated with a column method. The isolated cfDNA was submited to qPCR using two sets of L1PA2 primers, one for short fragments with 90 bp and another for long fragments with 222 bp. Two standard curves made from a pool of cfDNA of 10 samples of healthy individuals were used to the quantification of the fragments. The efficiency of L1PA2 90 bp curve was 100%, with determination coefficient (r^2) equal to 0,98 and for L1PA 222 bp was 99%, with $r^2=0,97$. The mean int-CFDNA was $0,64\pm 0,28$; IC95%(0,45-0,83). The results points that the qPCR with L1PA2 primers can be used in the investigation of pathologic processes related to celular death. However, it's necessary to explore the relation of the integrity with the origin processes of this fragments to determine the limits between the normal and altered state. This way, the liquid biopsy methodology can be validated to the diagnostic and prognostic in pathologic situations.

KEYWORDS: cfDNA, cfDNA integrity, liquid biopsy, qPCR.

CAPÍTULO XIII

EFICÁCIA DA FOSFOLIPASE D RECOMBINANTE DE CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS NA COMPOSIÇÃO DE VACINA DE SUBUNIDADE PARA A LINFADENITE CASEOSA

**Rodrigo Barros de Pinho
Mara Thais de Oliveira Silva
Silvestre Brilhante Bezerra
Raquel Nascimento das Neves
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Sibele Borsuk**

**EFICÁCIA DA FOSFOLIPASE D RECOMBINANTE DE CORYNEBACTERIUM
PSEUDOTUBERCULOSIS NA COMPOSIÇÃO DE VACINA DE SUBUNIDADE PARA A
LINFADENITE CASEOSA**

Rodrigo Barros de Pinho

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Pós-Graduação em Biotecnologia
Pelotas – Rio Grande do Sul

Mara Thais de Oliveira Silva

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Pós-Graduação em Biotecnologia
Pelotas – Rio Grande do Sul

Silvestre Brilhante Bezerra

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Pós-Graduação em Biotecnologia
Pelotas – Rio Grande do Sul

Raquel Nascimento das Neves

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Pós-Graduação em Biotecnologia
Pelotas – Rio Grande do Sul

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte – Minas Gerais

Sibele Borsuk

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Pelotas – Rio Grande do Sul

RESUMO: As vacinas comercialmente disponíveis para a linfadenite caseosa (LC) apresentam limitações, baixa eficácia e reações adversas, sendo constante a busca por novos alvos. A fosfolipase D (PLD) surge como um dos principais fatores de virulência, atuando como fator de permeabilidade e contribuinte para a propagação da infecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Objetivou-se avaliar a eficácia da proteína rPLD em vacina recombinante de subunidade. Um fragmento do gene *pld* foi amplificado e clonado no vetor pAE. O plasmídeo transformado em *Escherichia coli* Star e a proteína expressa e purificada. Realizados experimentos de imunização e desafio em camundongos Balb/c (CEEA UFPel nº 2422). Em grupos: G1, 300 µl solução salina 0,9%; via s.c.; G2, 50 µg de rPLD + 7,5 µg de saponina em 300 µl, via s.c.; e G3, bacterina da cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. ELISA indireto foi realizado para avaliar os níveis IgG total, IgG1 e IgG2a. Desafio realizado com a cepa MIC-6 (UFC) de *C. pseudotuberculosis* no dia 42 pós-imunização e os animais observados por 30 dias. Observou-se que a rPLD foi capaz de induzir proteção de 30% nos camundongos desafiados. Níveis de IgG total específica para rPLD se mostraram estatisticamente maiores no grupo experimental G2 em relação aos controles, em ambos dias. IgG1 e IgG2a também demonstraram níveis elevados em

G2 no dia 42, sugerindo perfil misto de resposta imune Th1/Th2. A proteína rPLD apresentou-se promissora na formulação de vacinas de subunidade para LC, uma vez que foi capaz de induzir proteção parcial e resposta humoral em camundongos. **PALAVRAS-CHAVE:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Fosfolipase D., Vacina recombinante de subunidade, Linfadenite caseosa.

1. INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e ovinos no Brasil é uma atividade em ascensão e bastante desenvolvida, o país conta com um efetivo de aproximadamente 9.614.722 caprinos e 18.410.551 ovinos, destacando-se as regiões Sul e Nordeste, que contam com o maior número destes animais (PORTO et al., 2013; IBGE, 2015). Mesmo com o grande contingente, o país apresenta baixos níveis produtivos na ovinocaprinocultura em relação a outros países produtores em decorrência da não adoção de novas tecnologias pelos produtores e principalmente por práticas de manejo inadequado e más condições sanitárias, o que se reflete em altas taxas de morbidade (PEDROSA et al., 2003; ALENCAR et al., 2010). No aspecto sanitário, as limitações são diretamente relacionadas ao deficiente e/ou ausente controle de enfermidades, onde diversas doenças ocorrem com facilidade e são apontadas como responsáveis pela redução da produtividade, dentre elas é importante destacar a linfadenite caseosa (LC) (GUIMARÃES FILHO et al., 2006).

A LC é uma doença infectocontagiosa, crônica, de ocorrência mundial, caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados, podendo ser encontrados em linfonodos superficiais (LC externa) e viscerais (LC interna), podendo o animal apresentar enfraquecimento geral e baixa produção de carne e leite, e até mesmo causando sua morte no caso de caprinos e ovinos (ALENCAR, 2010; DORELLA et al., 2009; PATON et al., 2003). O patógeno também foi isolado em búfalos, veados, porcos espinhos, Iíhamas e camelos (DORELLA et al., 2006). No Brasil a LC se apresenta de forma endêmica, possuindo uma prevalência clínica de 30%, a prevalência varia quando o fator hospedeiro é analisado, sendo maior em ovinos do que em caprinos. No entanto, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, refletindo uma maior exposição aos fatores de risco (AL-RAWASHDEH et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002).

Áreas críticas do corpo do animal, como mandíbula, região crural ou úbere, se afetadas podem comprometer sua mastigação e locomoção, além de reduzir consideravelmente a produção de carne, leite e lã, tornando o prejuízo da LC ainda maior (AL-GAABARY et al., 2009). As perdas econômicas possuem ampla distribuição e são relatadas em vários países, destacando-se países em desenvolvimento, como o Brasil, onde as ovelhas e cabras são de crescente importância econômica (RIBEIRO et al., 2014).

Esta enfermidade tem como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracterizado como um bacilo Gram-positivo pleomórfico, pequeno, irregular, imóvel, anaeróbico, intracelular facultativo de macrófagos, fermentativo e não formador de esporos, fazendo parte do grupo dos actinomicetos,

juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, que possui características comuns, principalmente relacionadas à composição da parede celular, contendo peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos, além de uma alta proporção de guanina e citosina no genoma (DORELLA et al., 2006).

É importante destacar que apesar de sua importância como doença endêmica, não existe um diagnóstico subclínico, tratamento ou vacina que sejam realmente eficientes na detecção e combate à LC (GUIMARÃES et al., 2011).

O diagnóstico mais utilizado por produtores e médicos veterinários é o clínico, sendo realizada principalmente a observação macroscópica dos abscessos superficiais externos. Já o teste definitivo, considerado padrão-ouro para a doença é realizado a partir do isolamento da bactéria diretamente do material caseoso drenado dos linfonodos acometidos do animal e cultivo bacteriológico, seguido por testes bioquímicos (RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001). Porém, os testes se mostram dispendiosos para os produtores, e no caso bioquímico pouco sensível e incapaz de detectar animais de fase assintomática. Conforme já descrito por Dorella et al., 2006, até o momento, nenhum diagnóstico clínico precoce dos animais infectados que evitaria que estes entrassem em contato com o restante do rebanho e disseminassem a infecção foi estabelecido com total eficiência, contribuindo assim como um obstáculo na erradicação da LC. Sem o diagnóstico eficaz, a transmissão de *C. pseudotuberculosis* é aumentada, e se dá principalmente pela ruptura dos abscessos, cujo material excretado contém um elevado número de microrganismos viáveis, estes suficientes para infectar um rebanho sadio em toda sua totalidade. Os aerossóis provenientes de descargas oro-nasais de animais com abscessos pulmonares, ou através da presença de bactérias vivas no ambiente também são fonte de transmissão (RADOSTITS et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2011).

A capacidade desse agente infeccioso em sobreviver no solo por um período de aproximadamente oito meses, juntamente com outros fatores, como ferimentos na pele dos animais ocasionados por procedimentos de rotina (tosquia, castração), são considerados fatores de risco e culminam por agravar ainda mais a transmissibilidade da LC (ALVES; PINHEIRO, 1997).

Com a penetração no hospedeiro, o microrganismo é capturado localmente por células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos. Após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo, porém, a bactéria continua a se multiplicar no interior dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos macrófagos. A incapacidade de eliminação da bactéria pelos fagócitos ocorre pela presença da camada lipídica bacteriana e à resistência da bactéria ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos (BOGDAN et al., 1997; SONGER et al., 2005). O fato de ocorrer esta multiplicação desordenada da bactéria no interior dos macrófagos, leva o hospedeiro a restringir a infecção através de piogranulomas, estes são caracterizados pelo encapsulamento ou envelopamento das células infectadas pela bactéria (BATEY, 1986). Com estes acontecimentos, existe uma mudança no perfil de citocinas expressas durante a infecção e uma alta produção de anticorpos contra antígenos bacterianos como, por exemplo, a fosfolipase D (PLD) (DORELLA et al., 2009).

Existe uma constante busca por uma vacina ideal à LC. A mesma deve fornecer uma proteção elevada e de longa duração, que permita a diferenciação entre animais vacinados e infectados, sem provocar reações adversas nos imunizados (DORELLA et al., 2006). Diante disso, diferentes estratégias vacinais têm sido testadas, como o uso de bactérias atenuadas e mortas (BROGDEN et al., 1990; LEAMASTER et al., 1987; SIMMONS et al., 1998), vacinas de DNA (CHAPLIN et al., 1999), frações contendo antígenos da parede bacteriana (BRAGA, 2007), sobrenadantes da cultura bacteriana (EGGLETON et al., 1991), uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (BRAGA, 2007; EL-ENBAAWY et al., 2005) e até mesmo vacina viva recombinante com gene *pld* inativado, que foi utilizada para imunizar ovelhas via oral, demonstrando certa proteção e altos níveis de resposta humoral e celular (HODGSON et al., 1994). Estas preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais, e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção são muito variáveis e a severidade das lesões é bastante discutida. Em contrapartida, a estratégia de vacina de subunidade recombinante já alcançou bons resultados, como exemplo descrito por Silva e colaboradores em 2014, em que, a proteína recombinante CP40 em associação ao adjuvante saponina conferiu 90% de proteção à camundongos após o desafio com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. As vacinas recombinantes de subunidade vêm sendo consideradas promissoras, por causar menos efeitos colaterais e ser mais específica e segura por utilizar antígenos altamente purificados, sendo o sucesso deste tipo de vacina atribuído ao seu alvo, onde, fatores de virulência são candidatos promissores (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016; SILVA et al., 2014).

Os determinantes de virulência da bactéria são essenciais para a sua patogenicidade, e a introdução de novas tecnologias como análises de exoproteoma são fundamentais no desenvolvimento de novos estudos capazes de identificar proteínas secretadas/excretadas pela bactéria (BASTOS et al., 2012). Mesmo com estudos paralelos, novas abordagens e descobertas os determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis* mais estudados até o momento são os lipídeos tóxicos encontrados na superfície da parede celular da bactéria e a fosfolipase D (PLD) (MCKEAN et al., 2007).

A PLD é uma potente exotoxina, considerada o maior fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, atuando como um fator crítico na disseminação da bactéria do sítio de infecção aos linfonodos, uma vez que sua enzima cataliza a dissociação da esfingomielina, presente na membrana de células animais (BAIRD; FONTAINE, 2006; DORELLA et al. 2006; HODGSON et al., 1999). Também pode estar associada a um efeito letal sobre macrófagos, visto que a exotoxina causa danos e até mesmo a destruição destas células de defesa, além disso exerce atividade citotóxica e dermonecrótica. A fosfolipase D é capaz de ativar íons cálcio e magnésio, possuindo citotoxicidade direta quando inoculada em roedores de laboratório e também promove a lise de eritrócitos ovinos e bovinos nos meios de cultura (RIBEIRO et al., 2010).

Assim, objetivou-se avaliar a eficácia da proteína rPLD de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em uma vacina recombinante de subunidade quanto à indução

de proteção e resposta imune humoral em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas e condições de cultivo

Quatro cepas foram utilizadas neste experimento, a cepa 1002 atenuada e MIC-6 patogênica de *C. pseudotuberculosis*; TOP 10 e BL21 (DE3) Star de *E. coli*.

Culturas de *C. pseudotuberculosis* foram incubadas a 37°C por 72 h sob agitação, em meio Infusão de cérebro coração (BHI, Acumedia). Cepas de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani), e quando necessário em sua forma sólida (adicionado de 1,5% de Ágar para uso bacteriológico) a 37°C por 16 h, podendo ser suplementado com o antibiótico ampicilina (100 ug/mL; Sigma-Aldrich) quando necessário.

2.2. Clonagem, expressão e purificação da proteína rPLD

Para a clonagem, foi utilizado um fragmento de 825 pb do gene *pld*, amplificado utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Tanto o produto obtido através da técnica de PCR, quanto o vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) foram submetidos a restrição das enzimas BamHI e EcoRI (Fermentas) separadamente, afim de tornar suas extremidades coesivas. A ligação entre vetor e inserto foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas) e transformado em *E. coli* TOP10. O plasmídeo pAE/*pld* recombinante foi transformado por choque térmico em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, e a expressão da proteína induzida com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C em agitador orbital. Para a purificação da proteína recombinante, a cultura bacteriana foi centrifugada e o pellet foi suspenso em tampão salino fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 100 mg/ml de lisozima, sonificado 15 vezes por 15 segundos (20 Khz). Após uma centrifugação a 7000 rpm por 15 minutos a 4°C, o pellet foi solubilizado com tampão Akta Wash com uréia a 8 M (200 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole; 8 M Urea pH 8.0). A proteína recombinante foi purificada utilizando a coluna de cromatografia por afinidade HisTrap™ HP (GE Healthcare). Em seguida procedeu-se à diálise em tampão Tris 100 mM-NaCl 300 mM.

Para avaliação da identidade da proteína rPLD, foi realizada uma eletrotransferência das amostras contidas em gel SDS-PAGE 12% para a membrana de nitrocelulose (Nitrocellulose Blotting Membrane – GE Health Care). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS-leite em pó (5%) por 16 h a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (0,05% Tween) com 30 s de agitação cada, e posteriormente, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-6Xhistidina (Sigma Aldrich) na diluição de 1:4000 em PBS-T, permanecendo por 1 h em leve agitação. O protocolo de lavagem foi novamente utilizado, nas mesmas

condições, e a membrana foi novamente submetida à leve agitação, agora, com o anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich), na diluição de 1:4000 também em PBS-T. Por fim, a membrana foi lavada cinco vezes, utilizando ciclos de 1 min cada, com PBS-T e as bandas reativas foram reveladas utilizando solução reveladora baseada em 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) e H₂O₂.

2.3. Experimentos de imunização e desafio

Para os experimentos de imunização foram utilizados 30 camundongos Balb/c fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis*, alocados em 3 grupos de 10 animais, imunizados com 2 doses da vacina recombinante em intervalo de 21 dias (Tabela 1). O experimento foi aprovado pelo Conselho de Ética da Universidade Federal de Pelotas (CEEA UFPel nº 2422). As vacinas foram formuladas e armazenadas sob agitação a 4°C por 16 h antes de sua utilização. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21 e 42 do experimento. O Desafio utilizando a cepa MIC-6 (10⁴ UFC) de *C. pseudotuberculosis* foi realizado no dia 42 pós-imunização e os animais foram observados por 30 dias.

Tabela 1: Grupos e formulações vacinais administradas.

Grupo	Formulação	Volume final	Via de administração
G1	Solução salina 0,9%	300 µl	Subcutânea
G2	50 µg de rPLD + 7,5 µg de saponina	300 µl	Subcutânea
G3	Bacterina da cepa MIC-6 (10 ⁶ UFC)	100 µl	Intraperitoneal

2.4. Avaliação da resposta imune humoral

ELISA indireto foi realizado para avaliar os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a utilizando os soros coletados nos dias 0, 21 e 42 pós imunização. Para isso, placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com 100 ng por cavidade da proteína rPLD em tampão carbonato bicarbonato pH=9,8 e incubadas a 4 °C por 16 h. Após, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS 1X pH= 7.4; 0,05 % Tween 20) e bloqueadas com 200 µL/cavidade de leite em pó desnatado 5 % diluído em PBS-T por 1 h à 37 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Em seguida foram adicionados 100 µL/cavidade das amostras dos soros de camundongos, na diluição de 1:50, em duplicata. Após uma hora de incubação a 37°C e três lavagens com PBS-T, foram adicionados 100 µL/cavidade do anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:5000. Seguido de uma hora de incubação a 37°C e três lavagens com PBS-T, 100 µL/cavidade de solução reveladora (200 moles ortofenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 10 mL de tampão citrato-fosfato pH=7,6 e 50 µL de H₂O₂) foram adicionados. A absorbância

foi medida a 492 nm utilizando um leitor de placas de ELISA (Mindray).

