

IV Semana de Biotecnologia

Anais

Volume único



A influência dos sais na produção de naringinase por *Aspergillus niger*

¹Rosa, C. B. S.;²Borsato,D; ¹Buzato, J. B.

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia; ²Departamento de Química; UEL,

A influência dos sais KH_2PO_4 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi verificada na produção de naringinase por *Aspergillus niger*, em meio complexo (melaço e peptona) contendo naringina como indutor. As maiores produções obtidas foram de 146,5 mU/mL e 137,4 mU/mL nos meios ausentes de KH_2PO_4 , e KCl , respectivamente. No meio contendo todos os sais houve a produção de 106mU/mL. Entretanto a retirada do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tiveram efeito negativo na produção enzimática.

Análise da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e óleo essencial de *Peperomia sp.* (PIPERACEAE).

Moriel, B.¹; Pelayo, J. S.¹; Faria T. J.²; Vieira, A. O. S.³

¹ Departamento de Microbiologia, CCB, UEL

² Departamento de Química, CCE, UEL

³ Departamento de Biologia Animal e Vegetal, CCB, UEL

O extrato etanólico da parte aérea de *Peperomia sp.* (Piperaceae) foi testado para atividade antibacteriana em *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* isoladas de material clínico e ambiental. Padronizaram-se as bactérias de acordo com o tubo 0.5 da escala de McFarland. Utilizou-se o teste da microdiluição em microplacas de 96 orifícios para a determinação da atividade antimicrobiana. Foram depositados 100µL de caldo Mueller-Hinton na coluna 1 nas linhas H - E, dependendo da quantidade de amostras de microrganismos a serem testadas, esse procedimento foi repetido até a coluna 8. Logo após foram adicionados 50µL de extrato a 65%, para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e 1,25%, para *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, em cada poço da coluna 1, em seguida 100µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício seguinte (coluna 2), com a finalidade de obter uma concentração decrescente do extrato, sendo os 100µL finais desprezados. Adicionou-se 100µL da suspensão de bactérias padronizadas em todos os orifícios com o meio e extrato em diferentes concentrações. O restante dos orifícios foram utilizados para os controles dos antibióticos vancomicina, ciprofloxacina e polimixina B, controle para a confirmação da esterilidade do meio de cultura e controle para o crescimento dos microrganismos. As placas foram fechadas em incubadas por 24 horas à 37°C. Decorrido o tempo foi acrescentado 50µL de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5% incubando novamente a placa por 3 horas à 37°C. Para *P. aeruginosa* foi encontrado MIC de 65% de extrato, para *E. coli* 32,5%, *S. aureus* 0,16% e *S. epidermidis* 0,16%. Nossos resultados sugerem que o extrato apresenta uma boa atividade antimicrobiana e uma promessa de uma droga antibactericida barata e fácil de obter. Embora mais estudos são necessários para confirmar nossos resultados.

Análise de lã de borregas Suffolk por espectrofotometria de energia dispersiva de raio X

Nelson P. Junior; Vanessa V. Ortunho; Wilmar S. Marçal; Alessandro Caseri;
Bianca R. Souza.

Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina – PR.

No Brasil, a questão do controle de qualidade dos alimentos utilizados na nutrição animal tem evoluído muito e se vê fortalecida por estudiosos com objetivos práticos. Trabalhos científicos recentes tem demonstrado a contaminação de misturas minerais por metais pesados como chumbo, cádmio, níquel, vanádio entre outros e alertado para a necessidade de monitoramento junto aos fabricantes desses produtos, pois estes suplementos podem ser perigosos, possibilitando efeitos cumulativos tóxicos nos animais. Baseado no exposto e considerando que não havia estudos relacionados ao tema utilizando o método de Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDX), o presente trabalho propôs a mensuração de metais pesados na lã de ovinos consumindo suplementos minerais comerciais. Foram utilizadas 20 ovelhas Suffolk divididas aleatoriamente em dois grupos iguais (n=10) que receberam misturas minerais diferenciadas (orgânicas e inorgânicas). Os animais foram suplementados por dois meses antes da data da coleta. A lã foi colhida na região cervical e acondicionada em sacos plásticos identificados. As amostras foram processadas e analisadas por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) associada ao Microscópio Eletrônico de Varredura conforme protocolo utilizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. A lã é uma proteína composta por carbono, oxigênio, enxofre, nitrogênio e hidrogênio, sendo que todos os animais estudados, tanto no grupo que recebera sal mineral orgânico quanto no grupo suplementado com sal inorgânico apresentaram esses elementos. Outros minerais identificados em parte das amostras foram potássio, cálcio, sódio, cloro, magnésio e cobalto. Nenhum dos animais apresentou a lã contaminada por metais pesados. A associação microscópio eletrônico de varredura com o aparelho de Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) pode ser utilizada para detectar a composição química dos materiais a serem pesquisados, assim como detectar a presença de contaminantes, tendo como vantagem a necessidade de uma quantidade ínfima de material.

Aplicação de lacases produzidas por *Pycnoporus* spp. na descoloração de Remazol Brilliant Blue

Aline F. Souza²; Eliane S. Otaguiri¹, Leonardo C. Alves¹, Luciano N. Aoyagi¹,
Suely M. O. Doi³

¹Estagiário Voluntário, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

²Aluna Especialização em Bioquímica Aplicada, BBTEC, CCE, UEL

³Depto de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

As indústrias têxteis têm contribuído profundamente para a contaminação ambiental, devido a grande produção de resíduos recalcitrantes lançados indevidamente em corpos d'água sem o pré-tratamento, podendo causar sérios impactos ambientais à microbióta aquática. Este tipo de efluente possui uma composição extremamente variável, em razão principalmente da diversidade de corantes que são utilizados diariamente. O primeiro sintoma de contaminação visível de tal efluente é a coloração dos cursos d'água, sendo que sua remoção se torna prioridade. Existem tratamentos físicos e químicos para estes tipos de resíduos, porém os tratamentos biológicos vêm se destacando por serem naturais, não necessitando a utilização de substâncias químicas no seu desenvolvimento. A descoloração do corante ocorre através de enzimas ligninolíticas, como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. A lacase é uma enzima que não apresenta especificidade restrita quanto à estrutura do substrato, podendo catalizar a oxidação de várias estruturas aromáticas fenólicas e compostos não fenólicos na presença de mediadores específicos, compostos geralmente encontrados em efluentes têxteis. A produção de tais enzimas pode ser influenciada por vários fatores, entre eles o meio de cultivo utilizado para o crescimento do microrganismo. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a produção de lacases produzidas por *Pycnoporus* spp em meios de cultivos distintos e a descoloração do corante sintético remazol brilliant blue por essas enzimas. Neste experimento o fungo escolhido foi inoculado durante 7 dias a 28°C e 180rpm de agitação em 7 meios de cultivo diferentes contendo meio mínimo de Vogel (2%) suplementado por extrato de levedura e uma das seguintes fontes de carbono glicose, maltose, bagaço-de-cana, bagaço-de-cana + glicose, bagaço-de-cana + maltose, bagaço-de-cana + sacarose ou bagaço-de-cana + etanol. O pH inicial dos meios foram ajustados para 7,0. Após interrupção dos cultivos foram realizadas análises de atividade de lacase e de descoloração. Observou-se maiores valores de atividade enzimática de lacase quando cultivou se o *Pycnoporus* spp em meio contendo bagaço-de-cana e etanol (0,77 U/mL). Na descoloração, obteve-se maior evidência quando utilizado bagaço-de-cana e etanol, 85,08%; seguida de bagaço-de-cana e sacarose que apresentou 66,52% e bagaço-de-cana e maltose com 66,52%. Concluiu-se que a utilização de bagaço-de-cana e etanol estimulam a produção da lacase, bem como proporcionam maior descoloração do corante utilizado. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados, a fim de encontrar o melhor meio de cultivo para produção enzimática de lacase e maior descoloração de corantes têxteis em tempo reduzido, a um custo acessível para a aplicação industrial.

Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato bruto de casca de *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae)

Rubens P. Maciel, Denise S. C. Silveira, Regildo M. G. Silva

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras, Campus Assis – SP,
Departamento de Ciências Biológicas.