2.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, USA). Diferenças entre a produção de IgG nos diferentes grupos foram calculadas pelo one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção da proteína rPLD

Um Western blot foi realizado utilizando anticorpo monoclonal anti-6xhistidina para a confirmação da identidade da proteína recombinante (Figura 1). A identidade da proteína rPLD pode ser observada, através de uma banda reativa com aproximadamente 31 kDa. A proteína rPLD foi expressa por *E. coli* como corpos de inclusão, e foi solubilizada em 8 M de ureia para a purificação;

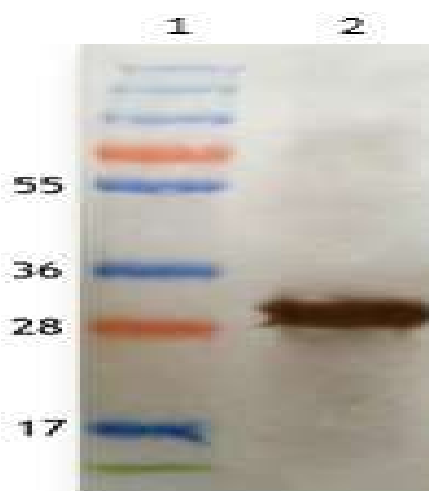


Figura 1: Western Blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-6Xhis Tag (Sigma). 1- Marcador molecular (PageRuler™, Thermo Scientific) 2- rPLD purificada.

3.2. Curva de sobrevivência

Taxas de sobrevivência do grupo experimental vacinado (G2) e dos grupos controle de Solução Salina (G1) e Bacterina (G3) podem ser observados na Figura 2. Os animais foram observados por até 30 dias após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*.

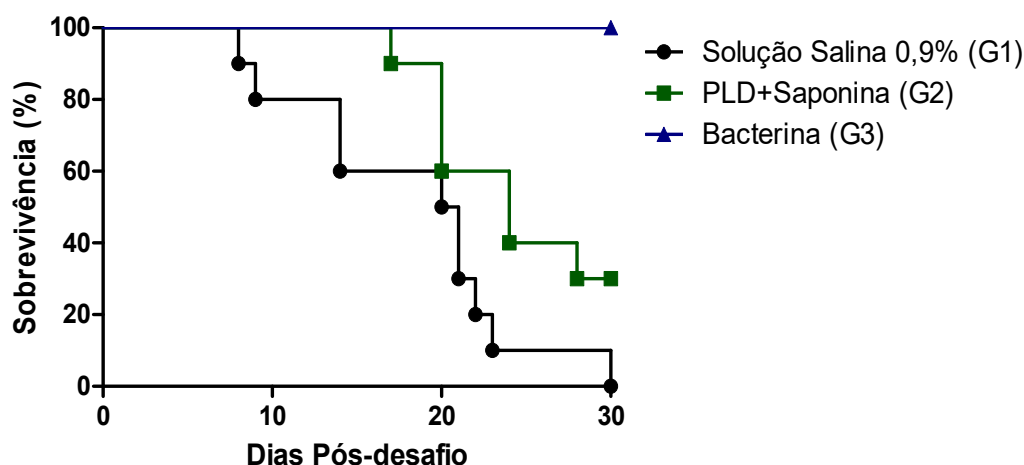


Figura 2: Curva de sobrevivência demonstrando os níveis de proteção induzidos após o desafio com a cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. Letras distintas representam resultados estatisticamente diferentes no teste exato de Fisher.

É possível observar que no controle negativo (G1) todos os animais vieram a óbito e no controle positivo (G3) todos os animais do grupo sobreviveram até 30 dias pós-desafio.

A vacina formulada com rPLD e adjuvante Saponina (G2) induziu uma proteção de 30% nos camundongos desafiados com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, no entanto este nível não foi estatisticamente significativo ($p > 0.05$). Este dado acorda com trabalho descrito por FONTAINE et al. (2006), onde a proteína rPLD formulada individualmente, não teve a capacidade de proteger completamente a LC em ovinos, porém, a mesma se mostrou uma via importante de disseminação da doença, além de impedir manifestações específicas.

3.3. Resposta imune humoral

Os soros dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais foram avaliados através de ELISA para a determinação da resposta imune humoral através dos níveis de IgG total (Figura 3), IgG 1 (Figura 4) e IgG 2a (Figura 5).

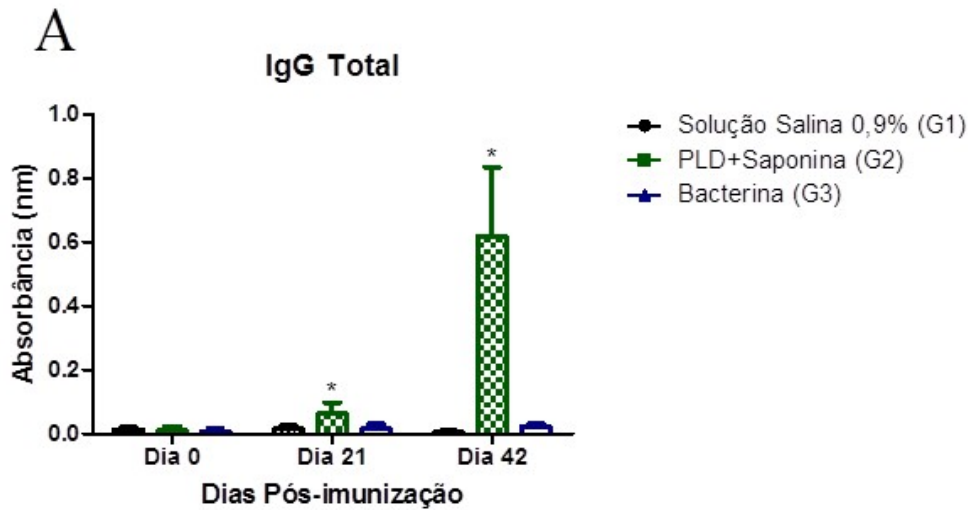


Figura 3: Determinação do nível de IgG total através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rPLD nos grupos experimentais pós-imunização. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento com dez animais por grupo de imunização. Letras diferentes dentro de um mesmo dia indicam grupos com resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

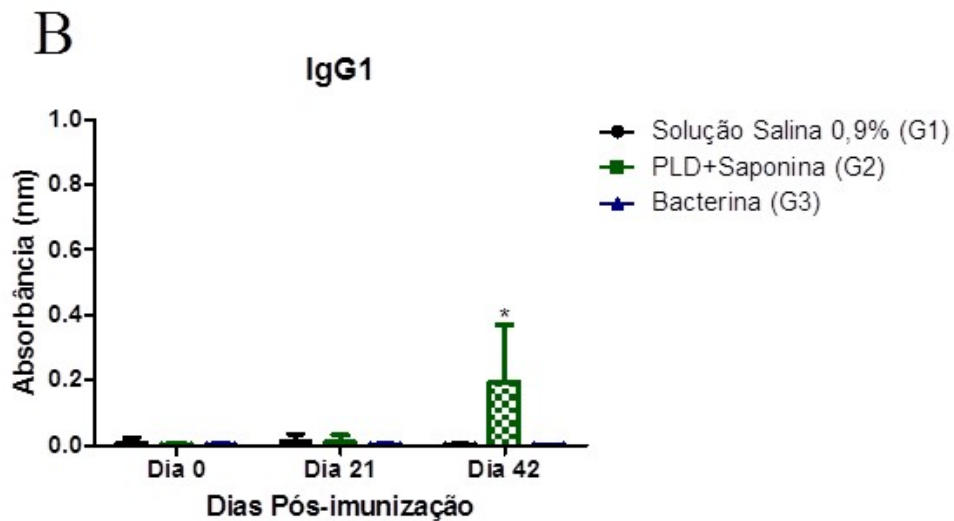


Figura 4: Determinação do nível de IgG 1 através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rPLD nos grupos experimentais pós-imunização. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento com dez animais por grupo de imunização. Letras diferentes dentro de um mesmo dia indicam grupos com resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

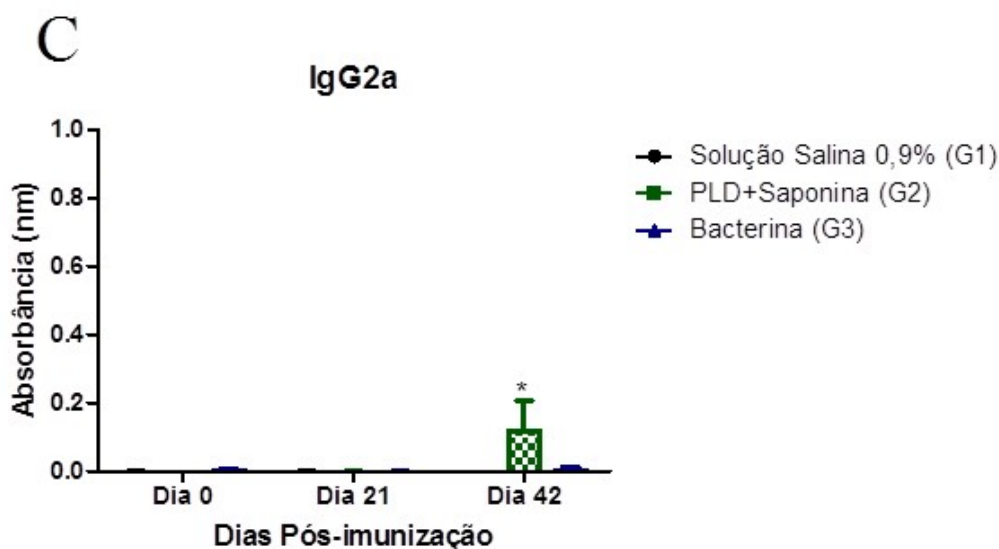


Figura 5: Determinação do nível de IgG 2a através de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rPLD nos grupos experimentais pós-imunização. Os resultados estão apresentados como a média e o desvio padrão de um experimento com dez animais por grupo de imunização. Letras diferentes dentro de um mesmo dia indicam grupos com resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O papel da resposta imune humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* já foi demonstrado em ensaios de imunização passiva, nos quais a administração de soros antitoxina e antibacteriana foram capazes de proteger camundongos desafiados com a bactéria (PAULE et al., 2003). Neste estudo, em relação aos níveis de imunoglobulinas, foi possível observar altos níveis de IgG total, estatisticamente maiores no grupo experimental G2 nos dias 21 e 42 em relação aos grupos controles. No caso dos isótipos IgG 1 e IgG 2a observou-se em ambos, níveis estatisticamente mais elevados em G2 no dia 42 em relação aos grupos controles. Demonstrando um perfil misto de resposta imune de linfócitos do tipo Th1/Th2. Onde a produção de IgG2a, em camundongos, é característica do tipo de resposta imune Th1, responsável pela eliminação de patógenos intracelulares como *C. pseudotuberculosis* quando infecta macrófagos (HODGSON et al., 1994). Já as células Th2 atuam na imunidade contra patógenos extracelulares e auxiliam as células B na produção de anticorpos neutralizantes (SILVA et al., 2014).

4. CONCLUSÃO

A proteína rPLD apresentou-se promissora na formulação de vacinas de subunidade, uma vez que foi capaz de induzir proteção parcial no ensaio de desafio, e níveis elevados de resposta humoral do tipo misto Th1/Th2 em camundongos vacinados.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S.P et al., **Perfil Sanitário Dos Rebanhos Caprinos E Ovinos No Sertão De Pernambucano**. *Ciência Animal Brasileira*. 11(1). p. 131-140, 2010.

AL-GAABARY, Magdy H.; OSMAN, Salama A.; OREIBY, Atef F. **Caseous lymphadenitis in sheep and goats: clinical, epidemiological and preventive studies**. *Small Ruminant Research*, v. 87, n. 1, p. 116-121, 2009.

AL-RAWASHDEH, O. F.; AL-QUDAH, K. M. **Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan**. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 47, n. 4, p. 287-293, 2000.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas**. Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 1997.

BASTOS, B. L. et al. **Corynebacterium pseudotuberculosis: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential**. *Clinical e Cellular Immunology*, 2012.

BATEY, R. G. **Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats**. *Australian Veterinary Journal*, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

AN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C. F.; ELLIS, J. A. **Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages**. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 56, n. 3, p. 299-310, 1997.

BRAGA, W. U. **Protection in alpacas against Corynebacterium pseudotuberculosis using different bacterial components**. *Veterinary microbiology*, v. 119, n. 2, p. 297-303, 2007.

BROGDEN, K. A. et al. **Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of Corynebacterium pseudotuberculosis whole-cell vaccines in mice and lambs**. *American journal of veterinary research*, v. 51, n. 2, p. 200-202, 1990.

CHAPLIN, P. J. et al. **Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep**. *Infection and immunity*, v. 67, n. 12, p. 6434-6438, 1999.

DORELLA, F. A et al. **Antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis and prospects for vaccine development**. *Expert review of vaccines*, v. 8, n. 2, p. 205-213, 2009.

DORELLA, Fernanda Alves et al. **Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology,**

biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary research, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of Corynebacterium pseudotuberculosis vaccines with and without bacterial cells. Australian veterinary journal, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991.

EL-ENBAAWY, M. I.; SAAD, M. M.; SELIM, S. A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against Corynebacterium pseudotuberculosis antigens. The Egyptian journal of immunology/Egyptian Association of Immunologists, v. 12, n. 2, p. 13-19, 2004.

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of Corynebacterium pseudotuberculosis. Vaccine, v. 24, n. 33, p. 5986-5996, 2006.

GUIMARÃES, A. D. S. et al. Caseous Lymphadenitis : Epidemiology, Diagnosis, and Control. The IIOAB Journal, v. 2, n. 2, p. 33-43, 2011.

GUIMARÃES FILHO, C.; BORGES, J.H.F.; NOGUEIRA, D.M. Situação atual e perspectivas da caprinocultura no Vale do São Francisco. Petrolina, nov. 2006.

Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATSA/35158/1/OPB1003.pdf>
. Acesso em: 10 mai. 2017.

HODGSON, A L. et al. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant. v. 62, n. 12, p. 5275-5280, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2013-2014. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default_xls_brasil.shtm. Acesso em 13 mai. 2017.

LEAMASTER, B. R. et al. Efficacy of Corynebacterium pseudotuberculosis bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. American journal of veterinary research, v. 48, n. 5, p. 869-872, 1987.

MCKEAN, Sandra C.; DAVIES, John K.; MOORE, Robert J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of Corynebacterium pseudotuberculosis, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology, v. 153, n. 7, p. 2203-2211, 2007.

PATON, M. W. et al. **Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks.** Australian veterinary journal, v. 81, n. 1-2, p. 91-95, 2003.

PAULE, B. J. A. et al. **Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting.** Veterinary immunology and immunopathology, v. 96, n. 3, p. 129-139, 2003.

PEDROSA, K. Y. F et al. **Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte.** Caatinga, v. 16, n. 1/2, p. 17-21, 2003.

RADOSTITS, O. M. et al. **Doenças causadas por Bactérias.** Clínica veterinária – Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos, v. 9, p. 653-656, 2002.

RAMOS, C. R. R. et al. **A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RIBEIRO, D. et al. **An iron-acquisition-deficient mutant of Corynebacterium pseudotuberculosis efficiently protects mice against challenge.** Veterinary Research, v. 45, n.1, p.2-7, 2014.

RIBEIRO, M. G. et al. **Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de Corynebacterium pseudotuberculosis na linfadenite caseosa caprina.** Arq Inst Biol, v. 68, p. 23-28, 2001.

SIMMONS, C. P. et al. **Vaccine Potential of Attenuated Mutants of Corynebacterium pseudotuberculosis in Sheep.** Infection and immunity, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

SILVA, Judson W. et al. **Corynebacterium pseudotuberculosis cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis.** BMC veterinary research, v. 10, n. 1, p. 965, 2014.

SONGER, J. G. et al. **Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease.** Elsevier Health Sciences, 2004.

WILLIAMSON, L. H. **Caseous lymphadenitis in small ruminants.** The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, v. 17, n. 2, p. 359-71, vii, 2001.

ABSTRACT: Commercially available vaccines for caseous lymphadenitis (LC) show limitations, low efficacy and adverse reactions, and the search for new targets is constant. Phospholipase D (PLD) appears as one of the main factors of virulence, acting as a permeability factor and contributor to the spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the rPLD protein in a recombinant subunit vaccine. A fragment of the *pld* gene was amplified and cloned into the pAE vector. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* Star and the protein expressed and purified. Immunization and challenge experiments were performed in Balb/c mice (EAEC UFPel nº 2422). In groups: G1, 300 µl saline solution 0.9%; Via s.c. ; G2, 50 µg rPLD + 7.5 µg saponin in 300 µl via s.c.; And G3, bacterin of the *C. pseudotuberculosis* strain MIC-6. Indirect ELISA was performed to assess total IgG, IgG1 and IgG 2a levels. Challenge with the MIC-6 (CFU) strain of *C. pseudotuberculosis* at day 42 post-immunization and the animals observed for 30 days. It was observed that rPLD was able to induce 30% protection in the challenged mice. Total specific IgG levels for rPLD were statistically higher in the G2 experimental group compared to the controls on both days. IgG1 and IgG2a also demonstrated elevated G2 levels at day 42, suggesting a mixed Th1/Th2 immune response profile. The rPLD protein was promising in the formulation of LC subunit vaccines as it was able to induce partial protection and humoral response in mice.

KEYWORDS: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Phospholipase D, Recombinant subunit vaccine, Caseous lymphadenitis.

CAPÍTULO XIV

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO PILOTO

**Rosane Giacomini
Alessandra Eifler Guerra Godoy
Isnard Elman Litvin
Fabio Firmbach Pasqualotto**

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO PILOTO

Rosane Giacomini

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia
Caxias do Sul - RS

Alessandra Eifler Guerra Godoy

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Departamento de Patologia
Caxias do Sul - RS

Isnard Elman Litvin

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências da Saúde
Caxias do Sul - RS

Fabio Firmbach Pasqualotto

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante
Caxias do Sul - RS

RESUMO: O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum, com estimada incidência anual, de um milhão de casos em todo o mundo, sendo considerado um problema global de saúde pública. O tabaco e o álcool são os principais fatores etiológicos, mas nas últimas décadas a infecção pelo HPV tem sido associada à doença. Os biomarcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis expressionais dos biomarcadores p53, tubulina, EGFR, p63 e p16 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341. Foram utilizadas sete amostras teciduais, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, de pacientes submetidos a tratamento para câncer, atendidos no Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma de cabeça e pescoço. Avaliou-se a expressão proteica por imunohistoquímica. A análise foi realizada em microscópio óptico, por dois médicos patologistas treinados, independentemente, através da utilização do score H. Com exceção do p63, que não apresentou alteração na sua expressão, os demais marcadores apresentaram alterações que variam, da ausência de expressão a expressão elevada, indicando que a obtenção de um maior número de informações sobre a expressão dos biomarcadores pode auxiliar na decisão terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: HPV, cabeça e pescoço, câncer.

1. INTRODUÇÃO

Durante muitos séculos o câncer foi uma doença própria dos países

desenvolvidos. No entanto, nas últimas décadas ela vem se alastrando por todo o mundo, atingindo de forma avassaladora tanto as grandes potências quanto os países em desenvolvimento. Por este motivo, ele tem-se apresentado como um relevante problema de saúde pública a nível mundial (1).

O conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo é chamado de câncer, neoplasia ou tumor maligno (3, 4).

O processo de carcinogênese acontece quando as células deixam de seguir o processo natural de divisão, amadurecimento e morte, do ciclo celular e passam a sofrer mutação em um ou mais genes, sendo induzidas ao desenvolvimento desordenado, produzindo novas células anormais, que se agrupam umas sobre as outras e, por fim, formam uma massa de tecido chamada tumor. Dependendo das características das células envolvidas, é um processo que pode ser rápido ou levar anos. A gravidade e a extensão do tumor encontrar-se diretamente relacionadas ao prognóstico da doença (5).

A expressão câncer de cabeça e pescoço define um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, que compartilham fatores de risco comuns, e apresentam semelhanças em sua epidemiologia, tratamento e prognóstico. Essas neoplasias estão localizadas no trato aerodigestivo superior, ou seja, que acometem a cavidade bucal que incluem lábio, a base da língua, a língua, gengiva, boca e palato, a faringe que envolve a orofaringe, hipofaringe e nasofaringe e a laringe (6).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECCP) corresponde a 20% dos tumores epiteliais malignos que acometem caucasianos (7), ocorrendo mais frequentemente entre a quinta e a sétima décadas de vida. No Brasil, há um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (3).

A taxa de sobrevivência referente ao CECCP, em um período de 5 anos, é de 50% e o tratamento é baseado em radioterapia, em combinação com cirurgia e/ou fármacos citostáticos. Entretanto, a recidiva, bem como a resistência a esses tratamentos são frequentes nesse carcinoma (8, 9).

A sobrevivência média dos pacientes em estádios avançados da doença não tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, apesar dos avanços das técnicas cirúrgicas e de novas abordagens terapêuticas.

Os CECCP são distintos quanto ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico, embora considerados como uma única entidade histopatológica. Tumores de orofaringe têm maior tendência a gerar metástases, em contraste com os carcinomas de cavidade oral e da laringe. Além disso, tumores de cavidade oral, geralmente, são mais diferenciados do que os carcinomas de orofaringe. Em particular, os tumores de hipofaringe são geralmente mais agressivos do que os tumores localizados em outros sítios anatômicos de cabeça e pescoço (10).

Essa neoplasia ocorre, principalmente, no sudeste da Ásia, nas regiões centrais e no sudoeste da Europa, especialmente na Espanha e na França, e no Brasil. A América do Norte e o norte da Europa ocupam uma posição intermediária

na distribuição geográfica desse carcinoma; já o Japão, a China e o oeste Africano apresentam proporções baixas de distribuição da doença (11).

Segundo a World Health Organization (WHO), o câncer é uma das principais causas de mortes no mundo. As projeções são de que estes números continuem crescendo (4).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos (15). Sendo que o aumento do número de novas ocorrências resulta do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (14).

O CECCP é o sexto tipo de câncer de maior incidência mundial (12), sendo a oitava causa de morte por câncer no mundo (13). Esse tipo de câncer pode afetar diferentes áreas anatômicas. Em média, 40% dos casos ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe, 15% na faringe, 7% nas glândulas salivares e 13% nos locais restantes (14).

Mais de 600.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados, a cada ano, em todo o mundo, representando 5% de todos os tumores malignos. Sendo que, a maioria destes, é diagnosticada em estágio clínico avançado da doença (60% estágio III e IV). O carcinoma de células escamosas ou epidermoide é o tipo histológico predominante (16, 17).

Devido à natureza multigênica da doença e aos fatores individuais de suscetibilidade genética, estilo de vida e ao grande número de agentes ambientais potenciais aos quais os indivíduos estão expostos, a epidemiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço é extremamente complexa. Sendo que, a diversidade de fatores relacionados com a gênese do CECCP apóia a hipótese de doença multifatorial (18).

O desenvolvimento do CECCP é um processo que ainda não está completamente entendido, entretanto existem evidências que sugerem o papel de vários fatores associados, individualmente ou em conjunto, a um risco aumentado da ocorrência deste tipo de câncer (20).

A exposição a determinados agentes químicos, físicos ou biológicos em um paciente geneticamente propenso, ao promover mutações genéticas, desencadearão o desenvolvimento do tumor maligno (22).

Os principais fatores de risco para os tumores de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo, porém deve-se ainda considerar outros fatores relacionados aos hábitos de vida, à ocupação e à classe social (23). Além desses fatores, a infecção viral pelo papilomavírus humano (HPV), que está relacionada a comportamentos sexuais, tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor (24).

Cada fator de risco aumenta em duas a três vezes o risco de se desenvolver câncer isoladamente, mas quando combinados, esse risco aumenta em cerca de quinze vezes (20).

Definir o prognóstico e o risco de desenvolvimento, assim como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou

biomarcadores (27).

A expressão de biomarcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais (21). O gene p53 é um supressor tumoral, comumente mutado em neoplasias humanas, sendo identificado aumento da sua expressão em neoplasias malignas. A expressão de tubulina está relacionada com a resistência a fármacos que tem como alvo a tubulina e os microtúbulos (19, 26). A superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um fator de prognóstico negativo, associado com pior controle local e sobrevida do paciente (21). p63, homólogo de p53, é um marcador de diferenciação escamosa, sendo observado uma relação inversamente proporcional entre a expressão de p63 e sobrevida em carcinoma oral (25). A superexpressão de p16 pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico dos tumores (2).

O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis de expressão de p53, tubulina, EGFR, p63 e p16 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sete amostras teciduais, armazenadas em blocos de parafina, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, de pacientes submetidos a tratamento para câncer, atendidos no Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma de cabeça e pescoço. No material histopatológico (blocos de parafina com amostras de câncer de cabeça e pescoço) foi realizado exame imunohistoquímico para detecção dos níveis de expressão de p53, tubulina, EGFR, p63 e p16. Foram feitos cortes histológicos com 4 micra de espessura montados em lâminas de vidro salinizadas. Os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. A análise foi realizada em microscópio óptico, por dois médicos patologistas treinados, independentemente, através da utilização de graus de intensidade de expressão proteica, sendo 0: negativo, 1+: fraca, 2+: moderado e 3+: forte.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras teciduais avaliadas (Figura 1) pertencem a indivíduos do sexo masculino com idade mediana igual a 61. Com exceção do p63, que não apresentou alteração na sua expressão, p53, tubulina, EGFR e p16 apresentaram alterações, que variam da ausência de expressão a expressão elevada (Figura 2). Estudos mostram que a superexpressão de p63, p53, tubulina e EGFR são indicativos de pior prognóstico

(19, 21, 25, 26) e a superexpressão de p16 indica melhor prognóstico (2). A diferente expressão destas proteínas pode estar associada com a resposta ao tratamento, indicando que estes biomarcadores poderiam ser utilizados para projetar estratégias de tratamento individuais.

Figura 1: Distribuição das amostras teciduais, por sítios anatômicos.

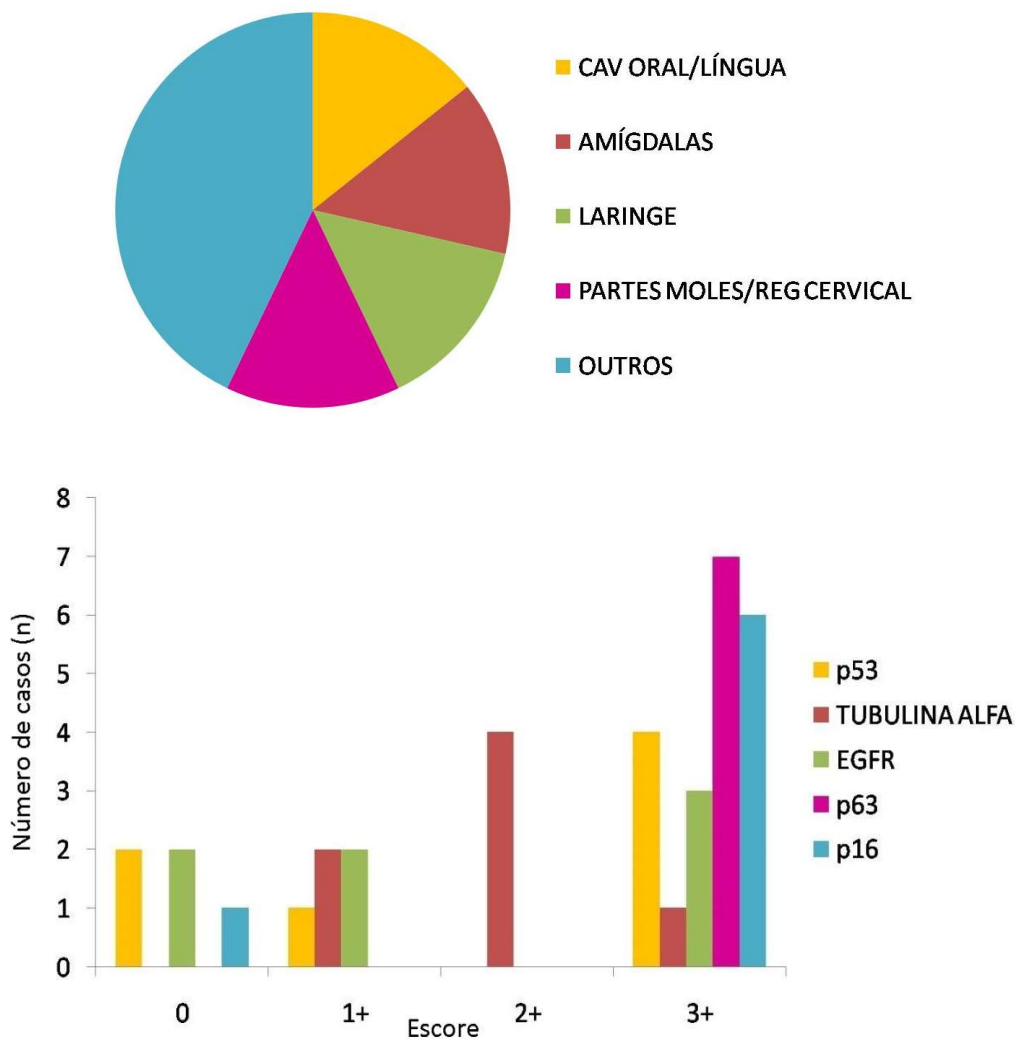


Figura 2: Níveis de expressão de p53, tubulina, EGFR, p63 e p16.

4. CONCLUSÃO

A obtenção de um maior número de casos e de informações sobre a expressão dos biomarcadores p53, tubulina, EGFR, p63 e p16, pode auxiliar na decisão terapêutica, podendo ser útil no manejo clínico dos pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, J. B.; VICENTE, L. C. C. A fonoaudiologia na radioterapia. In: Porcaro-Salles JM, Freire ARS, Vicente LCC. (Org.). **Câncer de boca: uma visão multidisciplinar**. 1ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1: 213-217, 2007.
- EL-NAGGAR, A. K. L.; WESTRA W. H. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck**, 34(4):459-61, 2012.
- FARIDI, R. et al. Oncogenic potencial of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virology**, 8:269, 2011.
- FARNEBO, L. et al. STRONG expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Int. J. Cancer**, 133(8):1994-2003, 2013.
- FELLER, L. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infect Agent Cancer**, 25;4:16, 2009.
- FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 664p.
- FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC**, 13(6):1103-1108, 2011.
- FUNG, C.; GRANDIS, J.R. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs**, 15(3):355-73, 2010.
- GARLAND, S. M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. **Pathology**, 34(3):213-24, 2002.
- HAN, S. et al. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, 10:196, 2010.
- HECK, J. E. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **Int J Epidemiol**, 39(1):166-81, 2010.
- HERCHENHORN, D.; DIAS, F. L. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ.**, 59(1):39-46, 2004.
- HSU, H. W. et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, 50(1):19-26, 2014.

INCA. Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

JEON, S.; LAMBERT, P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 92(5):1654-8,1995.

JORDAN, R. C. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. **Am J Surg Pathol.**, 36(7):945-54, 2012.

KATANODA, K.; YAKO-SUKETOMO, H. Cancer mortality attributable to tobacco by selected countries based on the WHO Global Report. **Jpn J Clin Oncol.**, 42(9):866, 2012.

KIM, M-J. et al. Different protein expression associated with chemotherapy response in oropharyngeal cancer according to HPV status. **BMC Cancer**, 14:824, 2014.

KREIMER, A. R. Et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Câncer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 14(2):467-75, 2005.

21. LANGER, C. J. Exploring biomarkers in head and neck cancer. **Cancer**, 118(16):3882-92, 2012.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, 11(1):9-22, 2011.

LEITZMANN, M. F. et al. Physical activity and head and neck cancer risk. **Cancer Causes and Control**, 19(10):1391-9, 2008.

LICITRA, L. et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 24(36) 5630-36, 2006.

LO MUZIO, L. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Hum Pathol.**, 36(2):187-94, 2005.

LOBERT, S. et al. Prognostic biomarkers for HNSCC using quantitative real-time PCR and microarray analysis: β -tubulin isotypes and the p53 interactome. **Cytoskeleton (Hoboken)**, 71(11):628-37, 2014.

SRINIVAS, P. R. et al. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol.**, 2(11): 698-704, 2001.

ABSTRACT: Head and neck epidermoid carcinoma is the sixth most common type of cancer, with an estimated annual incidence of one million cases worldwide, and is considered a global public health problem. Tobacco and alcohol are the major etiological factors, but in the last decades HPV infection has been associated with the disease. Biomarkers can be useful in the clinical management of cancer patients, as well as helping to develop new therapeutic modalities. The objective of this work was to identify, by immunohistochemistry, the expression levels of the biomarkers p53, tubulin, EGFR, p63 and p16 in samples of malignant head and neck lesions. The study was approved by the UCS Research Ethics Committee through CAAE: 47152015.5.0000.5341. Seven tissue samples obtained by biopsy of head and neck lesions of patients submitted to cancer treatment were used at the Oncology Service of the General Hospital of Caxias do Sul. The samples were selected retrospectively, having as selection criteria the presence of head and neck carcinoma. Protein expression was assessed by immunohistochemistry. The analysis was performed under optical microscope by two trained pathologists independently using the H score. With the exception of p63, which did not show alteration in its expression, the other markers presented alterations ranging from absence of expression to expression elevated, indicating that obtaining a greater number of information on the expression of the biomarkers may aid in the therapeutic decision.

KEYWORDS: HPV, head and neck, cancer.

CAPÍTULO XV

REDUÇÃO DE GANHO DE PESO CORPORAL EM CAMUNDONGOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM MICROALGAS

**Julia Livia Nonnenmacher
Mayara Breda
Alexandre Matthiensen
Helissara Silveira Diefenthaeler
Elisabete Maria Zanin
Silvane Souza Roman**

REDUÇÃO DE GANHO DE PESO CORPORAL EM CAMUNDONGOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM MICROALGAS

Julia Livia Nonnenmacher

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Erechim, Graduanda do Curso de Farmácia – Departamento de Ciências da Saúde Erechim – RS.

Mayara Breda

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Erechim, Graduanda do Curso de Ciências Biológicas – Departamento de Ciências Biológicas Erechim – RS.

Alexandre Matthiensen

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves, Pesquisador Concórdia – SC

Helissara Silveira Diefenthaler

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Erechim, Docente, Departamento de Ciências da Saúde Erechim – RS.

Elisabete Maria Zanin

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Erechim, Docente, Departamento de Ciências Biológicas Erechim – RS.

Silvane Souza Roman

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Erechim, Docente, Departamento de Ciências da Saúde Erechim – RS.