Astronium fraxinifolium é conhecida popularmente como “Gonçalo-alves”, uma espécie arbórea rica em substâncias tânicas, empregada no tratamento de inflamações, tanto para uso interno quanto tópico, ainda apresenta atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, cicatrizante e antiinflamatória. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antinociceptiva do extrato de casca de *A. fraxinifolium*. Para tanto, casca de *A. fraxinifolium* foi coletada na região de cerrado do Vale do Médio Paranapanema, de maneira sustentável e sem causar impacto ambiental. O extrato bruto foi obtido por maceração dinâmica durante 24 horas em solução de etanol/água a 70% na temperatura ambiente, logo após foi filtrado e o etanol evaporado até a secura. Para o teste de contorção abdominal causado por injeção de ácido acético foi utilizado camundongos machos separados em grupos de 5 animais, que receberam diferentes concentrações de extrato bruto (50, 100 e 200 mg/Kg de peso corporal) por gavagem. Uma hora depois receberam ácido acético a 0,6% via intraperitoneal. Foi avaliado o número de contorções num período de 0 a 30 minutos. Após observação e quantificação do número de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido-acético nos animais tratados e controle, foi possível constatar um aumento significativo no número de contorções nos grupos tratados (G50 = 84,5%, G100 = 13,5% e o G200 = 106,8%) em comparação ao controle (ácido acético a 0,6%). De acordo com estes dados é possível constatar que a utilização do extrato bruto de *A. fraxinifolium* administrado via oral em camundongos pode potencializar a ação nociceptiva do ácido acético quando injetado intraperitonealmente.

Avaliação do potencial alelopático de *Pyrostegia venusta* no controle da germinação.

Daneluzzi, G.S.; Santos, Silva, D.C., V.H.M.; Santiago, D.; Campos, T. A.; Silva, R. M. G.

Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Departamento de Ciências Biológicas – Laboratório de Tecnologia de Fitoterápico

As substâncias alelopáticas apresentam grande potencial para uso no controle biológico de plantas daninhas e no desenvolvimento vegetal, sendo importante para o manejo agrícola de plantas medicinais, sendo também fontes importantes de princípios ativos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial alelopático da *P.venusta* na germinação de *L. sativa* (alface), *B. chinensis* (couve-da-malásia) e *B. pilosa* (picão-preto), tanto para os estágios de pré como pós-emergência. Na pré-emergência, foi realizado o bioensaio de germinação de sementes de alface, couve-da-malásia e picão. Foram separados em placas de *Petri*, grupos experimentais tratados com 3 concentrações (5, 10 e 20mg/mL) de extrato da flor de *P.venusta* e controle (água), com 4 repetições cada, contendo 50 sementes de alface e couve-da-malásia e 30 sementes de picão. A avaliação quantitativa da germinação se deu a cada 6 horas, durante 96 horas. Foi avaliado a germinabilidade, sincronismo e velocidade de germinação. Já para pós-emergência foram utilizadas sementes já germinadas, de alface e couve-da-malásia, com 2 mm de radícula, sob a ação de 3 concentrações de extrato da flor de *P. venusta*, em 4 repetições, além do grupo controle água. Foi feito a medição das radículas a cada 24 horas até completar 48 horas. Na experimentação de pré-emergência o extrato de *P. venusta* diminuiu significativamente a germinabilidade de sementes de alface (32; 80; 81%), de couve (10; 43; 50%) e picão (67; 83; 89%) nas concentrações 5, 10 e 20mg/mL respectivamente. Os tratamentos com as doses de 10 e 20mg/mL para todos os extratos avaliados não apresentaram diferença estatística entre si (Tukey a 5%). Na pós-emergência as concentrações de extrato de *P. venusta* apresentaram um retardo e uma diminuição significativa na média de comprimento radicular dos grupos experimentais (10; 21; 23% após 24hs e 31; 40; 37% após 48hs para alface e 51; 55; 53% após 24hs e 75; 76; 81% após 48hs para couve-da-malásia), porém não apresentou diferença entre as doses utilizadas de cada extrato (Tukey a 5%). Os resultados demonstram que o extrato de *P.venusta* apresenta substâncias alelopáticas capazes de interferir na germinação e no comprimento radicular.

Apoio -Unesp – FAPESP

Avaliação preliminar da comunidade bacteriana associada à plantas de girassol (*Helianthus annuus*) e capacidade de produção de auxina por alguns isolados

Humberto M. Horikoshi¹, Evandro Zeidel², Thais P. Ferreira³, Giovana Granzotto³, Paulo R. F. Marcelino¹, André L. M. Oliveira⁴

¹Aluno de graduação em Agronomia e Bolsista iniciação científica (PIBIC)

²Aluno de graduação em Agronomia e Estagiário de iniciação científica

³Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

⁴Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

A identificação de diversas espécies de bactérias com capacidade de promover o desenvolvimento de plantas através de diferentes mecanismos tem levado à busca pelo conhecimento da diversidade genética e funcional de comunidades associadas a diferentes espécies agrícolas. Entretanto, pouco se sabe sobre a dinâmica dos microrganismos em culturas ainda pouco exploradas, como a cultura do girassol, que apresenta enorme potencial para o agronegócio pela capacidade de produção de óleo para utilização como combustível. Este trabalho busca fornecer os subsídios iniciais para o desenvolvimento de formas de manejo à cultura do girassol que proporcionem uma menor utilização de insumos fertilizantes, diminuindo o impacto deste agronegócio no ambiente de produção, e tornando o balanço energético de produção de biodiesel a partir do óleo de girassol mais positivo. Neste contexto, está sendo caracterizada a comunidade bacteriana endofítica e rizosférica com potencial efeito promotor do crescimento vegetal, buscando identificar representantes com capacidade de produção de auxinas, um dos principais efeitos promotores do crescimento vegetal por microrganismos, através da melhora no desenvolvimento das raízes, afetando o comprimento e a proliferação de raízes laterais. Foi realizada a determinação da população bacteriana total da rizosfera, e endofíticos de raízes e colmo de girassol em duas variedades, cultivadas sob condições comerciais. Os isolados de colmo das duas variedades foram submetidos ao ensaio de Salkowski para a determinação do potencial de produção de auxinas. Não houve diferenças significativas entre as populações bacterianas presentes nas duas variedades de girassol estudadas, entretanto uma diferença qualitativa é claramente observada. Foram obtidos 57 morfotipos bacterianos diferentes, sendo 29 isolados da rizosfera, 15 isolados do habitat endofítico das raízes e 13 isolados endofíticos do colmo. Dos isolados utilizados para a avaliação da produção de auxinas, cerca de 40% (5 isolados) apresentaram capacidade de produção deste fitormônio. Ensaio para avaliação de outros parâmetros associados ao efeito promotor do crescimento vegetal por microrganismos estão sendo realizados, bem como a caracterização filogenética e diversidade molecular da microbiota associada ao girassol.

Apoio financeiro: CNPq e Fundação Araucária

Avaliação preliminar da produção de lipase por diferentes microrganismos

Leonardo C. Alves¹, Luciano N. Aoyagi¹, Vanessa H. Sugahara², Michele C. B. da Cruz²,
Geni Varea-Pereira³, Suely M. O. Doi³

¹Estagiário Voluntário, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

²Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

³Depto de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são serina hidrolases de considerável importância fisiológica e potencial industrial, que catalisam a hidrólise e a síntese de ligações éster formadas entre o glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. São extremamente versáteis pois catalisam inúmeras reações, sendo amplamente usadas em aplicações industriais, tais como em laticínios, indústrias de couro, detergentes, produção de cosméticos e farmacêuticos e reações de síntese orgânica, especialmente reações em meio não aquoso. Lipases microbianas constituem a principal fonte desta enzima e as fúngicas são as que mais se destacam para aplicação industrial por serem excretadas extracelularmente, facilitando sua extração de meios de fermentação. Um grande número de fungos filamentosos tem sido estudado para produção de lipase, entre eles se destacam os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Metarhizium* e *Beauveria* entre outros. Mas a demanda industrial por novas fontes de lipase e sua ampla diversidade quanto às características da enzima continua a estimular o isolamento e seleção de novas cepas de microrganismos lipolíticos. Assim o objetivo deste trabalho foi selecionar fungos produtores de lipases em meios de cultura sólido contendo rodamina e avaliar a sua produção em meio líquido. Cepas dos fungos *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, *Ganoderma sp*, *Fusarium moniliforme* foram avaliadas quanto a capacidade de produção de lipases em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA) adicionado de 3% de óleo de oliva e 0,01% de Rodamina B. As cepas selecionadas como produtoras de lipases foram inoculadas em Meios de Alves modificado e de Vogel, com 3% de óleo de oliva e com ou sem adição de Triton X-100. Os cultivos foram realizados a 28°C, 180rpm e durante 7 dias. Foram interrompidos por filtração à vácuo e centrifugação a 7000xg/4°C, obtendo-se o extrato bruto enzimático. A atividade lipolítica foi determinada através da hidrólise do substrato palmitato de *p*-nitrofenol (*p*NPP) em pH 8,0 (tampão tris-HCl 50mM contendo triton X-100), incubação a 50°C durante 10min de reação e leitura de absorvância a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1µmol de *p*NPP por minuto. Os resultados indicaram produção de lipase por *Aspergillus niger* em meio de Vogel e na presença de Triton, enquanto *Ganoderma sp* produziu enzima em Meio de Alves e na ausência de Triton. E uma atividade mais elevada foi conseguida por *Fusarium moniliforme* em Meio de Vogel tanto na ausência quanto na presença de Triton X-100.

Bioprospecção de microorganismos com capacidade de degradação de petróleo bruto a partir de solo da região de Araucária (PR) contaminado

Giovana Granzotto ^a; Paulo R. F. Marcelino ^b; André L. M. Oliveira ^c

^a - Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

^b - Estagiário de Iniciação Científica, BBTEC, CCE, UEL.

^b - Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

No dia 16 de julho de 2000, 4 milhões de litros de óleo foram despejados nos rios Barigüi e Iguaçu, no Paraná, por causa de uma ruptura da junta de expansão de uma tubulação da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar - Petrobrás). Neste acidente, cerca de 96 mil litros deste óleo foi estimado estar agregado ao solo. Os níveis de contaminação do solo foram considerados de médios a elevados, e os níveis de contaminação ainda são consideráveis. Uma das tecnologias disponíveis de remediação é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos, normalmente fungos e bactérias, capazes de converter contaminantes orgânicos (xenobióticos) em compostos menos tóxicos, como dióxido de carbono e água. Neste sentido, foi realizada a avaliação da composição da microbiota presente no solo da Repar, a partir do isolamento e caracterização da comunidade microbiana nativa capaz de degradar hidrocarbonetos recalcitrantes. Amostras de solo contaminado foram coletadas na camada de 0 a 10 cm nas dependências da Repar, dispostas em sacos plásticos e armazenadas sob refrigeração até o momento das análises. Para a contagem da fração microbiana cultivável, as amostras de solo foram seriadamente diluídas e as diluições obtidas foram inoculadas em meio mínimo (Evans et al., 2004) em triplicata. Representantes de cada morfotipo microbiano identificado foram isolados em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) 3,9% e mantidos a 30 °C por até 12 dias. Todos os isolados obtidos foram ensaiados quanto à capacidade de utilização de petróleo como fonte de carbono, utilizando os sais do meio Bushnell-Haas adicionado de 1% de óleo bruto, e avaliados após sete dias de crescimento a 28 °C sob agitação orbital. Foram testadas as capacidades de produção de surfactantes e atividade lipolítica dos isolados com capacidade de utilização de petróleo como fonte de carbono. A caracterização fenotípica seguiu a coloração de Gram, e avaliação do tipo e forma da colônia formada quando crescido o isolado purificado. Foi observada a presença de bactérias, actinomicetos e fungos em populações elevadas, com poucos morfotipos estruturando estas populações. De um total de 21 morfotipos observados, 53% eram bactérias, 33% fungos filamentosos e 14% actinomicetos. Dentre as bactérias, predominaram Gram negativas (82% dos isolados). A análise da capacidade de degradação de petróleo pelos isolados apresentou dois microrganismos com bom potencial de aplicação em estudos de biorremediação, decompondo o petróleo adicionado ao meio de cultivo a níveis não detectáveis por gravimetria após sete dias de cultivo, sendo um dos isolados apresentando grande produção de biosurfactante. Os subprodutos de degradação não foram avaliados. Uma caracterização molecular mais refinada está sendo realizada para todos os isolados bacterianos obtidos.

Comparação do ganho de peso de borregas suplementadas com minerais orgânicos e inorgânicos durante a estação de monta

Nelson P. Junior; Vanessa V. Ortunho; Wilmar S. Marçal; Alessandro Caseri;
Bianca R. Souza.

Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina – PR.

Deficiências e desequilíbrios de alguns minerais essenciais são acontecimentos comuns em diversas regiões Brasileiras, acometendo freqüentemente animais criados em sistemas extensivos, seja pelos baixos níveis de minerais nos solos e nas forragens ou por suplementações minerais realizadas de maneira incorreta. Esse fato exerce uma forte influência na capacidade produtiva e reprodutiva dos rebanhos, que apresentam animais com baixa condição corporal e conseqüente infertilidade. Esses fatos tem motivado a crescente utilização de minerais orgânicos ou quelatados nutrição animal nos últimos anos. Esse produto consiste na união entre um metal e uma molécula orgânica por meio de ligações covalentes e iônicas, permitindo o compartilhamento de propriedades entre os reagentes e também o aparecimento de propriedades exclusivas. As principais vantagens desses compostos são a alta absorção e estabilidade; alta disponibilidade biológica; maior tolerância do organismo animal (menos tóxico) e ausência de problemas de interações com componentes da dieta, que os tornam capazes de suprir com maior eficiência as exigências minerais dos ruminantes. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi mensurar e comparar o ganho de peso de borregas suplementadas com minerais orgânicos e inorgânicos durante a estação de monta, como forma a evidenciar a diferença entre os tratamentos. Foram utilizadas 30 borregas da raça Suffolk, as quais foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos iguais (n=15) e receberam os seguintes tratamentos: sal mineral inorgânico (grupo controle) e sal mineral orgânico (grupo desafio) na forma de carboaminofosfoquelatos. Os animais foram acompanhados por meio de pesagens a cada 28 dias durante os três meses da estação de monta (março, abril e maio) Os dados foram submetidos a Análise de Variância com nível de significância de 5%. Os pesos iniciais e finais foram 35,33 +/- 4,46kg e 39,26 +/- 4,36kg para as borregas suplementadas com minerais orgânicos e 37,2 +/- 6,45kg e 40 +/- 5,62kg para as fêmeas que receberam o suplemento inorgânico. O ganho de peso médio diário (GPD) das fêmeas do grupo desafio foi de 110,77g/dia contra 99,7g/dia das borregas do grupo controle. Os GPD não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O presente experimento demonstrou que não houve diferença de ganho de peso entre os animais suplementados com minerais orgânicos e inorgânicos durante a estação de monta.

Condições de fermentação na produção de levana por *Bacillus subtilis* (NATTO) isolado de grãos de soja fermentada

Thiago A. Marques¹, Siliane D. Berté², Maria A. P. C. Celligoi³

¹ Estagiário de Iniciação Científica, PIBIC/CNPq/UDEL

² Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

³ Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

Vários microrganismos produzem levana em meios ricos em sacarose, através da ação da enzima levanasacarase. Polímero que oferece várias aplicações industriais, a levana bacteriana se tornou alvo de pesquisas nas últimas décadas. Natto é um alimento japonês a base de soja fermentada por espécies de bactérias do gênero *Bacillus*. O presente trabalho teve como objetivo isolar *Bacillus subtilis* da soja fermentada e investigar a produção de levana pelo microrganismo variando as condições de cultivo. *B. subtilis* (Natto) foi isolado da soja em grão fermentado da marca comercial Natto Marufuku, onde 1 g de natto foi diluída em 9 mL de salina 0,9% seguida de diluições em serie (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) e plaqueamento. Após 24 horas de crescimento a 37°C, as colônias foram contadas e testadas quanto à pureza pelo teste de Gram. Testou-se a produção de levana variando tempo (24 e 48 horas), concentração de sacarose (100 e 300), temperatura (30 e 40°C) e agitação (100 e 200 rpm) (tabela 1). Os pré-inóculos foram padronizados em 0,2 g.L⁻¹. O processo fermentativo foi realizado em batelada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de fermentação, pH 7. A levana produzida foi precipitada do sobrenadante com etanol absoluto (1:3 v/v) e quantificada após hidrólise ácida como açúcar redutor. *B. subtilis* cresceu em todas as placas para todas as diluições, onde as colônias se caracterizaram pela coloração esbranquiçada, aspecto rugoso, bordas irregulares e textura gelatinosa. A maior produção de levana foi 170,13 g.L⁻¹ (300 g.L⁻¹ de sacarose, 48 horas de fermentação, 30°C e 100 rpm de agitação). Próximas etapas de pesquisa são necessárias para caracterização do exopolissacarídeo.