RESUMO: A obesidade pode ser tratada por um número limitado de medicamentos e apesar de demonstrarem eficácia, produzem efeitos colaterais indesejáveis. Por conseguinte, a procura de terapias alternativas naturais está atraindo cada vez mais a atenção da ciência. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações no peso corporal de camundongos tratados com extrato de microalgas nas doses de 1500 e 2500mg.Kg⁻¹. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle (CTL), solução salina 0,9%; EXP 1, extrato de microalgas na dose 1500mg.Kg⁻¹ e EXP 2, extrato de microalgas na dose de 2500mg.Kg⁻¹. A administração ocorreu por via oral (gavagem) durante 30 dias e o peso corporal, consumos de água e ração foram avaliados. As microalgas liofilizadas foram obtidas de uma lagoa facultativa de tratamento terciário de dejetos de suínos. Foi observada uma redução no ganho de peso corporal dos grupos EXP 1 e EXP 2 em relação ao CTL. Além disso, houve diminuição no consumo de água nos grupos EXP 1 e EXP 2 quando comparado com CTL. O consumo de ração foi maior nos grupos EXP 1 e EXP 2 em relação ao CTL. Em conclusão, o extrato de microalgas pareceu ser eficaz na redução de peso ponderal de camundongos que tiveram elevada ingestão de alimento e, por este motivo, pode surgir como uma alternativa para a produção de formulações terapêuticas e profiláticas para casos de

sobrepeso.

PALAVRAS-CHAVE: Peso corporal. Obesidade. Microalgas. Camundongos.

1. INTRODUÇÃO

O sobrepeso é um problema de Saúde Pública, sendo considerado pela OMS uma epidemia silenciosa global e um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas (LOPES et al., 2012). Dentre essas doenças, podemos citar a hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, dislipidemia, doenças hepáticas, risco de aterosclerose, síndrome metabólica, altas taxas de mortalidade para doenças cardiovasculares, neoplásicas e ortopédicas (SANTOS et al., 2016). Além disso, o excesso de peso é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de resistência a insulina, sendo esta a principal característica do diabetes tipo 2 (FREITAS et al., 2014)

No Brasil, os dados indicam que 12,7% das mulheres e 8,8% dos homens adultos brasileiros são obesos, sendo mais relevante nas regiões Sul e Sudeste do país. Esta tendência de aumento da obesidade foi registrada para homens e mulheres de todas as faixas de renda, no período de 1974 a 1989, dados que ainda se aplicam nos dias atuais (BRASIL, 2006). Esse aumento na magnitude da obesidade e da velocidade da sua evolução ocorre devido ao fato do consumo alimentar ter sofrido intensas e rápidas modificações com progressiva substituição da escassez pelo consumo excessivo de alimentos. Essas mudanças no padrão alimentar são consideradas as causas centrais do aumento nas taxas de obesidade e doenças crônicas (RECH et al., 2016).

Neste sentido, os alimentos nutracêuticos se mostram como uma boa opção para a o problema da obesidade, uma vez que se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde e elevado valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na prevenção e/ou tratamento de doenças crônico-degenerativas. Tais produtos abrangem os nutrientes isolados, suplementos dietéticos e outros alimentos (MORAES; COLLA, 2006) e podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e antioxidantes (ANDLAUER; FÜRST, 2002).

Atualmente, existe uma grande demanda por microalgas nas indústrias nutracêutica e farmacêutica visto que a suplementação com dietas que possuam ácidos graxos, presentes em diversas espécies de microalgas, (DUARTE, 2010) podem ter um efeito benéfico em doenças como a obesidade. Diversas são as microalgas que podem ser encontradas em um consórcio algáceo, dentre elas a *Chlorella* spp., uma das espécies vendidas como suplemento alimentar (PEREIRA et al., 2012) que já foi examinada quanto aos seus efeitos biológicos na atenuação dos fatores de risco metabólicos, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia e doença hepática gordurosa não alcoólica. *Scenedesmus* spp. é também uma espécie de microalga verde comum de

água doce, conhecida pelo seu valor nutricional e considerada como potencial aditivo alimentar, mas para as quais não existe produção comercial (KUMAR et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações no peso corporal de animais tratados pela via gavagem com extrato de microalgas contendo as espécies *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp., nas doses de 1500mg.Kg⁻¹ e 2500mg.Kg⁻¹ em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da biomassa e do extrato microalgal

As microalgas foram obtidas de uma lagoa facultativa empregada como processo de tratamento terciário de dejetos suínos, localizada na EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC). O cultivo foi realizado em escala piloto em uma casa de vegetação sob luz natural (90-733 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ambiente (15,4-48 °C). Após 7 dias a biomassa foi separada por centrifugação (EVODOS, T10, Holanda). As células foram ressuspensas em água livre de nutrientes, e após 25 dias de privação nutricional a biomassa foi novamente centrifugada e liofilizada.

Para a obtenção do extrato, foi determinada a quantidade de biomassa microalgal liofilizada necessária para a obtenção das doses de 1500mg.Kg⁻¹ e 2500mg.Kg⁻¹ e, em seguida, a biomassa foi ressuspensa em solução salina e o material processado em equipamento de ultrassom (QSonica Ultrasonic Processor Q700) em banho de gelo, com o objetivo de propiciar o rompimento celular e liberação do conteúdo intracelular. Após o tempo de sonificação, os extratos foram centrifugados a 2500rpm, por 5 min, e o sobrenadante foi administrado nos animais conforme o peso individual de cada animal.

2.2. Animais de experimentação e cuidados éticos

Para o teste foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com 60 dias de idade, pesando entre 30 e 40g. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI - Erechim, sob protocolo nº 30. No final do experimento os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico Zoletil IM®.

2.3. Delineamento experimental

Para a realização do experimento foram utilizados 23 camundongos provenientes do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade. Os animais foram acondicionados em caixas separadas, a 22 ± 2°C e um ciclo de 12h luz/12h escuro, com acesso à água e alimentação ad libitum.

Os animais foram divididos em 3 grupos, sendo eles: grupo controle (CTL) (n=8), que recebeu solução salina 0,9%, na dose de 10mL.Kg⁻¹ via gavagem; grupo EXP 1 (n=8), recebeu o extrato de microalgas na dose 1500 mg.Kg⁻¹ via gavagem e o grupo EXP 2 (n=7), que recebeu o extrato de microalgas na dose de 2500mg.Kg⁻¹, via gavagem. A administração dos tratamentos nos grupos ocorreu diariamente, durante 30 dias consecutivos e o peso corporal e os consumos de água e ração foram avaliados a cada 7 dias.

2.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão (Média \pm DP). O tratamento estatístico foi realizado através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, usando software validado (GraphPad Prism6®). Considerou-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Peso corporal

Na Figura 1, pode-se observar uma redução significativa no ganho de peso corporal dos camundongos do grupo EXP 1 logo no início do tratamento (1° ao 7° dia) em relação ao CTL, mas que foi recuperada no período seguinte (7 ao 14° dia), porém sem diferença significativa. Entretanto, observando os resultados obtidos ao longo de todo o tratamento (1 ao 30° dia), pode-se observar uma redução significativa no ganho de peso corporal, tanto no grupo EXP 1 como no grupo EXP 2 em relação ao grupo CTL.

Estes resultados sugerem que o extrato microalgal nas doses de 1500 e 2500mg.Kg⁻¹ pode causar indícios de toxicidade no tratamento subcrônico de 30 dias, baseado na informação de que a redução na massa corporal é um sinal de toxicidade sistêmica (TEO et al., 2002).

Por outro lado, estudos clínicos e experimentais realizados por Queiroz (2014) em ratos obesos demonstraram que a administração de *Chlorella vulgaris* pode normalizar o peso corporal. Vários estudos com *Chlorella* spp. vêm demonstrando efeitos farmacológicos, se utilizadas com cautela. Nesse sentido, essa alga unicelular de água doce rica em nutrientes e comumente utilizada como suplemento alimentar surge como alternativa terapêutica e profilática para a obesidade (QUEIROZ, 2014).

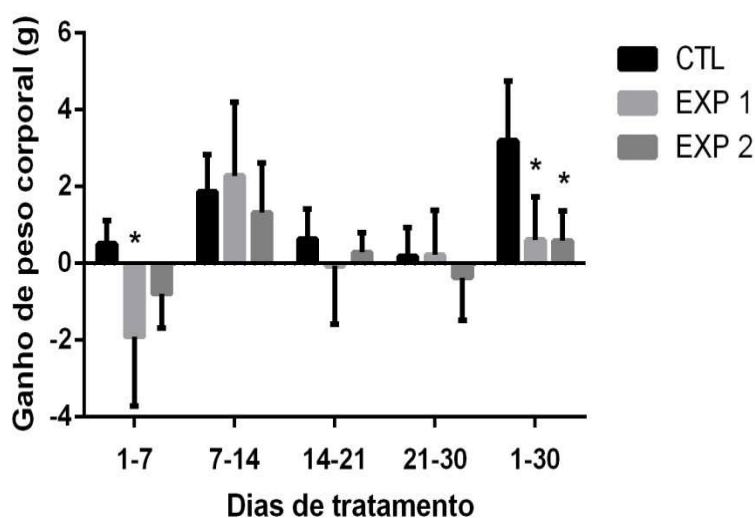
Queiroz (2014) encontrou valores significativamente menores de glicemia, determinados pelos testes de tolerância à glicose e à insulina nos animais obesos tratados com *Chlorella vulgaris*, sugerindo melhora na sensibilidade à insulina. Outros estudos da administração da *Chlorella vulgaris* em animais demonstraram efeitos benéficos a nível de inúmeras funções bioquímicas, tais como efeito

antioxidante e diminuição dos níveis de glicose em roedores diabéticos (DUARTE, 2010). Estudos realizados em coelhos revelaram melhoramentos na atividade anti-inflamatória e diminuição dos níveis de colesterol após suplementação com *C. vulgaris* (LEE et al, 2010).

A suplementação em dietas com níveis de PUFA (ácidos graxos poli-insaturados), presentes em diversas espécies de microalgas, parece ter um efeito benéfico, como em doenças como a artrite reumatóide, doença de Chron, fibrose cística, obesidade, aterosclerose, entre outras (DUARTE, 2010; ROSA, 2014). Simultaneamente, a síntese de carotenóides pela maioria das microalgas é, também, um caminho possível para um suplemento dietético (MIMOUNI et al., 2012).

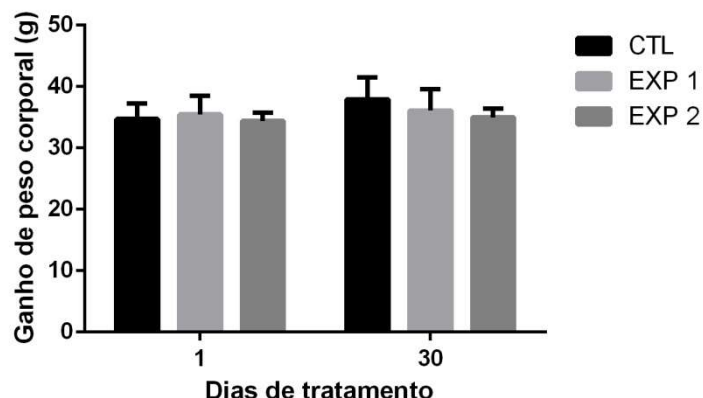
Marques (2012) testou uma suplementação concomitante de ácido linoleico, presente em *Chlorella* spp., (FERNÁNDEZ et al., 2013; BENÍTEZ et al, 2015) e de fitosteróis e concluiu que esta associação apresentou efeitos biológicos benéficos no controle do ganho de peso e da glicemia em jejum, em camundongos recebendo dieta hiperlipídica. Esses estudos incentivam a continuação de pesquisas que investiguem os efeitos sinérgicos de ácido linoleico provenientes de microalgas e fitosteróis, com posterior desenvolvimento de nutracêuticos ou de alimentos funcionais.

Figura 1: Análise de ganho de peso corporal ao longo do tratamento dos animais de diferentes grupos durante 30 dias



Os dados estão expressos em média±DP. * Diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,05$.

Figura 2: Análise do peso corporal dos animais de diferentes grupos no início e no final do tratamento



Os dados estão expressos em média±DP.

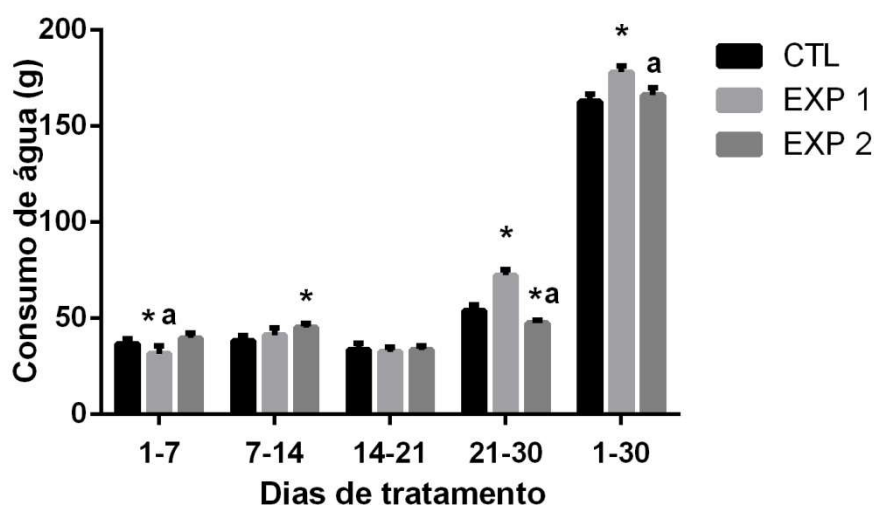
3.2. Consumo de água e de ração

Conforme os dados da Figura 3, pode-se observar que houve uma diminuição significativa no consumo de água dos animais do grupo EXP 1 quando comparado com os grupos CTL e EXP 2 no início do tratamento (1^o ao 7^o dia), mas que esta redução foi recuperada ao longo (1-30) e ao final do tratamento (21-30), aumentando significativamente este consumo em relação ao grupo CTL. Ainda se constata que o grupo EXP 2 apresentou um aumento significativo no consumo de água quando comparado com o grupo CTL na metade do tratamento (7-14), entretanto, teve uma redução significativa ao longo do tratamento (1-30) em relação ao grupo CTL. Além disso, o grupo EXP 2 manteve a redução do consumo de água de maneira significativa no final do tratamento (21-30) quando comparado aos grupos CTL e EXP 1.

A partir desses resultados, é possível constatar que o grupo EXP 1, tratado com a dose de 1500mg.Kg⁻¹, teve maior dificuldade de adaptação à administração do extrato no início do experimento, o que levou uma diminuição no consumo de água. No entanto, no término da exposição, foi observado aumento no consumo de água dos animais. Os animais que receberam o extrato de microalgas na dose de 2500mg.Kg⁻¹ também apresentaram diminuição neste consumo.

Essas alterações em animais de experimentação são, em muitos casos, inevitáveis, pois são reflexo de fatores de indução de estresse, que possui natureza emocional ou psicológica. Por consequência, quando não se alcança a habituação dos animais às condições de perturbação, que incluem como, por exemplo, o manuseio dos camundongos no momento da administração das substâncias estudadas, pode-se perceber a presença de respostas de má adaptação, o que inclui o baixo consumo hídrico (ANDRADE et al., 2002).

Figura 3: Consumo de água dos animais de diferentes grupos durante 30 dias.



Os dados estão expressos em média±DP. * Diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e ^a diferença significativa entre os grupos EXP 1 e EXP 2, com $p < 0,05$.

A Figura 4 mostra o consumo de ração pelos diferentes grupos durante o experimento. Podemos observar um aumento constante no decorrer do experimento no consumo do grupo EXP 2 quando comparado com o grupo CTL, em todos os períodos registrados (1-7; 7-14; 14-21; 21-30; 1-30). Já o grupo EXP 1 consumiu menos ração nos períodos do 7-14 e 14-21 dias de tratamento em relação aos grupos CTL e EXP 2. Em contrapartida, foi observado um aumento no consumo de ração no grupo EXP 1 no início (1-7), final (21-30) e ao longo do experimento (1-30) quando comparado ao grupo CTL, o que representa uma recuperação neste consumo pelo grupo EXP 1.

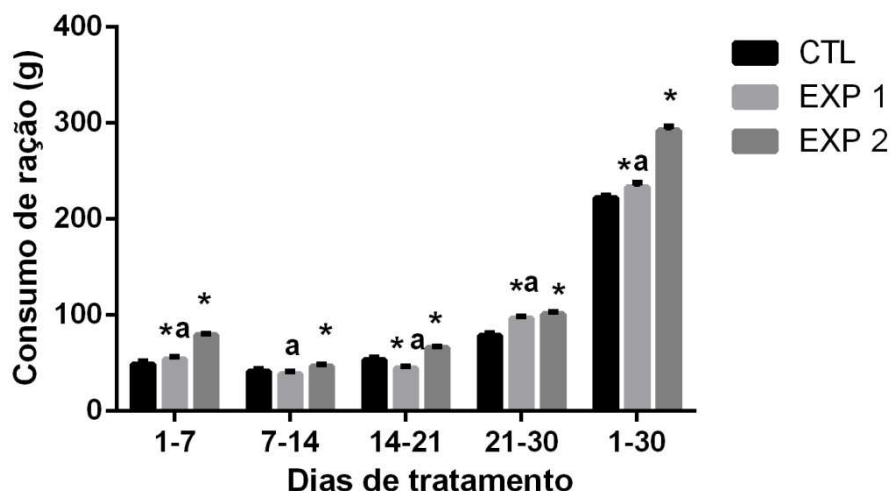
Estes resultados indicam que a administração subcrônica do extrato de microalgas nas doses de 1500mg.Kg^{-1} e 2500mg.Kg^{-1} promoveu maior ingestão de ração pelos animais destes grupos, porém sem aumentar diretamente o peso corporal dos camundongos. Esses resultados se assemelham aos encontrados em um estudo clínico e experimental realizado por Vecina et al. (2014) em ratos obesos, onde foi possível verificar que a administração de *Chlorella vulgaris* pode regularizar os níveis séricos de colesterol e de glicose e reduzir a hipertensão e, ainda, impede o alto teor de gordura induzida por dieta, reduzindo triglicérides, colesterol e níveis de ácidos graxos livres. Da mesma forma, a administração desta espécie de microalgas foi capaz de normalizar o peso corporal em estudos realizados (QUEIROZ, 2014).

Extratos de *Chlorella pyrenoidosa* já estão sendo utilizados pela população como uma alternativa de tratamento para a obesidade, por ser um produto natural e que possui menos efeitos adversos, comparado com a terapia medicamentosa convencional para esta doença (SIMÃO, 2013). No estudo de Cherng e Shih (2006), a administração de *Chlorella* em camundongos mostrou afetar algumas funções bioquímicas e fisiológicas, tais como a melhora a sensibilidade à insulina em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Da mesma forma, Lee e Kim (2009)

relataram que a ingestão dessa espécie de microalga pode prevenir a resistência à insulina em ratos Wistar alimentados com uma dieta rica em gordura. Além disso, Hidaka et al. (2004) estudou a ação da microalga *Chlorella pyrenoidosa* no controle do ganho de peso corporal de ratas ovariectomizadas e analisando os resultados encontrados sugeriu-se que a suplementação com *C. pyrenoidosa* pode ser útil para controlar o peso corporal e melhorar o metabolismo lipídico de mulheres na menopausa, período no qual é comum ocorrer aumento de peso.

A obesidade pode atualmente ser tratada por um número limitado de medicamentos, e apesar de demonstrarem alguma eficácia reduzindo o peso corporal e melhorando parâmetros metabólicos, eles produzem um bom número de efeitos colaterais indesejáveis. Por conseguinte, a procura de terapias alternativas, como os produtos naturais, está atraindo cada vez mais a atenção da ciência. Neste contexto, as microalgas surgem como um tratamento alternativo e profilático contra complicações relacionadas à obesidade (VECINA et al., 2014).

Figura 4: Consumo de ração dos animais de diferentes grupos durante 30 dias.



Os dados estão expressos em média±DP. * Diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e ^a diferença significativa entre os grupos EXP 1 e EXP 2, com $p < 0,05$.

4. CONCLUSÃO

O extrato de microalgas, contendo as espécies *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp, nas doses de 1500mg.K g^{-1} e 2500mg.K g^{-1} , pareceu ser eficaz em reduzir o peso corporal de camundongos que tiveram elevada ingestão de alimento e, por este motivo, esse tipo de suplemento alimentar pode surgir como uma alternativa para a produção de formulações terapêuticas e profiláticas para casos de sobrepeso.

REFERÊNCIAS

- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. **Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook.** Food Research International, v. 35, p. 171-176, 2002.
- ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.
- BENÍTEZ, L.T.; ARGUMEDO, D. H.; ALAYÓN, M. A.; SALDARRIAGA, C. R. C. **Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas,** Revista Facultad de Ingeniería, v. 24, n. 39, p. 43-54, 2015.
- CHERNG, J. Y.; SHIH, M. F. **Improving glycogenesis in Streptozocin (STZ) diabetic mice after administration of green algae Chlorella.** Life Sciences, v. 78, p. 1181 – 1186, 2006.
- DUARTE, D. R. S. **Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2010.
- FERNÁNDEZ, D. R.; CHICA, C.; PARRA, M. **Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación.** Revista Elementos, n. 3, 2013.
- FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. **Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico.** Revista Brasileira de Ciência e Movimento, v. 22, n. 3, p. 139-147, 2014.
- HIDAKA, S.; OKAMOTO, Y.; ARITA, M. **A hot water extract of Chlorella pyrenoidosa reduces body weight and serum lipids in ovariectomized rats.** Phytotherapy Research, v. 18, p.164–168, 2004.
- KUMAR, S. A.; MAGNUSSON, M.; WARD, L. C.; PAUL, N. A.; BROWN, L. **A Green Algae Mixture of Scenedesmus and Schroederiella Attenuates Obesity-Linked Metabolic Syndrome in Rats.** Nutrients, v. 7, p. 2771-2787, 2015.
- LEE, H. S.; KIM, M. K. **Effect of Chlorella vulgaris on glucose metabolism in Wistar rats fed high fat diet.** Journal of Medicinal Food, v. 12, n. 5, p. 1029-1037, 2009.
- LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. **Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae.** Bioresource technology, v. 101, n. 1, p. S75-S77, 2010.

LOPES, P. C. S.; PRADO, S R. L A.; COLOMBO, P. **Fatores de risco associados à obesidade e sobrepeso em crianças em idade escolar.** Revista Brasileira de Enfermagem, v.63, n.1, 2010.

MARQUES, A. C.; ROMANELLI, N.; DRAGANO, V.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. **Redução do peso e da glicemia resultante da suplementação de ácido linoleico conjugado e fitosteróis à dieta hiperlipídica de camundongos.** Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.2, p.374-380, 2012.

MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; PASQUET, V.; MATHIEU, M.; PICOT, L.; BOUGARAN, G.; CADORET, J. P.; MORANT-MANCEAU, A.; SCHOEFS, B. **The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest.** Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 13, n. 15, p. 2733-2750, 2012.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde: Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica, n. 12 Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

MORAES, F. P; COLLA, L. M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n.2, p. 109-122, 2006.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; PINO, F. B.; MESKO, M. F.; NETO, P. C. **Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas.** Química Nova, v. 10, p. 2013-2018, 2012.

QUEIROZ, M. L. S.; VECINA, J. F.; OLIVEIRA, A. G.; ARAUJO, T. G.; BAGGIO, S. R.; TORELLO, C. O.; ABDALLA SAAD, M. R. **Chlorella modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice.** Life Sciences, v. 95, n. 1, p. 45-52, 2014.

RECH, D. C.; BORFE, L.; EMMANOUILIDIS, A.; GARCIA, E. L.; KRUG, S. B. F. **As políticas públicas e o enfrentamento da obesidade no Brasil: uma revisão reflexiva.** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, v. 6, p. 1-10, 2016.

ROSA, P. D. **Otimização da biossíntese de óleo microbiano pela levedura Candida zeylanoides QU 33.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

SANTOS, I. J. L.; MORAES, S. R.; SOUZA, F. N; ELLINGER, V. C M.; SILVA, C. M. S. **Avaliação da prevalência de obesidade e sobrepeso entre estudantes de Medicina da Universidade Severino Sombra, Vassouras – RJ.** Revista Fluminense de Extensão Universitária, v. 6, n. 1, p. 13-20, 2016.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade.** 182 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras. 2013.

TEO, S., STIRLING, D., THOMAS, S., HOBERMAN, A., KIORPES, A., & KHETANI, V. **A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats.** *Toxicology*, 179(3), 183-196, 2002.

VECINA, J. F.; OLIVEIRA, A. G.; ARAUJO, T. G.; BAGGIO, S. R.; TORELLO, C. O.; SAAD, M. J.; QUEIROZ, M. L. **Chlorella modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice.** *Life Sciences*, v. 95, n. 1, p. 45-52, 2014.

ABSTRACT: Obesity can be treated by a limited number of drugs and, despite their effectiveness, produce undesirable side effects. Therefore, a search for alternative therapies is attracting more and more the attention of science. The objective of this study was to evaluate the body weight of mice supplemented with extract of microalgae at doses of 1500 and 2500 mg.Kg⁻¹. The animals were divided into three groups: control (CTL), saline solution 0.9%; EXP 1, extract of microalgae at the dose 1500mg.Kg⁻¹ and EXP 2, extract of microalgae at the dose of 2500mg.Kg⁻¹. The administration occurred orally (gavage) during 30 days and body weight, water and feed intake were evaluated. The freeze-dried microalgae used in the experiment were obtained from a facultative lagoon of tertiary treatment of swine manure. There was a reduction in the body weight of the EXP 1 and EXP 2 groups in relation to the CTL. In addition, there was a decrease in the water consumption of the EXP 1 group, comparing with CTL and EXP 2. Dehydration consumption was higher in the EXP 2 group compared to CTL and also higher in the EXP 1 group. In conclusion, the microalgae extract seems to be effective in reducing weight of mice that had high food intake and, for this reason, may arise as an alternative for the production of therapeutic and prophylactic formulations for cases of overweight.

KEYWORDS: Body weight. Obesity. Microalgae. Mice.

CAPÍTULO XVI

RESPOSTA TRANSCRICIONAL DE *Mycoplasma* *hyopneumoniae* A CONDIÇÕES DE ESTRESSE in vitro

**Gabriela Merker Breyer
Franciele Maboni Siqueira
Irene Silveira Schrank**

RESPOSTA TRANSCRICIONAL DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A CONDIÇÕES DE ESTRESSE *in vitro*

Gabriela Merker Breyer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.
Porto Alegre – RS.

Franciele Maboni Siqueira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.
Porto Alegre – RS.

Irene Silveira Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia.
Porto Alegre – RS.

RESUMO: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, possui genoma reduzido, com poucos mecanismos de regulação conhecidos. Apesar da escassez de ferramentas moleculares para estudos *in vitro*, trabalhos anteriores demonstraram que *M. hyopneumoniae* é capaz de responder a nível transcricional a condições de estresse. Objetivando o melhor entendimento dos mecanismos que regulam sua expressão, este trabalho visa identificar genes alvo para o controle *in vitro* das condições de estresse térmico e oxidativo, confirmando a expressão diferencial de genes preditos como envolvidos nestas condições. Portanto, foram selecionados nove genes considerados diferencialmente expressos em análises anteriores, sendo cinco genes regulados na condição de estresse térmico (*glpK*, *glpF*, *dnaK*, *dnaJ* e *oppC*), e quatro na condição de estresse oxidativo (*atpB*, *glyS*, *mgIA*, *ftsY*). Foram realizados cultivos de *M. hyopneumoniae* em condições de cultivo controle, de estresse térmico e de estresse oxidativo. O RNA total de cada cultivo foi extraído e empregado na síntese de cDNA, através de reações de transcrição reversa (RT). Os cDNAs foram empregados como molde na reação de PCR quantitativo (qPCR). Todos os genes alvo foram testados nas três condições de cultivo analisadas. Foi possível demonstrar expressão diferencial em cinco genes na condição de estresse térmico, e em três genes na condição de estresse oxidativo. Estes resultados sugerem a ocorrência da indução da expressão gênica diferencial em *M. hyopneumoniae* frente às condições de estresse testadas *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: regulação gênica; RT-qPCR; estresse térmico; estresse oxidativo; cultivo celular.

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma é um gênero de bactérias da classe Mollicutes, que compreende um grupo de mais de 200 espécies, cuja principal característica é a ausência de parede celular. São considerados os menores e mais simples organismos autorreplicativos já identificados, possuindo genomas pequenos e alto conteúdo A+T (SIMIONATTO et al., 2013). Morfologicamente, são relacionadas a bactérias Gram-

negativas, por apresentarem apenas uma membrana trilaminar simples. Entretanto, filogeneticamente, são relacionadas a bactérias Gram-positivas, compartilhando um ancestral comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF et al., 2004). A evolução da classe Mollicutes teria ocorrido por degeneração ou redução do genoma de bactérias Gram-positivas com alto conteúdo A+T, seguida de perda de sequências genômicas (WOESE, 1987). Concomitante a isso, o modo de vida parasitário destas bactérias permitiu a compactação de seu genoma (RAZIN, 1999).

Muitos micoplasmas fazem parte da microbiota normal do hospedeiro, sendo alguns patogênicos. Comumente, micoplasmas patogênicos não causam doenças graves, mas sim infecções de curso crônico que podem ser agravadas através de infecções oportunistas por outros patógenos.

A espécie *M. hyopneumoniae* está associada a suínos, sendo conhecida por ser o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína. Esta doença afeta o trato respiratório destes animais, sendo caracterizada por altas taxas de morbidade e baixas taxas de mortalidade, gerando significativas perdas econômicas na área da suinocultura, devido ao aumento do uso de medicações e diminuição do desempenho animal. Infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em suínos em grande parte das áreas de produção em todo mundo, estando presente em 38-100 % dos animais (MAES et al., 2008; SIMIONATTO et al., 2013).

Até o momento, seis linhagens de *M. hyopneumoniae* tiveram seus genomas completamente sequenciados: as patogênicas, 7448, 232, 7422, 168 e 168-L, e a não-patogênica, J (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2013; LIU et al., 2011; LIU et al., 2013). A linhagem de *M. hyopneumoniae* 7448 foi utilizada em diversos trabalhos por nosso grupo, com o objetivo de melhor caracterizar seu genoma, organização gênica e elementos reguladores.

Os mecanismos de regulação gênica em *M. hyopneumoniae* ainda são pouco conhecidos e, por se tratar de um micro-organismo com genoma reduzido, esta bactéria possui poucos genes que sabidamente estão envolvidos na regulação gênica. Entretanto, diversos estudos realizados pelo nosso grupo apontam a presença de possíveis elementos reguladores no seu genoma, tais como promotores (WEBER et al., 2012), terminadores (FRITSCH et al., 2015), small RNAs (sRNAs) (SIQUEIRA et al., 2016) e sequências repetitivas (CATTANI et al., 2016). Estes elementos, frente a situações de estresse, podem atuar na regulação da expressão gênica desta bactéria, com o objetivo de manter a viabilidade celular. Portanto, mais estudos nesta área são necessários para melhor compreender o perfil transcricional dos genes de *M. hyopneumoniae* frente a condições de estresse. Para isso, os protocolos de indução de condições de estresse *in vitro* devem estar bem estabelecidos, para melhor mimetizarem o que ocorre na célula *in vivo*.

Análises transcritômicas já realizadas em *M. hyopneumoniae* determinaram os níveis de transcrição de alguns genes deste micro-organismo, possibilitando melhor compreender a estrutura do genoma e os mecanismos de infecção do mesmo. Em análise do transcritoma total de *M. hyopneumoniae* em condições de cultivo controle, observou-se que a maioria dos genes que compõem o genoma desta

bactéria (92%) são constitutivamente expressos (SIQUEIRA et al., 2014). Também já foram realizadas análises de microarranjo em *M. hyopneumoniae* em condições de cultivo atípicas (MADSEN et al., 2006A; MADSEN et al., 2006B; SCHAFFER et al., 2007; ONEAL et al., 2008; MADSEN et al., 2008), permitindo a determinação do perfil de transcrição dos genes deste organismo em condições de estresse para a célula.

O presente trabalho tem como objetivo a identificação de genes alvo para o controle *in vitro* das condições de estresse térmico e oxidativo, através da confirmação da expressão diferencial de genes preditos como envolvidos nestas condições em *M. hyopneumoniae* 7448, através de análises de RT-qPCR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Projeção dos primers

Para confirmar a indução de estresse nos cultivos realizados foram selecionados genes alvo para o controle *in vitro* das condições de estresse térmico e oxidativo, baseado na literatura existente. Foram projetados primers para nove genes, apontados como diferencialmente expressos em análises de microarranjo (MADSEN et al., 2006B; SCHAFFER et al., 2007), sendo eles: cinco genes regulados positivamente na condição de estresse térmico (*glpK*, *glpF*, *dnaK*, *dnaJ* e *oppC*), e quatro genes regulados positiva (*atpB*, *glyS* e *mgIA*) ou negativamente (*ftsY*) na condição de estresse oxidativo (Tabela 1). Os alvos foram testados nas três condições de cultivo analisadas neste trabalho.

Estes genes estão envolvidos em: transporte celular (*atpB*, *mgIA* e *oppC*), síntese de tRNAs (*glyS*), divisão celular (*ftsY*), atuam como proteínas de choque térmico (*dnaK* e *dnaJ*), e participam de rotas metabólicas (*glpK* e *glpF*).

Tabela 1. Características dos primers empregados.