Efeito da adição dos óleos de soja e oliva, e do desodorizado da destilação de óleo de canola sobre a produção de lipases pelo fungo *Beauveria bassiana*.

Vítor Hugo P. Galerani¹; Juliana G. Tolentino¹; Dalva T. Miyagui²; Geni Varéa-Pereira²

¹ Alunos de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Londrina-PR.

² Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, UEL

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* produz enzimas extracelulares para transportar o exoesqueleto protetor de insetos. As primeiras enzimas produzidas são as lipases, já que o exoesqueleto é revestido por uma camada impermeabilizante de material hidrofóbico, seguidas por quitinases e proteases que degradam os polímeros estruturais de quitina embebidas na matriz protéica do exoesqueleto. Uma vez que a produção de lipases *in vitro* é muito menor que em condições ambientais, a adição de substratos hidrofóbicos indutores no meio de cultivo e o uso de cepas previamente ativadas em seus hospedeiros podem melhorar o rendimento da produção de lipases em condições laboratoriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição dos óleos de soja e oliva e do resíduo do processamento industrial de óleo de canola (DDC). Suspensões contendo 10^8 células/mL de *B. bassiana* CG432 foram inoculadas em três repetições a 1% em Erlenmeyers de 125mL contendo 12,5 mL de meio de cultura líquido constituído por Meio Vogel adicionado 0,4% de Triton X-100, 0,5% de glicose, 0,8% de uréia e de 4% dos substratos hidrofóbicos que foram: óleos de soja, de oliva e DDC. Os substratos hidrofóbicos foram tratados previamente com alumina (Al_2O_3) para retirada de interferentes e autoclavados separadamente. Os cultivos foram realizados a 26°C, 200rpm, durante 5 dias. As lipases extracelulares foram separadas por filtração a vácuo em banho de gelo e centrifugação a 8000g a 4°C durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram dialisados contra tampão fosfato e analisados quanto à atividade de lipases por incubação a 50°C de 0,3mL dos extratos com 0,7mL do substrato palmitato de p-nitrofenila emulsificado em isopropanol, tampão fosfato pH 8,5 e Triton X-100 durante 2,5 minutos. A atividade de lipases foi relacionada com a quantificação colorimétrica (410nm; $\epsilon 1,33 \times 10^{-4} \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de p-nitrophenol liberado pela ação da enzima. Uma unidade de lipases (UL) foi definida como μg de p-nitrophenol por mL de extrato, por minuto nas condições da reação. Os resultados demonstraram elevada produção de lipases (660,51UL) nos cultivos adicionados de óleo de soja. O tratamento prévio do óleo de oliva com 1% de alumina aumentou a atividade de lipases 3,56 vezes, de 13,29 para 47,28UL. Não foi observada atividade de lipases nos extratos obtidos dos cultivos adicionados de DDC.

Apoio financeiro: CNPq, Fundação Araucária e PROPPG/UEL

Efeito da adição de dispersante e uréia sobre a produção de lipases pelo fungo *Beauveria bassiana* CG432

Michele C.B.Cruz¹; Vanessa H. Sugahara¹; Vitor H. P. Galerani²; Juliana G.Tolentino²; Polyana M. Melo²; Dalva T. Miyagui³; Geni Varéa-Pereira³

¹ Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

² Discentes do Curso de Farmácia, UEL

³ Dep. Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

As lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolases) são definidas como carboxilesterases, catalisadores tanto da hidrólise como da síntese de acilgliceróis de cadeia longa. São enzimas largamente presentes na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais e microrganismos. Elas pertencem à classe das serino hidrolases e, ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de cofatores para que possam atuar. A função biológica das lipases é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres, di- e monoacilgliceróis e glicerol. A produção das lipases por *B. bassiana* foi induzida pela adição de triacilgliceróis. Uma suspensão contendo 10⁸ conídios/mL de *Beauveria bassiana* CG432 foi cultivada em meio de VOGEL líquido a 28°C e 180rpm utilizando matriz experimental conforme delineamento fatorial fracionado 2⁴-1. Foram realizados 9 cultivos adicionados de 3 diferentes níveis codificados como -1, 0 e +1 das variáveis Triton X-100 (X₁), glucose (X₂), óleo de oliva (X₃) e uréia (X₄). A atividade de lípases foi determinada nos filtrados extracelulares dos cultivos interrompidos no quinto dia através da medida de absorvância a 410nm do *p*-nitrofenol liberado pela ação das lípases sobre o substrato *p*-nitrofenila a 37°C durante 5 minutos. Os resultados da produção de lipases foram obtidos através de uma análise fatorial, que mostrou através do gráfico de superfície de resposta que a produção de lipases foi influenciada pela adição de triton X-100 e uréia, e pela interação entre estas variáveis conforme a seguinte equação preditiva: Atividade de lipases = 0,593 + 0,214375*X₁ + 0,249125*X₄ + 0,184625*X₁*X₄, equação esta que foi significativa ao nível de 95% de probabilidade, obteve margem de erro de 0,0071 e valor do R² de 0,9643.

Apoio financeiro: CNPq, Fundação Araucária-PR e PROPPG/UEL.

Efeito da alta temperatura na lactoferrina bovina: consequências para sua estrutura tridimensional e atividade biológica

¹Lorena Carnelocce, ¹Waleska D. Schwarcz, ²Jerson L. Silva, ²Andréa C. Oliveira, ¹Rafael B. Gonçalves

¹Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná, 86041-100, Londrina, PR, Brasil.

²Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica e Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas Jiri Jonas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína ligadora de ferro presente em várias secreções como o leite, lágrima e saliva. Ela é um monômero de 76 kDa; dividida em dois lobos (C e N), possuindo dois sítios de ligação para ferro. Muitas funções biológicas são atribuídas a Lf, como a de modular a resposta imune contra infecções e a de possuir atividade antimicrobiana. Inúmeros trabalhos demonstraram que altas temperaturas podem afetar a estabilidade e a funcionalidade das proteínas. A pasteurização é o processo térmico mais utilizado para o processamento do leite, e durante este processo, o leite é submetido a alterações drásticas de temperatura. Investigamos o efeito do processo de pasteurização na estrutura e na estabilidade da Lf. Estudos recentes também têm relatado que a capacidade de ligação a ferro da Lf é diminuída a 72°C, entretanto, as mudanças estruturais que levam a esta perda de capacidade ainda precisam ser esclarecidas. Para tanto, utilizamos espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD). Os espectros de fluorescência intrínseca foram realizados em um espectrofluorímetro e as amostras foram excitadas em 280nm e a emissão varrida de 300 a 420nm. Os espectros de CD foram obtidos num espectropolarímetro sendo analisados de 190 a 300nm. As amostras foram diluídas em tampão Tris 25mM e NaCl 150mM pH 7,5 numa concentração de 200 µg/ml. O processo de pasteurização foi realizado submetendo a amostra a 72°C durante 20s. Foram realizadas também curvas de temperatura de 25 a 105°C. Para avaliarmos se o efeito da temperatura apresentava dependência de tempo, as amostras foram incubadas a 72°C durante 110min e espectros de fluorescência foram obtidos a cada 10min. Os experimentos de CD revelaram que a estrutura secundária foi drasticamente afetada a partir de 72°C durante a curva de temperatura (25 a 105°C). Quando foi retornada a temperatura a 25°C, foi constatado que as mudanças estruturais foram irreversíveis. Estes resultados foram confirmados nos experimentos de fluorescência intrínseca. Durante a pasteurização, surpreendentemente a Lf permaneceu sem alterações significativas em sua estrutura secundária. Além disso, a curva de tempo também não mostrou alterações estruturais. Foi observado que a Lf apresentava uma diferença na estabilidade quando a temperatura foi aumentada rapidamente, simulando o processo e pasteurização, do que quando a temperatura foi elevada lentamente. Nossos resultados demonstraram também que o tratamento com alta temperatura afetou a capacidade antibacteriana da Lf. Essa diferença de sensibilidade entre a temperatura ser aplicada rápida ou lentamente, pode ser explicada pela formação de intermediários de desenovelamento durante o processo de pasteurização. Esses intermediários são a transição entre a forma nativa e desnaturada da proteína. O entendimento do processo de enovelamento da Lf e suas consequências para a atividade biológica são muito importantes para a sua utilização como componente bioativo em alimentos.

Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de quitinase por *Trichoderma harzianum* e sua atividade antagonista

Luciano N. Aoyagi¹, Leonardo C. Alves¹, Eliane S. Otaguiri¹, Oscar W. Barbosa Junior²,
Aline F. Souza³, Suely M. O. Doi⁴

¹Estagiário Voluntário, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

²Bacharel em química, UEL

³Aluna Especialização em Bioquímica Aplicada, BBTEC, CCE, UEL

⁴Depto de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

O controle biológico empregando microrganismos para prevenir doenças em vegetais tornou-se uma alternativa para reduzir a contaminação indesejável do ecossistema, resultante do acúmulo de resíduos de agrotóxicos de elevada estabilidade. Dentre os mecanismos envolvidos neste processo, destaca-se o uso de enzimas hidrolíticas, como as quitinases, que exercem um importante papel no controle biológico de fungos fitopatogênicos, pois degradam a quitina, um dos componentes da parede celular fúngica. O *Trichoderma harzianum* é um dos principais fungos produtores de quitinase, com atividade em diferentes condições ambientais e eficaz na inibição de muitos fitopatógenos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de quitinase por *Trichoderma harzianum* em meio líquido empregando diferentes fontes de carbono e verificar sua atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos. O *Trichoderma harzianum* foi cultivado em meio líquido de Vogel (v/v) suplementado com extrato de levedura (0,2 %) e uma das fontes de carbono (quitina coloidal, quitina em flocos, quitina em pó, casca de camarão moído ou micélio fúngico) (1,0%). O pH do meio foi corrigido para 6,5. Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido e inoculados com 3 discos de micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro), a 28°C, com agitação de 180 rpm durante 5 dias. Após esse período o cultivo foi interrompido e o sobrenadante resultante foi coletado após centrifugação a 4°C, sendo denominado de extrato bruto. As atividades quitinásicas foram, então, determinadas. A atividade antagonista foi realizada através da inoculação de 1 disco de micélio de *Trichoderma harzianum* no centro de uma placa de ágar batata dextrose e de 2 discos de micélio de fungos patogênicos nas laterais. A atividade antagonista foi verificada através da inibição do crescimento micelial dos fungos patogênicos após incubação a 28°C, durante 7 dias. Os resultados indicaram que o micélio fúngico foi a fonte de carbono que melhor induziu a produção de quitinase pelo *Trichoderma*, seguido de quitina em pó e casca de camarão. A quitina em flocos e coloidal induziram a produção de baixos níveis de quitinase por este fungo. A cepa de *Trichoderma harzianum* avaliada apresentou atividade antagonista contra *Fusarium moniliforme*.

Efeito de fibras da casca de aveia na expansão de compósitos biodegradáveis de amido de mandioca produzidos via extrusão

Flávia Debiagi^a; Suzana Mali^b

^a – Estagiária de Iniciação Científica, BBTEC, CCE, UEL.

^b – Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, UEL

O grande aumento da demanda de lixo tornou-se uns problemas universais, atingindo países subdesenvolvidos até mesmo países desenvolvidos. Um dos principais motivos do crescimento dos resíduos sólidos é a industrialização, tendo como conseqüência o aumento do consumo de embalagens plásticas, com o poliestireno expandido (Isopor), que além da dificuldade de reciclagem, apresenta um elevado volume e baixa densidade. O amido é de grande interesse nos estudos dos polímeros biodegradáveis, tem baixo custo, além de ser de fonte renovável, mas as embalagens de amido apresentam desvantagens: são caras quando comparadas às embalagens convencionais, não apresentam uma boa flexibilidade, pouco resistentes à umidade. Para isso necessitam de tratamentos, como a adição de fibras, que podem reforçar esta estrutura polimérica. Diante disto, este trabalho teve como objetivo caracterizar, quanto ao índice de expansão (IE) e quanto a densidade os compósitos biodegradáveis expandidos, produzidos via extrusão, a partir da mistura de amido de mandioca, glicerol (plastificante) e fibras da casca de aveia. A densidade das amostras variou de 0,86 a 0,97 g/mL, valor superior ao do poliestireno expandido, que é de 0,18 g/mL, mas comparável a valores relatados por autores que estudaram materiais a base de amido. O índice de expansão das amostras variou de 2,46 a 2,88 e, assim como a densidade, não variou em função dos diferentes teores de fibras e umidade. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que a adição das fibras e a umidade não afetaram significativamente (Teste de Tukey) as propriedades de expansão dos materiais obtidos, o que é uma vantagem e favorece a utilização das fibras no reforço dos compósitos. Este estudo é passo fundamental para posterior produção em escala industrial dos compósitos expandidos, que necessitam de condições de processo que forneçam resultados reprodutíveis de expansão, propriedade de grande importância na resistência mecânica e custo dos produtos.

Efeito de parâmetros físico-químicos na viscosidade da β -glucana produzida por *Botryosphaeria rhodina*

André L. Albuquerque, Amanda B. Flora, Aneli M. Barbosa*, Robert Dekker*, Valéria M. G. Lima

Laboratório de Biotecnologia Industrial, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, UNESP Campus de Assis - SP

*Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina

Os polissacarídeos possuem propriedades reológicas que permitem sua aplicação em diferentes áreas como alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras, onde atuam como agentes espessantes, gelificantes e estabilizantes de emulsões. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes parâmetros, tais como taxa de cisalhamento, concentração de polissacarídeo, temperatura e pH sobre a viscosidade da botriosferana produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*. O microorganismo foi inoculado em placa de Petri contendo ágar 20 g/L, glicose 10 g/L e meio mínimo de Vogel (28°C, 5 dias). Após o crescimento, retirou-se esferas de 0,5 cm de diâmetro, transferiu-se para frascos de 250 mL com 50 mL (meio mínimo de Vogel, glicose 0,5g/L) e incubou-se (48 h, 28°C, 180 rpm). O conteúdo dos frascos foi homogeneizado em blender, uma alíquota de 4 mL foi transferida para frascos de 1 L com 200 mL contendo meio mínimo de Vogel e sacarose 50g/L, (180 rpm, 28°C, 72 h). Após o cultivo, centrifugou-se (3100 rpm, 4°C, 30 min) e o EPS foi precipitado com 3 volumes de etanol, seco a 70°C, triturado e ressuspenso em água destilada. A medida de viscosidade realizou-se em viscosímetro Brookfield modelo LVDV I+. O efeito da taxa de cisalhamento foi estudado com velocidades de rotação entre 0,3 e 200 rpm, spindle 31 e solução a 1% (m/v) de EPS. Verificou-se grande decréscimo da viscosidade com o aumento da taxa, obtendo-se 14.000 cP a 0,3 rpm e 260 cP a 40 rpm. Para determinar o efeito da concentração do EPS sobre a viscosidade foram preparadas soluções entre 0,1 a 3% (m/v) (30 rpm, temperatura ambiente). Observou-se aumento da viscosidade de acordo com o aumento da porcentagem do EPS, entretanto, essa relação não foi linear, a maior viscosidade foi obtida com 3% de EPS (1500 cP), resultado 3 vezes maior observado na solução de 1,5% (550 cP). Quando a medida de viscosidade foi realizada em diferentes temperaturas (10 a 100 °C, 30 rpm, solução a 1% (m/v) de EPS), verificou-se nas temperaturas mais baixas maior viscosidade (704 cP a 10 °C), no entanto essa propriedade não é grandemente afetada pela temperatura, mantendo-se uma viscosidade média em torno de 500 cP, mesmo a 100 °C. Para estudar o efeito do pH na viscosidade, a solução a 1% (m/v) de EPS teve seu pH corrigido entre valores de 2 e 12,5 utilizando-se HCl ou NaOH 1 mol/L. Observou-se que em pH ácido obteve-se maiores valores de viscosidade (640 cP a pH 2, 520 cP a pH 4), entretanto, entre pH 6 e 12,5 não foram verificadas variações significativas, mantendo-se valores médios de 330 cP. Esses resultados mostram que a botriosferana mantém a viscosidade em diferentes situações, fazendo dela um importante EPS, podendo até ser destinado a área alimentícia.