Regulação*	Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Fragmento (pb)	Eficiência **
↑ EO	<i>atpB</i>	atpB F	TCAGGCGTCCAGTGAATCTATC	56.3	186	1,878
		atpB R	TGCTTCATCCTGATTACCTCC	54.5		
↑ EO	<i>glyS</i>	glyS F	GGGTGGGGTGAATTGATTGG	56.3	165	1,865
		glyS R	CGCCAACATTA AACGATCAAGG	54.7		
↑ EO	<i>mglA</i>	mglA F	CAACCGCAAGTTTCATCCTCG	56.9	158	1,878
		mglA R	ACCCGATCAGCGATTCGATAAC	58.9		
↓ EO	<i>ftsY</i>	ftsY F	GTCAAAATGGGGTTTCGCAGG	57.1	165	1,937
		ftsY R	CATCCATCGCTTCGCCAAGTC	58.7		
↑ CT	<i>dnaK</i>	dnaK F	CTGCTCCACGAGGTCTTCCCC	62.0	181	1,868
		dnaK R	TCACGATTTTCTCGGCTTCCTG	57.5		
↑ CT	<i>dnaJ</i>	dnaJ F	GTCGAGGTTCCCAGCCCAACC	62.7	173	1,953
		dnaJ R	TGACGGGGACTAAATTCGGGG	59.1		
↑ CT	<i>oppC</i>	oppC F	CCGATTTACACAAGCCGATCCTG	58.4	178	1,861
		oppC R	GAATCTGCCAGCGATTTGGG	56.7		
↑ CT	<i>glpK</i>	glpK F	GCAGGCAGCAAAAACAAAGGCG	60.6	158	1,888
		glpK R	CACAAAAATCACTCGTGCGGCG	59.6		
↑ CT	<i>glpF</i>	glpF F	GATCCTAGTGAAAGTCCAAGTG	60.8	174	1,889
		glpF R	CTGCCATCATAACAAGCCCTG	62.4		
***	<i>pcrA</i>	pcrA F	GCATGATTTTCCCGATCTCCAG	56.0	184	1,872
		pcrA R	CTTCAGCTCCCCTTTCATTGGC	58.5		
	MHP7448_333	333 F	TGGGCAATCAAGAAGCAAC	53.6	166	1,918
	333 R	TGAAAACGGAAAACACCTTG	51.5			

* Resposta a nível transcricional do gene à condição de estresse oxidativo (EO) (SCHAFER et al., 2007) ou térmico (CT) (MADSEN et al., 2006B) quando comparado ao cultivo controle, de acordo com análises de microarranjo. As setas indicam regulação positiva (↑) ou negativa (↓).

** A eficiência dos primers foi calculada pelo software LinRegPCR com base nos resultados de qPCR.

*** Os primers do gene *pcrA* foram utilizados nas reações de PCR para confirmação do tratamento com DNase e da síntese de cDNA. Os primers do gene MHP7448_333 foram utilizados na qPCR, como gene normalizador.

Para garantir que a eficiência dos primers construídos não foi um fator que influenciou os resultados de expressão relativa dos genes analisados, a mesma foi verificada através do software LinRegPCR. Os valores de eficiência dos primers estão descritos na Tabela 1.

2.2. Linhagem bacteriana e condições de cultivo

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados com a linhagem patogênica 7448 de *M. hyopneumoniae*, isolada de um suíno que apresentava pneumonia enzoótica suína (VASCONCELOS et al., 2005).

Os cultivos foram realizados em meio Friis líquido (FRIIS, 1975), em três condições diferentes: i) controle: cultivado a 37 °C por 24 h, sob leve agitação; ii) estresse térmico: cultivo igual ao controle, seguido de incubação a 30 °C por 2 h e a 42 °C por 30 min (MADSEN et al., 2006B); e, iii) estresse oxidativo: cultivo igual ao controle, seguido da adição de 1 % de peróxido de hidrogênio e incubação a 37 °C por 15 min (SCHAFER et al., 2007). Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas.

O crescimento de *M. hyopneumoniae* pode ser visualizado pela acidificação do meio gerada pela oxidação da glicose, causando alteração do pH e mudança de coloração do meio Friis para amarelo, devido a presença do indicador de pH vermelho fenol.

2.3. Extração e quantificação de RNA de *M. hyopneumoniae*

Para cada condição de cultivo foram realizadas extrações de RNA total de *M. hyopneumoniae* a partir de 30 mL de cultivo utilizando o kit Illustra™ RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo a descrição do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose 1 %.

Os RNAs extraídos foram nomeados da seguinte forma: C1 e C2 (extrações em condição de cultivo controle); CT1 e CT2 (extrações em condição de estresse térmico); e, E01 e E02 (extrações em condição de estresse oxidativo). E foram quantificados através do kit de quantificação de RNA Qubit® RNA HS Assay kit (Thermo Fischer Scientific) pelo equipamento Qubit® Fluorometer.

Para eliminação de DNAs contaminantes nas amostras de RNA foi realizado um tratamento com DNase I (50 U/μL – Fermentas) em 3 μg de cada RNA, em um volume total de 30 μL de reação. Os RNAs extraídos foram tratados com 40 U de DNase I, e incubados a 37 °C por 30 min, seguidos de adição de EDTA e uma incubação a 65 °C por 10 min, para inativação da enzima. Após o tratamento, a qualidade e a integridade do RNA tratado foi novamente verificada através de gel de agarose 1 %.

Posteriormente, foram realizadas reações em cadeia de polimerase (PCR) com os RNAs tratados, para confirmar a eficiência do tratamento, ou seja, a ausência de DNA contaminante. O par de primers do gene *pcrA* foi utilizado nestas reações (Tabela 1).

2.4. Síntese de cDNA e PCR quantitativo

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através de reações de transcrição reversa (RT) para cada RNA extraído e tratado com DNase I.

Para cada reação, com um volume final de 30 μL, foi utilizada 500 ng de RNA total, 132,5 ng de primer randômico e 10 mM de dNTPs, incubados a 65 °C por 5 min, e imediatamente incubado no gelo, para evitar a formação de estruturas secundárias no RNA. Posteriormente, foi adicionado 10X Tampão First Strand, e 0,1 M de DTT, sendo incubados a 37 °C por 2 min. Por fim, foi adicionado 200 U da enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Invitrogen) e incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. Os controles negativos das reações de síntese foram realizados em paralelo, porém sem a adição de MMLV-RT. Os cDNAs foram diluídos 1:5 com água DEPC, totalizando 100 μL, e armazenados a -20 °C. Para confirmar a síntese de fita dupla foi realizada

uma reação de PCR, utilizando como molde cada cDNA sintetizado. Para estas reações foram utilizados os primers do gene pcrA (Tabela 1).

Os níveis de expressão dos genes alvo foram verificados através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o sistema Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix – UDG (Invitrogen).

Cada reação foi composta de 1 µL de cDNA diluído, 10 pmol de cada primer, 7,5 µL de Platinum™ SYBR™, e 1 µL do reagente ROX (0,1 X), totalizando um volume final de 15 µL. As condições utilizadas para amplificação foram as seguintes: uma etapa de desnaturação a 90 °C por 2 min, seguida de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 min. O valor de corte (threshold) foi determinado manualmente, em uma região linear da curva de amplificação logarítmica. A eficiência de cada par de primers foi analisada através de curva de melting.

As reações aqui descritas foram realizadas juntamente com os seguintes controles do método: replicatas de reações sem cDNA (NTC) como controle negativo da reação; e reações com os cDNAs negativos de cada uma das extrações realizadas (NRTC) como controle da RT realizada previamente.

O cálculo de expressão relativa dos mRNAs foi realizado através do método $2^{-\Delta CT}$, corrigido de acordo com o valor de eficiência dos primers. Os valores de expressão dos genes controles das condições de estresse foram normalizados em relação ao valor de expressão do gene MHP7448_0333 (MADSEN et al., 2008; MOITINHO-SILVA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2014). Para cada gene alvo foram realizadas triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. As análises estatísticas da expressão relativa dos genes alvo foram realizadas através do software GraphPad Prism 6, utilizando o teste One-way ANOVA by Tukey's multi comparision ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de RNA

A qualidade dos RNAs de *M. hyopneumoniae* extraídos em cada condição de cultivo foi verificada através de géis de agarose 1 %, onde foi possível observar a presença das bandas 16S e 23S de RNA ribossômico, indicando a integridade das amostras (Figura 1A). As concentrações dos RNAs extraídos variaram de 120 a 380 ng/µL.

Os RNAs foram tratados com DNase I para eliminação de DNAs remanescentes, e a qualidade dos RNAs após o tratamento enzimático e térmico foi mantida (Figura 1B). Além disso, para confirmar o tratamento com DNase I, os RNAs tratados foram utilizados como molde em reações de PCR. Cada amostra de RNA foi testada em uma reação juntamente com um controle positivo da reação de PCR (DNA de *M. hyopneumoniae*), e um controle negativo da reação de PCR (reação sem molde). Todos os tratamentos de eliminação de DNAs foram satisfatórios, uma vez que não houve amplificação nas reações utilizando RNA, indicando a ausência de

DNA nas amostras (Figura 1C).

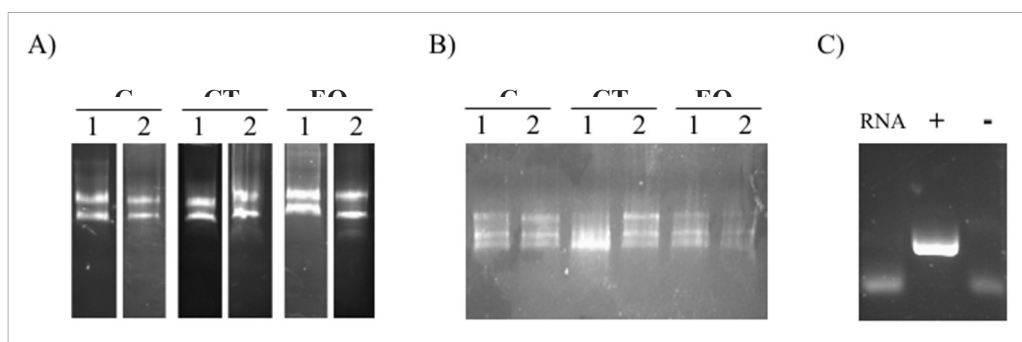


Figura 1. Verificação da qualidade dos RNAs extraídos em cada condição através de eletroforese em gel de agarose, A) antes e B) após o tratamento com DNase I. As condições de cultivo estão indicadas por: cultivo controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). Os números 1 e 2 indicam as duplicatas biológicas. C) Exemplo da confirmação do tratamento com DNase I por reação de PCR, empregando os primers do gene *pcrA* de *M. hyopneumoniae* 7448 (banda de 184 pb). As canaletas indicam a reação com RNA, o controle positivo da reação de PCR (+) e o controle negativo da reação de PCR (-).

3.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir de cada amostra de RNA tratado foi confirmada através de reações de PCR. Cada cDNA foi testado juntamente com um controle negativo da reação de RT, um controle positivo da reação de PCR (DNA de *M. hyopneumoniae*) e um controle negativo da reação de PCR (reação sem molde). Em todas as reações de RT houve a síntese de cDNA, como pode ser observado no exemplo ilustrado na Figura 2.

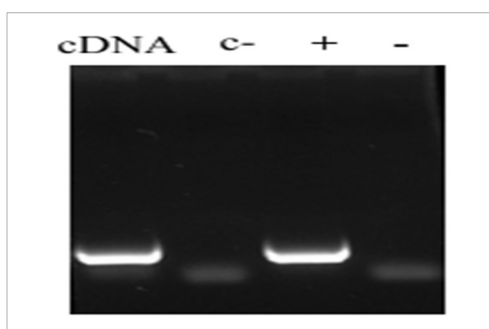


Figura 2. Exemplo da confirmação da síntese de cDNA por reação de PCR, empregando os primers do gene *pcrA* de *M. hyopneumoniae* 7448 (banda de 184 pb). As canaletas indicam a reação com cDNA, a reação controle da reação de RT (c-), o controle positivo da reação de PCR (+) e o controle negativo da reação de PCR (-).

3.3. Confirmação da indução das condições de cultivo em estresse

Anteriormente, através de microarranjo, foi determinado o perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* 232 submetido a estresse térmico (MADSEN et al., 2006B),

onde foi demonstrado que os genes de *M. hyopneumoniae* 232 regulados positivamente estão relacionados ao metabolismo e enovelamento de proteínas. Os genes regulados negativamente nesta condição estão associados à tradução e replicação de DNA, indicando que mudanças na temperatura tornam a fisiologia celular mais lenta (MADSEN et al., 2006B).

Dos possíveis genes confirmatórios da condição de estresse térmico testados no presente trabalho, quatro (*glpK*, *glpF*, *dnaK* e *dnaJ*) tiveram sua expressão relativa elevada quando comparados ao cultivo controle ($P < 0,05$), corroborando com os resultados obtidos anteriormente (MADSEN et al., 2006B), sendo, portanto, genes adequados para o controle para tal condição. O gene *oppC* apresentou diminuição nos níveis de expressão quando comparado ao cultivo controle, comportamento divergente ao determinado pelo microarranjo realizado anteriormente, onde sua expressão foi elevada (MADSEN et al., 2006B) (Figura 3).

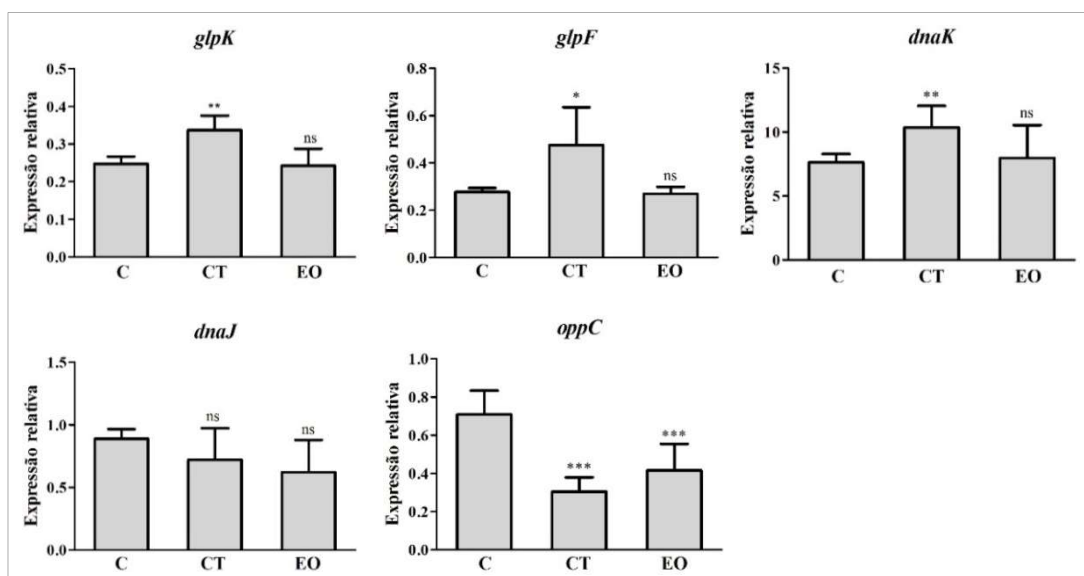


Figura 3. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse térmico. O eixo y indica a expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta CT}$), e o eixo X indica as condições de cultivo analisadas, sendo cultivo controle (C), condição de estresse térmico (CT) e condição de estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**) ou 99,9 % (***).

Também por microarranjo, foi determinado o perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* 232 submetido a estresse oxidativo (SCHAFER et al., 2007), onde foi demonstrado que os genes que apresentaram regulação positiva estão associados à síntese de tRNAs e regulação da tradução, sugerindo que esta condição leva a um aumento na síntese proteica. Os genes regulados negativamente nesta condição estão associados à replicação de DNA e, paradoxalmente, na montagem do ribossomo para conservação de energia da célula, e processamento proteico, sugerindo que estes processos ocorrem mais lentamente nesta condição (SCHAFER et al., 2007).

Dos possíveis genes confirmatórios da condição de estresse oxidativo testados no presente trabalho, *ftsY* teve sua expressão diminuída quando

comparado ao cultivo controle ($P < 0,05$), corroborando com a literatura existente (SCHAFFER et al., 2007), e se mostrando um gene controle da indução desta condição in vitro. Entretanto, *mglA* e *glyS* não apresentaram mudanças significativas nos seus níveis de expressão, e *atpB* apresentou comportamento divergente ao observado anteriormente, onde sua expressão foi elevada (SCHAFFER et al., 2007) (Figura 4).

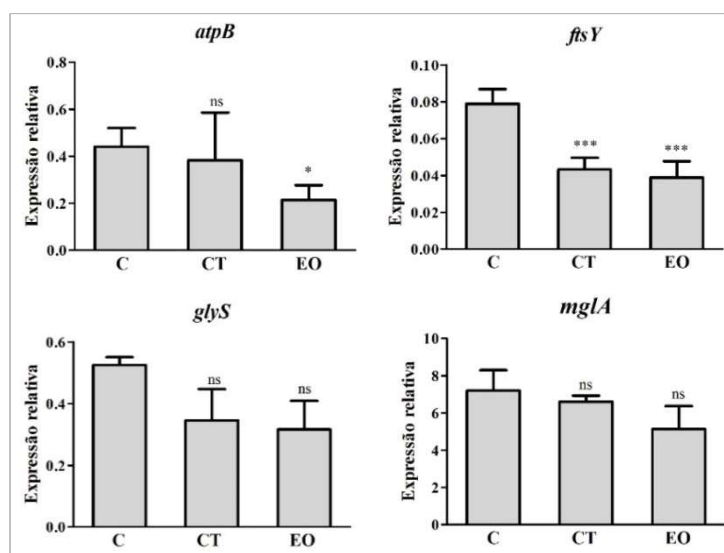


Figura 4. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse oxidativo. O eixo y indica a expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta CT}$), e o eixo X indica as condições de cultivo analisadas, sendo cultivo controle (C), condição de estresse térmico (CT) e condição de estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**) ou 99,9 % (***).

Como pode ser observado, os genes *glpK* e *dnaK* também tiveram variações dos seus níveis de expressão na condição de estresse oxidativo (Figura 3), bem como o gene *ftsY*, que apresentou expressão diferencial na condição de estresse térmico (Figura 4). Apesar destes genes não terem apresentado expressão diferencial nas análises anteriores nestas condições, o atual resultado demonstra que são possíveis genes controle destas condições, por confirmarem que as metodologias empregadas causam dano na célula e conseqüentemente a alteração dos seus níveis de transcrição.