Estratégia de triagem de compostos indutores de HSP47 e HSP72 - utilizando a metodologia de RT-PCR semi-quantitativo - e suas aplicações

Magalhães, W.V.; Ribeiro-Paes, J.T.; Silveira, D.S.; Maciel, R.P.; Martins, L.R.; Gracioso, J.S.; Nogueira, M.F.G.

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Assis, São Paulo.

Estudos têm demonstrado os efeitos protetores das HSPs ("Heat Shock Proteins"), sobre diferentes tecidos submetidos a condições estressantes; bem como a atuação dessas proteínas durante a reparação tecidual. Dada a diversidade de propriedades citoprotetoras da resposta ao estresse, existe um enorme interesse pelo descobrimento de agentes farmacológicos capazes de induzir a expressão dessas proteínas. Por essa razão, estratégias para a triagem de compostos indutores da expressão das HSPs têm sido desenvolvidas. Este trabalho propõe uma nova estratégia de triagem desses compostos, baseada em estudos que relacionam tais chaperonas moleculares aos fenômenos de cicatrização. Dessa forma, sugere-se que compostos com comprovada atividade cicatrizante podem ter as HSPs como agentes de mecanismo de ação. Para a realização dessa triagem foi proposta uma metodologia de RT-PCR semiquantitativo, na espécie murina, para a análise das HSPs 47 e 72 em tecido cutâneo normal e pós-lesão. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado RNA proveniente de fragmentos de pele em dois momentos distintos, isto é, tecido normal e pós-cicatrização. Para a amplificação do cDNA resultante foram utilizados *primers* para os genes de HSPs (desenhados para este trabalho), além de *primers* para o gene de expressão constitutiva β -actina. Após a padronização das condições da técnica RT-PCR semiquantitativa, a eficiência do modelo foi avaliada ao comparar a expressão dessas proteínas entre o tecido normal e pós-lesão. A partir dessa comparação, foi possível detectar uma expressão diminuta dos genes de HSP72 e HSP47 no tecido normal e um aumento de 2,7 e 2,5 vezes, respectivamente, – detectado mediante densitometria das bandas - na expressão no tecido cicatrizado, o que condiz com os dados disponíveis na literatura. Dessa forma, pode-se concluir que a RT-PCR semiquantitativa é uma eficiente metodologia para a análise da expressão das HSPs 47 e 72 em tecido cutâneo murino na fase pós-lesão. Sugere-se o emprego dessa técnica na estratégia de triagem de compostos indutores de HSP. Tais compostos são de grande interesse comercial, por exemplo, para inclusão em formulações cosméticas. Além disso sugere-se a utilização desse modelo para testar a higidez de pele murina, mesmo sob aparente normalidade clínica, em testes de estresse de alojamento.

Este trabalho não possui apoio financeiro

Ganho de peso de borregas suplementadas com minerais orgânicos e inorgânicos

Nelson P. Junior; Vanessa V. Ortunho; Wilmar S. Marçal; Alessandro Caseri;
Bianca R. Souza.

Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina – PR.

A correta nutrição mineral é de fundamental importância para que os animais manifestem o seu máximo potencial produtivo e para que mantenham a hígidez. No entanto, a utilização de misturais minerais inorgânicas, amplamente empregadas na pecuária Brasileira, muitas vezes não cumpre esse papel de forma eficiente. Por esse motivo, os minerais orgânicos ou quelatados tem se destacado na nutrição animal nos últimos anos. Esse produto consiste na união entre um metal e uma molécula orgânica por meio de ligações covalentes e iônicas, permitindo o compartilhamento de propriedades entre os reagentes e também o aparecimento de propriedades exclusivas. As principais vantagens desses compostos são a alta absorção e estabilidade; alta disponibilidade biológica; maior tolerância do organismo animal (menos tóxico) e ausência de problemas de interações com componentes da dieta, que os tornam capaz de suprir com maior eficiência as exigências minerais dos ruminantes. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi mensurar e comparar o ganho de peso de borregas suplementadas com minerais orgânicos e inorgânicos, como forma a evidenciar a diferença entre os tratamentos. Foram utilizadas 30 borregas da raça Suffolk, as quais foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos iguais (n=15) e receberam os seguintes tratamentos: sal mineral inorgânico (grupo controle) e sal mineral orgânico (grupo desafio) na forma de carboaminofosfoquelatos. Os animais foram acompanhados por meio de pesagens a cada 28 dias da desmama (4 meses) até o início da estação de monta conforme manejo da propriedade (8 meses). Os dados foram submetidos a Análise de Variância com nível de significância de 5%. Os pesos iniciais e finais foram 20,26 +/- 4,54kg e 35,33 +/- 4,46kg para as borregas suplementadas com minerais orgânicos e 21,9 +/- 4,9kg e 37,2 +/- 6,45kg para as fêmeas que receberam o suplemento inorgânico. O ganho de peso médio diário (GPD) das fêmeas do grupo desafio foi de 84,84 g/dia contra 80,17 g/dia das borregas do grupo controle. Os GPD não apresentaram diferença estatística (p< 0,05) entre os tratamentos. O presente experimento demonstrou que não houve diferença entre o ganho de peso dos animais suplementados com minerais orgânicos e inorgânicos.

Genotoxicidade do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* avaliado por meio do Teste do Micronúcleo e Aberração Cromossômica.

Yanai, F. Y.;Magalhães, E. A.;Silva, L. P.;Silva, R. M. G.

Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências e Letras – Campus - Assis/SP –
Departamento de Ciências Biológicas – Laboratório de Tecnologia de Fitoterápico

O Teste de Micronúcleo (MN) e de Aberração Cromossômica (AC) em medula óssea de roedores *in vivo* é aceito e recomendado para a avaliação e o registro de produtos naturais e farmacêuticos. A importância destes é devido a capacidade de avaliarem ocorrência de mutações. *Pyrostegia venusta* destaca-se pelo seu uso medicinal em vitiligo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a genotoxicidade do extrato de *P. venusta* em células de medula óssea de camundongos, por meio do Teste do MN e do AC. O material vegetal (flores) foi coletado na região de cerrado, selecionado, seco, triturado, e deste feito o extrato com etanol PA em agitador mecânico por 24 horas. Foram utilizados camundongos (machos de 40g). Divididos em grupos experimentais e controle (n=5). Os grupos experimentais receberam concentrações diferentes (G50=50; G100=100; G200=200 mg/Kg), por via oral, durante 7 dias. Os grupos controles (GC) foram compostos por animais que receberam água. O grupo controle positivo (GCP) recebeu Ciclofosfamida® por v.i. Realizou-se o sacrifício, retirada da medula óssea e homogeneização. Para a preparação das lâminas foi realizado o esfregaço para o teste de MN e fixação para o teste de AC. As lâminas foram secas ao ar livre e analisadas em microscópio (1000X). A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (%Média de EPCMN \pm desvio padrão) foram: GCN=0,35 \pm 1,87; GCP=2,87 \pm 9,02; G50=0,09 \pm 0,83; G100=0,16 \pm 0,10 e G200=0,10 \pm 0,71. O teste de AC apresentou a frequência (% Média de AC \pm Desvio padrão) GCN=0,12 \pm 1,87; GCP=0,62 \pm 5,61; G50=0,12 \pm 1,58; G100=0,072 \pm 0,54 e G200=0,124 \pm 1,64. Na AC foram consideradas as quebras, anéis e gaps. A frequência de EPCMN dos grupos experimentais foram significativamente inferiores ao compararmos com os dos GC. A frequência de cromossomos aberrantes não teve diferença significativa se comparada com o GCN, mas foi estatisticamente menor que a do GCP. De acordo com os resultados, a *P.venusta* não apresentou atividade genotóxica.

Identificação de diferentes transcritos do gene que codifica proteína receptora de rianodina tipo 1 em frangos submetidos ao teste do halotano

Ziober, I. L.¹; Paião, F.G.¹; Binneck, E.²; Coutinho, L.L.³; Nepomuceno, A.L.²; Shimokomaki, M.¹

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, Londrina - PR

³ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba - SP

A proteína receptora de rianodina (RyR) está presente no retículo sarcoplasmático (RS) das células musculares onde formam grandes canais intracelulares que permitem a saída de Ca^{2+} do RS em resposta a despolarização da membrana plasmática, fazendo com que ocorra a contração muscular. No músculo esquelético de aves, anfíbios e peixes, duas isoformas do receptor de rianodina, denominadas α e β correspondendo as isoformas 1 e 3 de mamíferos, respectivamente – são co-expressas, enquanto em mamíferos verifica-se apenas a isoforma RyR1. Alterações na região N-terminal desta proteína têm sido relacionadas com o desenvolvimento de doenças como a Hipertermia Maligna em humanos, provocada pela exposição ao anestésico halotano, bem como problemas tecnológicos na indústria de produtos cárneos processados como as carnes PSE (*pale, soft and exudative* – pálidas, flácidas e com exsudação) em suínos e perus. Em frangos, o mecanismo de desenvolvimento das carnes PSE ainda não está completamente elucidado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de possíveis mutações no RNAm que codifica a porção N terminal desta proteína em frangos submetidos ao teste do halotano. O teste do halotano foi utilizado como um pré-selecionador dos animais com maior tendência a terem alguma alteração nesta região do RNAm e consistiu na exposição das aves a uma atmosfera de 3% de halotano com um fluxo de 6L/minuto, durante 5 minutos e ao final do tempo foram avaliadas quanto à rigidez muscular nos membros inferiores. Sobre um total de 300 aves de linhagem comercial, com idade de 42 dias, foi feita a seguinte classificação: positivas (enrijecimento dos membros inferiores), negativas (relaxamento) e intermediárias (um membro enrijecido e outro relaxado). Foram abatidas 10 aves de cada classificação e as amostras de peito (*Pectoralis major*) foram seccionadas e coletadas dentro de cinco minutos após o abate, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas congeladas a $-80^{\circ}C$ para as extrações de RNA total. A partir do cDNA foram realizados as PCRs para amplificação da região a ser estudada, utilizando *primers* degenerados. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, apresentando peso molecular entre 500 e 600 pb. Esses produtos foram purificados a partir do gel de agarose, clonados e seqüenciados. Das 24 seqüências obtidas até o momento, 10 apresentaram alterações em pelo menos um nucleotídeo, sendo que uma das seqüências apresentou um *stop* códon, ou seja, interrupção abrupta da tradução do RNAm em proteína. Esse variante de transcrito foi obtido a partir de uma ave que apresentou resposta intermediária ao teste do halotano. A partir disso, novos estudos estão sendo desenvolvidos na tentativa de confirmar a possível associação dessa alteração com a resposta ao halotano em frangos.

Apoio financeiro: CNPq, Fundação Araucária

Imobilização de lipases produzidas por *Beauveria bassiana* CG432 em diferentes suportes: Um estudo preliminar

Vanessa H. Sugahara¹, Polyana M. Melo², Juliana G. Tolentino², Geni Vareá Pereira³.

¹ Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

² Aluna de graduação em Farmácia e Bolsista iniciação científica (PIBIC);

³ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina.

Lipases (EC 3.1.1.3) são catalisadores de diferentes tipos de reações sobre os mais variados substratos e têm sido utilizadas na indústria alimentícia para produção de aromas, como aditivo na produção de detergentes, produção de biodiesel e no tratamento de efluentes. Técnicas de imobilização promovem aumento da estabilidade e a recuperação das lipases aplicadas nestes processos. O objetivo do trabalho foi realizar um estudo preliminar de imobilização de lipases produzidas por *B. bassiana* utilizando diferentes suportes. Lipases extracelulares de *B. bassiana* CG423 foram produzidas em cultivo submerso em meio segundo Vogel, acrescido de óleo de oliva 3%, CaCl₂ 0,1% e Triton X-100 0,1%, em frascos Erlenmeyer contendo 10% de meio. 1% de uma suspensão contendo 10⁸ conídios/mL foi inoculado ao meio e incubados a 28°C, 200rpm, 5 dias e interrompidos por filtração a vácuo e centrifugação a 8.500g, 15min, 4°C. Os filtrados (extratos brutos) foram dialisados exaustivamente em papel celofane contra tampão fosfato 5mM, pH 7,0, 4°C. Foram testados seis diferentes suportes para imobilização, por meio de três técnicas - adsorção seguida de precipitação com 50% de acetona gelada (CaCO₃, Celite 545, Al(OH)₃ e SiO₂); simples adsorção com resina Dowex, equilibrada overnight em tampão fosfato 50mM, pH7,0; e ligações covalentes de quitina, contendo glutaraldeído 10µM. A imobilização procedeu com a aplicação de 10mL do extrato bruto em 0,5g de suporte, durante 1 hora, 25°C, 300rpm, seguido de filtração à vácuo e secagem em dessecador. O teor de proteínas imobilizadas foi avaliado através da diferença entre a concentração inicial e àquela presente no sobrenadante, através do método de Bradford (padrão soro albumina bovina 250µg/mL). A atividade de lipases imobilizadas foi avaliada por meio da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila, a 37°C, pH 8,5 (tampão tris-HCl 50mM contendo Triton X-100), leitura a 410nm, tanto no sobrenadante como em 50mg de suporte-enzima. A atividade de lipolítica foi expressa em UI/g de suporte ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). O rendimento foi calculado através da relação entre as atividades específicas de lipases imobilizadas e lipases inicialmente presentes no extrato bruto. Celite 545 e CaCO₃ foram os suportes que apresentaram maior taxa de imobilização protéica, de 88,13% e 84,21%, enquanto Dowex reteu apenas 8,91% das proteínas. Por outro lado, este apresentou melhor rendimento, de 35,67%, seguido de SiO₂, CaCO₃ e Celite 545, com rendimentos de 11,21%, 3,34% e 2,31%. Pode-se concluir que a imobilização protéica não prediz atividade lipolítica, pois o sítio ativo das lipases pode ser alterado nas diferentes interações enzima-suporte. Dessa forma, a determinação da atividade lipolítica no sobrenadante não é um método adequado para avaliação da técnica de imobilização.

Apoio financeiro: CNPq, Fundação Araucária e PROPPG/UEL

Inibidores de α -Amilase Extraídos de Sementes de Jaca (*Artocarpus sp*).

Paulo Cesar C. Bonilha¹. Dalva T. Miyagui². Geni Varéa-Pereira².

¹Discente de Especialização em Bioquímica Aplicada.

²Docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL.

Muitos compostos tem a capacidade de se combinar com determinadas enzimas, tanto de maneira reversível como irreversível, bloqueando dessa forma a catálise enzimática. A jaca (*Artocarpus sp*) é uma fruta originária da Índia, e hoje é muito popular aqui no Brasil. Alguns estudos já foram realizados com este fruto, tendo em vista análises físicas e físico-químicas, buscando seus dados nutritivos. Existem ainda trabalhos realizados com a semente, os quais revelaram presença de inibidores de tripsina e jacalina (proteína com capacidade hemaglutinante), tornando esse vegetal um forte aliado no controle de pragas. Existem diversos estudos baseados nos conhecimentos sobre enzimas e inibidores de enzimas de diversos vegetais, sendo empregados até mesmo no tratamento de doenças como a diabetes. Neste trabalho foi determinada a atividade dos inibidores de α -amilase extraídos da semente de jaca, sobre Amilase Pancreática de Porco (APP) e Amilase de *Tenebrio molitor* (TM). As proteínas foram extraídas em solução salina 0,9% e a determinação do inibidor de amilase foi utilizando a formação do complexo iodo amido. Os resultados demonstraram que o extrato apresenta uma concentração total de proteínas de 5,7mg/mL, apresentando uma baixa inibição sobre TM (12,4%), porém uma inibição satisfatória sobre APP (64%).