As divergências observadas nos resultados de *oppC* e *atpB* podem ser justificadas pelo uso de linhagens e metodologias distintas. Os trabalhos anteriores empregaram a técnica de microarranjo nas análises de perfil transcricional e utilizaram *M. hyopneumoniae* linhagem 232; enquanto que no presente trabalho, a metodologia de RT-qPCR foi empregada em *M. hyopneumoniae* linhagem 7448. Discrepâncias entre resultados que comparam estas duas técnicas são relatados (DALLAS et al., 2005), sendo atribuídos à qualidade do RNA analisado, à presença de contaminantes, ao tipo de corante empregado, e ao método de normalização dos resultados empregado (MOREY et al., 2006).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam a confirmação da indução das condições de estresse térmico e oxidativo, visto que foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão relativa de genes alvo no cultivo controle e nas condições de estresse. De modo geral, a metodologia de indução de estresse térmico resultou na alteração dos níveis transcricionais de cinco genes analisados (glpK, glpF, dnaK, dnaJ e ftsY), e a metodologia de indução de estresse oxidativo alterou os níveis transcricionais de três genes analisados (oppC, atpB e ftsY).

Ao confirmar que estas metodologias mimetizam as condições de estresse térmico e oxidativo, é possível empregá-las em estudos futuros sobre a regulação da expressão gênica global em *M. hyopneumoniae*.

Finalmente, é importante ressaltar que a regulação da expressão gênica é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores. Portanto os resultados obtidos neste trabalho servem para agregar conhecimento ao importante tema de regulação da transcrição gênica em *M. hyopneumoniae*.

REFERÊNCIAS

- BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGMA, N. L.; GIRON, J. A.; THOMAS, C. A. **Interplay between mycoplasmas and host target cells**. *Microb Pathog*, 19(2):105-116, 1995.
- CATTANI, A. M.; SIQUEIRA, F. M.; GUEDES, R. L.; SCHRANK, I. S. **Repetitive elements in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcriptional regulation**. *PLoS One*. 2016. 705
- DALLAS, P. B.; GOTTARDO, N. G.; FIRTH, M. J.; BEESLEY, A. H.; HOFFMANN, K.; TERRY, P. A.; FREITAS, J. R.; BOAG, J. M.; CUMMINGS, A. J.; KEES, U. R. **Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate?** *BMC Genomics*. 2005.
- DYBVIK, K.; VOELKER, L. L. **Molecular biology of mycoplasmas**. *Annu Rev Microbiol*, 50:25-57, 1996.
- FRIIS, N. **Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey**. *Nord Vet Med*, 27 pp. 337–339, 1975.
- FRITSCH, T. E.; SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, I. S. **Intrinsic terminators in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription**. *BMC Genomics*, 2015.

LIU, W.; FENG, Z.; FANG, L.; ZHOU, Z.; LI, Q.; LI, S.; LUO, R.; WANG, L.; CHEN, H.; SHAO, G.; XIAO, S. **Complete sequence of Mycoplasma hyopneumoniae strain 168.** J Bacteriol, 193(4):1016-1017, 2011.

LIU, W.; XIAO, S.; LI, M.; GUO, S.; LI, S.; LUO, R.; FENG, Z.; LI, B.; ZHOU, Z.; SHAO, G.; CHEN, H.; FANG, L. **Comparative genomic analysis of Mycoplasma hyopneumoniae pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain.** BMC Genomics, 14:80, 2013.

MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; MINION, F. C. **Transcriptional profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during iron depletion using microarrays.** Microbiology, 152(Pt 4):937-44, 2006A.

MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R.; MINION, F. C. **Transcriptional profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during heat shock using microarrays.** Infect Immun, 74:167–174, 2006B.

MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D.; MINION, F. C. **Transcriptome changes in Mycoplasma hyopneumoniae during infection.** Infect Immun, 76:658–663, 2008.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. **Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs.** Vet Microbiol, 126:297-309, 2008.

MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. **The genome sequence of Mycoplasma hyopneumoniae strain 232, the agent of swine mycoplasmosis.** J Bacteriol, 186(21):7123-33, 2004.

MOITINHO-SILVA, L.; HEINECK, B. L.; REOLON, L. A., PAES, J. A., KLEIN, C. S.; REBELATTO, R.; SCHRANK I. S.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. **Mycoplasma hyopneumoniae type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential.** Vet Microbiol, 154:282–291, 2011.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C.; VAN DOLAH, F. M. **Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarray and real-time PCR.** Biol. Proced. 2006.

NATHUES, H.; DOEHRING, S.; WOESTE, H.; FAHRION, A.S.; DOHERR, M.G.; GROSSE BEILAGE, E. **Individual risk factors for Mycoplasma hyopneumoniae infections in suckling pigs at the age of weaning.** Acta Vet Scand, 55, 2013.

ONEAL, M. J.; SCHAFFER, E. R.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C. **Global transcriptional analysis of Mycoplasma hyopneumoniae following exposure to norepinephrine.**

Microbiology. 154(Pt 9):2581-8, 2008.

RAZIN, S. **Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells.** Biosci Rep, 19(5):367-372, 1999.

SCHAFER, E. R.; ONEAL, M. J.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C. **Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide.** Microbiology, 2007.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; MAES, D.; DELLAGOSTIN, O. A. ***Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development.** Vet Microbiol, 165:234-242, 2013.

SIQUEIRA, F. M.; THOMPSON, C. E.; VIRGINIO, V. G.; GONCHOROSKI, T.; REOLON, L.; ALMEIDA, L. G.; DA FONSECA, M. M.; DE SOUZA, R.; PROSDOCIMI, F.; SCHRANK, I. S.; FERREIRA, H. B.; DE VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. **New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis.** [BMC Genomics](#). 1186/1471-2164-14-175. 2013.

SIQUEIRA, F. M.; WEBER, S. S.; CATTANI, A. M.; SCHRANK, I. S. **Genome organization in *Mycoplasma hyopneumoniae*: identification of promoter-like sequences.** Molecular Biology Reports, 2014A.

SIQUEIRA, F. M.; GERBER, A. L.; GUEDES, L. R.; ALMEIDA, L. G.; SCHRANK, I. S.; VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. **Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract mycoplasmas.** PLoS One, 2014B.

SIQUEIRA, F. M.; MORAIS, G. L.; HIGASHI, S.; BEIER, L. S.; BREYER, G. M.; GODINHO, C. P.; SAGOT, M.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; VASCONCELOS, A. T. R. ***Mycoplasma* non-coding RNA: identification of small RNAs and targets.** BMC Genomics, 2016.

THACKER, E.L.; MINION, F.C. Mycoplasmosis J. Zimmerman (Ed.), **Diseases of Swine**, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 779–797, 2010.

VASCONCELOS, A. T.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C.V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G., ALMEIDA, R., ALVES-FILHO, L., et al. **Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*.** In J Bacteriol (United States), pp. 5568-5577, 2005.

WOESE, C. R. **Bacterial evolution.** Microbiol. Rev., 51(2):221-271, 1987.

WOLF, M.; MULLER, T.; DANDEKAR, T.; POLLACK, J. D. **Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate**

kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (Pt 3): 871-875, 2004.

ABSTRACT: *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of porcine enzootic pneumonia, has a small genome with few known regulatory mechanisms. Despite the lack of in vitro molecular tools, previous studies demonstrated that *M. hyopneumoniae* responds to stress conditions. To understand the mechanism that controls gene expression in this bacterium, this paper aims to identify target genes to in vitro control of heat shock and oxidative stress conditions, through the confirmation of the differential gene expression of predict targets involved in these conditions. Therefore, nine genes differentially expressed in previous analysis were selected: five upregulated genes during heat shock (*glpK*, *glpF*, *dnaK*, *dnaJ* e *oppC*), and four up (*atpB*, *glyS* e *mglA*) or downregulated (*ftsY*) genes during oxidative stress. Cell cultures of *M. hyopneumoniae* were performed in standard condition, heat shock and oxidative stress. Total RNA of each culture was extracted and cDNA synthesis was performed by reverse transcription reactions (RT). cDNAs were used as templates in quantitative PCR reactions (qPCR). All target genes were tested in the three culture conditions. This approach allowed to determine that five genes are differentially expressed during heat shock, and three genes were differentially expressed during oxidative stress. These results suggest the induction of differential gene expression in *M. hypneumoniae* during the stress conditions tested in vitro.

KEYWORDS: gene regulation; RT-qPCR; heat shock; oxidative stress; cell culture.

SOBRE AS ORGANIZADORAS

VANESSA BORDIN VIERA Bacharel e licenciada em Nutrição pelo Centro Universitário Franciscano (UNIFRA). Mestre e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Docente no Instituto Federal do Amapá (IFAP). Editora da subárea de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Journal of bioenergy and food science. Líder do Grupo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Alimentos do IFAP. Possui experiência com o desenvolvimento de pesquisas na área de antioxidantes, desenvolvimento de novos produtos, análise sensorial e utilização de tecnologia limpas.

NATIÉLI PIOVESAN Graduada em Química Industrial e Tecnologia em Alimentos, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Possui graduação no Programa Especial de Formação de Professores para a Educação Profissional. Mestre e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Docente no Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Atua principalmente com o desenvolvimento de pesquisas na área de Antioxidantes Naturais, Qualidade de Alimentos e Utilização de Tecnologias limpas.

SOBRE OS AUTORES

ADEMIR FARIAS MOREL Graduado em Química pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), mestre em Química, área de concentração Química Orgânica pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), doutor em Química pela Universidade Tuebingen, Alemanha, pós-doutorado pela Universidade de Hamburg, Alemanha, ambos na área de Química Orgânica de Produtos Naturais Professor associado da Universidade Federal de Santa Maria.

ALDO JOSÉ PINHEIRO DILLON Professor da Universidade de Caxias do Sul; Membro do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul; Graduação em Biologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Mestrado em Agronomia pela Universidade de São Paulo; Doutorado em Genética Molecular e de Microrganismos pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimas e Biomassa; Bolsista Produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora do CNPq - Nível 1D. E-mail para contato: ajpdillo@ucs.br

ALESSANDRA EIFLER GUERRA GODOY Possui graduação em Medicina pela Universidade de Caxias do Sul (1996), mestrado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (2005) e doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (2010). Atualmente é professora adjunta concursada da Universidade de Caxias do Sul, coordenadora o Museu de Patologia da UCS e Diretora do IPCCM. É médica patologista do Grupo Diagnose. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Anatomia Patológica, atuando principalmente nos seguintes temas: hpv, citopatologia, p16ink4, biomarcadores, neoplasias, dermatopatologia e patologia hepática.

ALESSANDRA EIFLER GUERRA GODOY Professor da Universidade de Caxias do Sul - UCS; Graduação em Medicina pela Universidade de Caxias do Sul - UCS; Mestrado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul - UCS; Doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul - UCS; E-mail para contato: aeggodoy@gmail.com.

ALESSANDRA KOEHLER Atualmente é formanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. Já atuou como bolsista PIBITI-CNPq, em pesquisa de novas tecnologias para o diagnóstico de infecções genitourinárias. Profissionalmente, atua como Auxiliar Técnico no Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC. Também atua como bolsista em projetos vinculados ao Laboratório de Biotecnologia e Genética da UNISC com ênfase no desenvolvimento de novas metodologias para avaliação de biópsias líquidas.

ALEXANDRE MATTHIENSEN Graduação em oceanologia pela Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Mestrado em Oceanografia Biológica pela Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Doutorado em Ciências Biológicas pela University of Dundee, DUNDEE, Escócia.

ALEXANDRE RIEGER Professor da Universidade de Santa Cruz do Sul; Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

Doutorado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Grupo de pesquisa: Limnologia

ANA PAULA MANERA Professora na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; Graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. E-mail: ana.manera@unipampa.edu.br

BRUNA FAGUNDES BARRETO Graduanda em Biotecnologia (Bacharelado) pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Bolsista de Iniciação Tecnológica e Inovação Institucional - PROBITI/FAPERGS. Atualmente desenvolvendo pesquisas com ênfase em Transgênese Animal, Biologia Molecular, Genômica e Sequenciamento de Nova Geração, no Laboratório de Genômica Estrutural (CDTec)-UFPel, sob a orientação do Professor Dr. Vinicius Farias Campos. brunaf.barreto@live.com

CAMILA CANTELE Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade de Caxias do Sul; Grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimas e Biomassa. E-mail para contato: camilacantele@gmail.com

CAMILA RAMÃO CONTESSA Graduanda em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; Grupo de pesquisa: Obtenção de biocompostos e microrganismos de interesse industrial; Bolsista de Iniciação científica pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). E-mail para contato: camilaramao@hotmail.com.

CAROLINE COSTA MORAES Professora na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; Graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG com período sanduiche na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Grupo de pesquisa: Obtenção e purificação de bioprodutos e Microbiologia; Bolsista produtividade em desenvolvimento tecnológico e extensão inovadora DT2 CNPq. E-mail: caroline.moraes@unipampa.edu.br

CAROLINE LOPES FEJO FERNANDES Graduação em licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Do Rio Grande – FURG; Grupo de pesquisa: Ecotoxicologia Terrestre; Bolsista de mestrado CAPES; E-mail: carolinelebom@hotmail.com; Realizando mestrado em Ciências da Saúde, na universidade federal do Rio Grande- FURG. Áreas de atuação: Mutagênese ambiental, genotoxicidade, nanotoxicologia, fitotoxicidade, ecotoxicologia, saúde ambiental e ensino de ciências e biologia para jovens e adultos.

CÉSAR MILTON BARATTO Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria, Mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Pós-Doutorado Empresarial pela Empresa Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda Atualmente é professor

titular da Universidade do Oeste de Santa Catarina, carga horária de 40 horas, atuando nos cursos de Biotecnologia Industrial, Engenharia Química e Engenharia Sanitária Ambiental. É docente e Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia - Mestrado acadêmico - Unoesc.

CINTHIA GABRIELA GARLET Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), bolsista do Programa Especial de Treinamento-Agronomia (PET-A)

CLEBER WITT SALDANHA Possui graduação em Engenharia Florestal, mestrado em Geomática pela Universidade Federal de Santa Maria e doutorado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. Possui Pós-Doutorado em morfogênese *in vitro* de plantas com ênfase em propagação fotoautotrófica. Tem experiência na área de Recursos Florestais, com ênfase em cultura de tecidos de espécies florestais. Possui experiência em trabalhos relacionados à micropropagação fotoautotrófica e criopreservação de germoplasma vegetal. Atualmente é Pesquisador do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária- Centro de Pesquisa em Florestas (Santa Maria-RS), onde conduz trabalhos na área de tecnologia de sementes e propagação de espécies florestais nativas.
clebersaldanha@yahoo.com.br

CRISTIANE MÁRCIA MIRANDA SOUSA Graduação em Engenharia Ambiental pela Universidade Engenharia Ambiental pela Universidade de Santo Amaro; Mestranda em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul; Grupo de pesquisa: Limnologia

DAIANE CRISTINA DE MOURA Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Santa Cruz do Sul; Mestranda em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul; Grupo de pesquisa: Limnologia. E-mail para contato: daianemoura1992@gmail.com

DANIELI ROSANE DALLEMOLE É bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC (2015). Atuou como bolsista de inovação tecnológica (PROBITI-FAPERGS) na pesquisa de modelos de discriminação de estados pró-inflamatórios utilizando a Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). Desenvolveu trabalho voluntário em projetos de avaliação da genotoxicidade ambiental, diagnóstico de infecções genitourinárias (*Candida spp*), e na padronização de técnicas de biologia molecular. Atuou como técnica de laboratório no Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC (2013-2017) e atualmente é aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Possui experiência em biologia molecular, histologia, genotoxicidade e manejo de animais em experimentação.

DENISE RUSSOWSKI Graduada em Química Industrial e Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), mestre em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, pelo programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro), também da UFSM, doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biotecnologia Vegetal, pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pós-doutorada em Química, área de concentração

Química Orgânica/Produtos Naturais (PPGQ) da UFSM. Bolsista DTI (CNPq)

EDUARDO ALCAYAGA LOBO Professor da Universidade de Santa Cruz do Sul; Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul; Graduação em Biologia pela Universidade do Chile; Mestrado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos; Doutorado em Ciências Aquáticas pela Universidade de Ciências Marinhas e Tecnologia de Tóquio; Pós Doutorado em Contaminação Aquática pelo Instituto Nacional de Recursos Ambientais; Grupo de pesquisa: Limnologia. Bolsista Produtividade em Pesquisa pela Fundação pelo CNPq.

ELISABETE MARIA ZANIN Professor da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo – UPF; Mestrado em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR.

EVANDRO LUIZ MISSIO Possui Graduação em Agronomia (1999), Mestrado em Agronomia (2002), Doutorado em Engenharia Florestal (2015) e Pós-Doutorado em Agronomia (2017), todos pela Universidade Federal de Santa Maria. Possui experiência em sistemas agroflorestais, melhoramento vegetal e nutrição mineral de plantas. É pesquisador do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) do Rio Grande do Sul. Atualmente desenvolve trabalhos na área de recursos naturais renováveis, com ênfase em silvicultura de espécies florestais nativas, envolvendo os temas: formação de áreas de coleta de sementes (ACS), coleta, beneficiamento, armazenamento e tecnologia de sementes e mudas florestais nativas. evandro@fepagro.rs.gov.br

FÁBIO FIRMBACH PASQUALOTTO Professor da Universidade de Caxias do Sul - UCS; - Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul - UCS; Graduação em Medicina pela Universidade de Caxias do Sul - UCS; Mestrado em Urologia pela Universidade de São Paulo - USP; Doutorado em Urologia pela Universidade de São Paulo - USP; E-mail para contato: fabio@conceptionbr.com.

FELIPE DE LIMA FRANZEN Graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Santa Maria; Mestrando em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria. E-mail para contato: franzen2@gmail.com

FERNANDA MEGIOLARO Graduada em Biotecnologia Industrial pela UNOESC-Campus Videira, Mestrado em Ciência e Biotecnologia pela UNOESC-SC, Biotecnologia aplicada a Agroindústria e Saúde.

FLÁVIO MANOEL RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR Professor da Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco; Mestrado em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Grupo de pesquisa: Ecotoxicologia Terrestre.

FRANCIELE MABONI SIQUEIRA Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutorado em Ciências Biológicas/Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pós Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Grupo de Pesquisa de Micro-organismos Diazotróficos

FREDERICO LUIZ REIS Graduado em Química Licenciatura pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); mestrando pelo Programa de Pós-graduação em Química, área de concentração Química Orgânica/Produtos Naturais (PPGQ), da UFSM. Bolsista CAPES.

GABRIELA MERKER BREYER Graduação em Biotecnologia com ênfase em Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Grupo de Pesquisa de Micro-organismos Diazotróficos. E-mail: gabibreyer@hotmail.com

GERUSA PAULI KIST STEFFEN Graduada em Agronomia (2006) pela Universidade Federal de Santa Maria, Mestre (2008) e doutora (2012) em Ciência do Solo pela mesma Universidade. Tem experiência na área de Biologia e Microbiologia do Solo, com ênfase no uso de organismos e microrganismos como bioindicadores da qualidade do solo, fitorremediadores ambientais e fonte de insumos biológicos para uso na agricultura. Atualmente é Pesquisadora do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) do Rio Grande do Sul, Centro de Pesquisa em Florestas, desenvolvendo trabalhos com enfoque no uso de insumos biológicos à base de Trichoderma para controle de pragas e promoção de crescimento vegetal. ge.pauli@yahoo.com.br

GUILHERME BATTÚ GONÇALO Graduando em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; E-mail: guibattu@hotmail.com

HELISSARA SILVEIRA DIEFENTHAELER Professor da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; Doutorado em andamento no Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; Grupo de pesquisa: Grupo Multidisciplinar em Pesquisa em Ciências Farmacêuticas

INGRID MEDEIROS LESSA Graduanda do 6º semestre do curso de Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Atua como aluna de Iniciação Científica no Laboratório de Genômica Estrutural pelo Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) - UFPel, onde sob orientação do Prof. Dr. Vinicius Farias Campos participa de projetos de pesquisas com ênfase em Biologia Molecular, Genômica Estrutural e Funcional, Sequenciamento de Nova Geração e Transgênese Animal. ingridmlessa@hotmail.com

IONARA FÁTIMA CONTERATO Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria (2001), com mestrado (2004), doutorado (2009) e pós-doutorado (2011) em Zootecnia - Área de Concentração - Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras pela Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (2009). Suas atividades de pesquisa estão relacionadas com caracterização de germoplasma, anficarpia, melhoramento genético de plantas forrageiras e citogenética vegetal clássica. Atualmente é Pesquisadora do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Anacreonte Ávila de Araújo, desenvolvendo trabalhos que envolvem coleta, seleção e melhoramento genético de plantas forrageiras e anficarpia. ionarafe@yahoo.com.br

IRENE SILVEIRA SCHRANK Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestrado em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutorado em Molecular Biology pela University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST). Grupo de Pesquisa de Micro-organismos Diazotróficos.

ISNARD ELMAN LITVIN Professor da Universidade de Caxias do Sul - UCS; Graduação em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; Mestrado em Cirurgia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; E-mail para contato: ielitvin@terra.com.br.

JANE MARY LAFAYETTE NEVES GELINSKI Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. Mestre em Genética pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; doutorado em Bromatologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP com tese na área de Microbiologia. Pós-doutorado CNPq - junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFPR. Professora Titular na Universidade do Oeste de Santa Catarina, junto às áreas Ciências Biológicas e da Saúde e de Ciências Exatas e Tecnológicas. Faz parte do Núcleo de Docente Estruturante dos cursos de Biotecnologia Industrial, Engenharia de Alimentos.

JOSEILA MALDANER Graduada em Ciências Biológicas (2005), Mestre (2008) pela Universidade Federal de Santa Maria, doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa (2011) e pós-doutora em Agrobiologia pela Universidade Federal de Santa Maria (2016). Tem experiência na área de Fisiologia Vegetal, com ênfase em aspectos biotecnológicos de cultivo in vitro, nutrição, metabolismo vegetal, toxidez de metais no crescimento e desenvolvimento vegetal). Atualmente é Pesquisadora do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa em Florestas da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) do Rio Grande do Sul, Centro de Pesquisa em Florestas, desenvolvendo trabalhos com enfoque nos insumos biológico para controle de pragas e promoção de crescimento vegetal. jomaldaner@gmail.com

JOYCE CRISTINA GONÇALVEZ ROTH Possui graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) (2008) e mestrado em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) (2010). Atualmente é doutoranda em Tecnologia Ambiental

(UNISC) e Professora Assistente em Engenharia Ambiental da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS).

JUÇARA TEREZINHA PARANHOS Graduada em Agronomia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), mestre em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da UFSM, doutora em Ciências, área de concentração Fisiologia Vegetal, pelo Programa de Pós-graduação em Botânica (PPG Botânica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor Adjunto IV da Universidade Federal de Santa Maria, participante do Colegiado do Curso de Agronomia, do Núcleo Docente Estruturante do Curso de Agronomia (UFSM), membro do Conselho Universitário da UFSM.

JULIA LIVIA NONNENMACHER Graduação em Farmácia pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Grupo de pesquisa: Grupo Multidisciplinar em Pesquisa em Ciências Farmacêuticas; Bolsista Produtividade em Pesquisa pela Fundação CNPq; E-mail para contato: julia_nonnenmacher@outlook.com.

KETLIN SCHNEIDER Graduada em Biotecnologia Industrial pela UNOESC- Campus Videira, Mestrado em Ciência e Biotecnologia pela UNOESC-SC, Biotecnologia aplicada a Agroindústria e Saúde, Bolsista PROSUP-CAPES.

LAIZ COUTELLE HONSCHA Graduação em tecnologia em toxicologia ambiental pela Universidade Federal Do Rio Grande – FURG; Grupo de pesquisa: Ecotoxicologia Terrestre; Bolsista de mestrado CAPES.

LEONARDO MENEZES Graduando em Química Industrial pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Bolsista IC (CNPq).

LISIANE DE MARSILLAC TERRA Professora da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Maria; Mestrado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas;

LIZIANE MARIA BARASSUOL MORANDINI Graduada em Farmácia e Bioquímica - Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa, mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, área de concentração Microbiologia, pela UFSM, doutora em Química do pelo Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ), área de concentração Química Orgânica/Produtos Naturais, pela UFSM, pós-doutorada em Química, área de concentração Química Orgânica/Produtos Naturais (PPGQ), da UFSM. Bolsista DTI (CNPq)

LUCAS DOS SANTOS DA SILVA Técnico em Administração de Empresas, com experiência nas áreas de Marketing e Logística. Atualmente graduando em Biotecnologia (Bacharelado) na Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) e Bolsista de Iniciação Científica CNPq desenvolvendo pesquisas com ênfase em Genômica Estrutural, Genômica Funcional e Transgênese Animal, como integrante no Laboratório de Genômica Estrutural pelo Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) - UFPeI sob a orientação do Professor Dr. Vinicius Farias Campos. lucassantos_17@hotmail.com

LUCIANO DOS SANTOS ALMEIDA Técnico em laboratório na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; Graduação em Biologia pela Universidade da Região da Campanha- URCAMP, Bagé – RS; Especialização em Gestão e Conservação de Espaços Naturais pela Fundação Universitária Iberoamericana - Florianópolis, FUNIBER e Especialização em Processos Agroindustriais pela Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA. E-mail: almeidahades@gmail.com

MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi Árido - UFRSA (2015). Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) - UFPel (conceito 6) (2017). Atualmente é Doutoranda em Biotecnologia pela mesma instituição, com a linha de pesquisa em Vacinologia e Parasitologia Molecular. Atuando em projetos relacionados à pesquisa e desenvolvimento de vacinas recombinantes para o controle da linfadenite caseosa. Tem experiência nas áreas de: Biotecnologia, com ênfase em Parasitologia e Vacinologia.

MARI SILVIA RODRIGUES DE OLIVEIRA Professor da Universidade Federal de Santa Maria- UFSM; Graduação em Farmácia e Bioquímica- Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria; Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria; Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria; Grupo de pesquisa: Tecnologia e Processamento de Carnes. E-mail para contato: marisilviadeoliveira@yahoo.com.br

MAYARA BREDA Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Grupo de pesquisa em Planejamento, Gestão e Educação Ambiental.

NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA Graduanda em Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Bagé – RS; - Grupo de pesquisa: Obtenção de biocompostos e microrganismos de interesse industrial e obtenção e purificação de bioprodutos; - Bolsista de Iniciação científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); E-mail: nathieli.souza.1995@gmail.com

NELCINDO NASCIMENTO TERRA Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria; Professor Titular da Universidade Federal de Santa Maria- UFSM; Graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Maria; Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo; Doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo; Pós-doutorado pelo Centro de Tecnologia de La Carne- IRTA, Espanha; Grupo de pesquisa: Tecnologia e Processamento de Carnes. E-mail para contato: nelcindoterra@gmail.com

PRISCILA MOLINARES DOS SANTOS Graduação em Engenharia de Bioprocessos pela Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ); Mestrado em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Maria (conclusão prevista para 07/17); E-mail para contato: priscila.molinares@gmail.com

RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES Biotecnologista graduada pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em 2016. Atualmente, mestranda no Programa de Pós-

Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), atuando no Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária (LBIP) do Centro de Desenvolvimento Tecnológico CDTec/UFPel, sob orientação da professora Dra. Sibebe Borsuk.

REJANE FLORES Graduada em Ciências Biológicas (1995), pela Universidade Federal de Santa Maria, Mestre em Ciências (1999) pela Universidade Federal de Pelotas e Doutora em Agronomia (2006), pela Universidade Federal de Santa Maria (2006). Atualmente, é professora associada do Instituto Federal Farroupilha, Campus São Vicente do Sul, RS, onde desenvolve atividades de Ensino, Pesquisa e Extensão na área de Fisiologia Vegetal, com ênfase em Propagação de plantas, Cultura de Tecidos e Metabolismo Secundário. rejane.flores@yahoo.com.br

RODRIGO BARROS DE PINHO Graduado em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel (2016). Atualmente é bolsista de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) – UFPel (conceito 6). Atuando na linha de pesquisa em Vacinologia, em projetos referentes ao desenvolvimento de vacinas para o controle da linfadenite caseosa.

ROSANA MATOS DE MORAIS Graduada em Ciências Biológicas (2004) pela Universidade Federal de Santa Maria. Mestre em Biologia Animal (2006), Doutora em Fitotecnia, com ênfase em Fitossanidade (2009) e Pós-doutora (2012) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tem experiência na área de entomologia agrícola, ecologia e biologia de insetos, com ênfase em controle biológico e utilização de bioinsumos. Atualmente é Pesquisadora do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa em Florestas do Rio Grande do Sul, desenvolvendo trabalhos com enfoque em insumos biológicos para controle de pragas. entomorais@yahoo.com.br

ROSANE GIACOMINI Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos; Mestrado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul - UCS (em andamento); E-mail para contato: rosanegiacomini@gmail.com.

ROSANE GIACOMINI Mestranda em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul - UCS. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS. Realizou sua formação como bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade, tendo atuado em projetos com ênfase em diversidade genética, genética de populações e evolução. Também atuou em projetos de pesquisa na Embrapa Uva e Vinho, desenvolvendo trabalhos nas áreas de caracterização biológica e molecular, diagnóstico, clonagem e expressão de genes virais para produção de antígenos recombinantes, termoterapia, quimioterapia e cultivo de meristemas para remoção de vírus. Atualmente atua como docente.

ROSELEI CLAUDETE FONTANA Graduação em Biologia pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul; Mestrado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul; Doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul; Grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimas e Biomassa. E-mail para contato: rcfontan@ucs.br

SIBELE BORSUK Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas (2000), Mestrado (2004) e Doutorado (2008) em Biotecnologia (conceito 6) pela mesma Instituição, Pós-Doutorado na área de Parasitologia Molecular pelo programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFPel. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Biologia Molecular de microrganismos atuando principalmente nos seguintes temas: Caracterização Molecular de Mycobacterium tuberculosis, Epidemiologia Molecular, Expressão de Proteínas heretólogas, Vacinas Recombinantes, Espectrometria de massa LC-MS/MS. Atualmente é professor Adjunto III da UFPel nos cursos de graduação em Biotecnologia, bem como nos cursos de pós-graduação em Biotecnologia e Parasitologia. É Bolsista de Produtividade Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora do CNPq - 2 (DT-2).

SILVANE SOUZA ROMAN Professor da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Membro do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim; Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo - UPF; Mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria - UFSM; Grupo de pesquisa: Grupo Multidisciplinar em Pesquisa em Ciências Farmacêuticas.

SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal Rural do Semiárido - UFRSA - (2007), possui Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UFRSA (2009). Atualmente é Professor Assistente do Bacharelado em Biotecnologia no Departamento de Ciências Animais na UFRSA, estando liberado para cursar Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Tem experiência nas áreas de Vacinologia e Imunologia Aplicada, com ênfase no desenvolvimento de vacinas de subunidade recombinantes e vetorizadas utilizando BCG e imunodiagnóstico para a linfadenite caseosa.

TAMIRES SILVEIRA MORO Técnica em Agropecuária (2014) formada pelo Instituto Federal Farroupilha – Campus Júlio de Castilhos e Graduanda do sétimo semestre do Curso de Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria. Participou como Bolsista em Projetos de Pesquisa nas áreas de Recursos Biológicos, com a utilização de Inimigos Naturais nas culturas do Milho e Tomateiro (2014-2015), e Recursos Florestais, na Superação de Dormência de Espécies Florestais (2015-2016). Atualmente desenvolve atividades ligadas à preservação do Campo Nativo através do biocontrole de plantas exóticas no Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa em Florestas do Rio Grande do Sul. tmymoro@hotmail.com

TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA Possui graduação em Ciências Biológicas (2011) e Medicina Veterinária (2015) pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e mestrado em Ciências Biológicas (2012) pela UFPEL. Atuou como professor substituto da disciplina de Anatomia dos Animais Domésticos I na UFPEL. Foi colaborador do Laboratório de Zoologia de Vertebrados, realizando atividades de pesquisa e extensão. Atualmente é vinculado ao Laboratório de Genômica Estrutural como doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPEL. Tem

experiência docente nas áreas de zoologia de vertebrados, anatomia animal, parasitologia e evolução. tony8.9@hotmail.com

VALERIANO ANTONIO CORBELLINI Possui graduação em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1987), graduação em Medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1997), mestrado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1993), doutorado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2004) e pós-doutorado pela Universidade Federal de Santa Maria (2016). Atualmente é Professor Adjunto da Universidade de Santa Cruz do Sul, Membro de corpo editorial da Tecno-Lógica e Revisor de projeto de fomento do Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. Tem experiência na área de Química, com ênfase em Química Analítica. Atuando principalmente nos seguintes temas: cumarinas, benzoxazolas, substratos fluorogênicos, fluorocromos, atividade antifúngica e genotoxicidade.

VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO Membro da Academia Brasileira de Ciências, Professor Titular e pesquisador 1A do CNPq, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG desde 2011. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (1986), mestrado (1989) e doutorado (1993) em Genética de Microrganismos pelo Institut National Agronomique Paris Grignon. Pós-doutorado pelo Departamento de Microbiologia da Escola de Medicina da Universidade da Pensilvânia (EUA, 1994). Trabalha, atualmente, com os seguintes microrganismos: staphylococcus aureus, Brucella abortus, Corynebacterium pseudotuberculosis, Lactococcus lactis e Lactobacillus.

VINICIUS FARIAS CAMPOS Biólogo (2007), Mestre (2009) e Doutor em Biotecnologia (2011) pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Atualmente é Professor e orientador dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) e Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), ambos da UFPEL. É Bolsista de Produtividade Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora do CNPq - Nível 2 no Programa de Biotecnologia. Presidente do Comitê Institucional de Propriedade Intelectual e membro do Conselho Universitário da UFPEL. Além disso, é Coordenador de Inovação Tecnológica da UFPEL junto à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG). É fundador e coordenador do Laboratório Genômica Estrutural onde lidera o Grupo de Pesquisa em Genômica Estrutural. fariascampos@gmail.com

WILLIAM BORGES DOMINGUES Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Mestre em Biotecnologia e atualmente é doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB- UFPEL). No Laboratório de Genômica Estrutural do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), sob orientação do Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, desenvolve pesquisas nas áreas de Genômica e Biotecnologia Animal, com ênfase em transferência gênica e transfecção em células espermáticas. williamwwe@yahoo.com.br

ZAIDA INÊS ANTONIOLLI Graduada em Biologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), mestre em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), doutora em Mycorrhizal Molecular Aspects - The University of Adelaide, Australia. Professora associada 4, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, (PGCS) da UFSM e do programa de pós-graduação em Agrobiologia-

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-93243-31-8