Migração de solventes em filmes plásticos biodegradáveis sintéticos e de fonte renovável

Oliveira, Leizi Marchi^a; Debiagi, Flávia^b; Mali, Suzana^c; Scapim, M.R.S.^D; Yamashita, F.^d

^a- Aluna do curso de Especialização em Bioquímica Aplicada, BBTEC, CCE, UEL

^b- Aluna de Iniciação Científica, Graduanda em Farmácia, BBTEC, CCE, UEL

^c- Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

^d- Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), CCA, UEL

A reciclagem de produtos constituídos por polímeros sintéticos e sua substituição por materiais biodegradáveis têm sendo estudadas como alternativas para reduzir a poluição ambiental causada pelos polímeros convencionais. As matérias-primas utilizadas podem ser provenientes de fonte renovável, como os poli-hidroxialcanoatos (PHA), dentro os quais o poli-β-(hidroxibutirato) (PHB), poliésteres microbianos de alto peso molecular. Outros poliésteres biodegradáveis, de fonte não renovável, têm sido bastante estudados, como o polibutileno tereftalato co-adipato (PBAT). A utilização de um biomaterial pode ter várias aplicações industriais, destacando-se a indústria de alimentos, que utiliza em grande escala as embalagens plásticas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera, dentre outras resoluções, que as embalagens e equipamentos plásticos nas condições previsíveis de uso, não devem ceder aos alimentos substâncias indesejáveis, tóxicos ou contaminantes, que representem um risco à saúde humana, em quantidades superiores aos limites de migração total e específica. Portanto é previsto o limite de migração total para todas as embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, além da realização de testes sensoriais, que averiguam a presença de odor estranho no material ou a ocorrência de alteração de sabor e odor do alimento resultante do contato com a embalagem. O objetivo do presente trabalho foi estudar a migração de substâncias de filmes plásticos em contato com solventes como a água, ácido acético, etanol e heptano. Foram testados quatro tipos de amostras: filme de polibutileno tereftalato co-adipato (PBAT - Ecoflex®) puro e filme de PBAT/amido na proporção 60/40, materiais biodegradáveis, e ainda, filmes de polietileno de baixa densidade e de polietileno de baixa densidade oxibiodegradável, os dois últimos empregados como controle, a serem comparados com os biodegradáveis. Os testes de migração total seguiram a metodologia prevista pela Portaria nº 26/MS/SVS da ANVISA, onde é determinado o limite de migração total de 5mg/dm². Nos resultados obtidos foi possível constatar que nenhuma das amostras desenvolveu cor ou odor estranho no contato com os solventes estudados, assim como, não apresentou migração para os solventes estudados, tanto no contato prolongado, quanto no contato momentâneo. Estes resultados mostram que as amostras testadas, quanto ao quesito de migração, podem ser empregadas como embalagem de alimentos.

Perfil Metabólico de Bovinos da Raça Nelore Suplementados com Cromo Orgânico

Nelson P. Junior; Carlos H. Montemor; Wilmar S. Marçal; Vanessa V. Ortunho;
Alessandro Caseri; Bianca R. Souza.

Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina – PR.

O cromo (Cr) é um mineral traço que parece ser requerido para adequado metabolismo de carboidratos e lipídios nos mamíferos, melhorando a comunicação entre insulina e seus receptores que estão localizados na membrana celular de tecidos sensíveis à mesma. Nos bovinos de corte, a escassez de trabalhos científicos desenvolvidos em condições tropicais e os efeitos variáveis da suplementação com Cr na tolerância à glicose e em outros parâmetros do metabolismo de carboidratos motivam a realização de novas pesquisas. Por estes antecedentes, o objetivo desse experimento foi avaliar o efeito da suplementação com Cr orgânico sobre o teor de glicose, colesterol e lipídios totais (perfil metabólico) em bovinos da raça Nelore. Utilizaram-se 20 bezerros Nelore, com peso inicial de 179 kg e 6 meses de idade, distribuídos inteiramente ao acaso em 2 tratamentos de 10 animais por tratamento, sendo um suplementado com Cr orgânico (1 mg de Cr na forma de carboaminofosfoquelato de Cr) veiculado em sal mineral com estimativa de consumo de 50 g/bezerro/dia. O tratamento controle recebeu o mesmo sal mineral sem Cr, com a mesma estimativa de consumo. O sal mineral foi fornecido *ad libitum* e os animais foram mantidos em piquetes de *Brachiaria brizantha* e *decumbens*, em forma de rodízio durante 348 dias. Para a mensuração de glicose, colesterol e lipídios totais, foi coletado sangue, após 14 horas de jejum de alimentos sólidos e líquidos, a cada 10 dias nos primeiros 40 dias de experimento e após este período, a cada 28 dias. Não houve efeito significativo ($P < 0,05$) da suplementação com Cr sobre a glicose plasmática (72,8 mg/dL e 74,46 mg/dL), colesterol (118,96 mg/dL e 122,42 mg/dL) e lipídios séricos totais (258,4 mg/dL e 266,4 mg/dL), para os grupos controle e suplementado com Cr orgânico, respectivamente. Pode-se concluir que a suplementação com Cr orgânico para bovinos Nelore, sob pastejo, não interferiu no perfil metabólico dos componentes estudados.

Potencial antioxidante e citotóxico dos extratos de *Pyrostegia venusta* e *Kielmeyera coriacea*.

Kobayashi, E. A.;Silva, D.C.; Rodrigues, D.T.M.;Silva, L. P.;Silva, R. M. G.

UNESP– Faculdade de Ciências e Letras - Departamento de Ciências Biológicas –
Laboratório de Tecnologia de Fitoterápicos.

As fontes naturais de antioxidantes e precursores de defesa contra o estresse oxidativo são de suma importância para a homeostase celular. Os vegetais possuem compostos químicos definidos como bioativos não-nutricionais, sendo que os flavonóides possuem uma conformação estrutural ideal para o seqüestro de radicais livres. O trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante e citotóxico dos extratos de *P.venusta* e *K. coriacea*. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pela capacidade doadora de H⁺ para o radical estável DPPH. Os testes foram feitos com o DPPH, sendo adicionados 50µL dos extratos nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0mg/mL, por 15 minutos e a absorbância medida a 517nm em espectrofotômetro UV-Vis. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela seguinte fórmula: % Atividade antioxidante = - [(amostra x 100/controlado)-100]. Ovos de *Artemia salina* foram incubados em solução salina pH 9,0 (5,0mg/100mL), mantidos com iluminação artificial a 28°C e com saturação de oxigênio. Após 24 horas, as larvas foram filtradas, separadas e mantidas em incubação por mais 24 horas. Após este período foi realizado o tratamento com *P.venusta* e *K.coriacea*. O teste antioxidante por meio do DPPH demonstrou que o extrato de *P.venusta* apresentou atividade antioxidante na concentração de 1,0mg/mL de 75,46%, sendo que as demais concentrações apresentaram 3,92; 3,77 e 11,31% respectivamente. Para o extrato de *K.coriacea* apresentou atividade de 63,22% para a concentração de 1,0mg/mL, sendo que para as demais concentrações foi de 0,87; 1,10 e 6,71% respectivamente. Os extratos de *P. venusta* e *K.coriacea* não apresentaram toxicidade aguda estatisticamente significativa, pois a mortalidade de *A. salina*, tratadas com diferentes concentrações dos extratos, foi inferior à dos grupos controle positivo e negativo. De acordo com resultados obtidos foi possível concluir que as espécies avaliadas apresentam atividades antioxidantes e não induz a citotoxicidade.

Produção e isolamento de lipases produzidas pelo fungo *Beauveria bassiana* CG432 na presença de óleo de oliva.

Rafael F. Santos¹; Leandro F. dos Santos¹; Anelize Bauermeister¹; Cristina P. B. de Melo¹; Kelin F. Cândido¹; Leandra E. Kerche¹; Leticia C. Babujia¹; Luciana C. Grade¹; Luciana H. Ferreira¹; Renata C. B. Darpossolo¹; Thais P. C. Porto¹; Vanessa H. Sugahara¹; Geni Varéa-Pereira².

¹VII Turma do Mestrado em Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL

²Docente Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL – e-mail: gpvarea@uel.br

As lipases ou triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3) são enzimas que atuam sobre ligações éster presentes em alcilgliceróis. Estas enzimas apresentam um importante potencial biotecnológico, sendo empregada nas indústrias alimentícias, de detergentes, no tratamento de efluentes, na área médica e atualmente na produção de biodiesel. A *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico facilmente isolado de insetos mortos na natureza, produz enzimas extracelulares como proteases, quitinases e lipases, capazes de degradar polímeros estruturais da cutícula de insetos. O objetivo do trabalho foi produzir e isolar lipases de *B. bassiana* CG432, em meio de cultivo líquido, adicionando óleo de oliva como agente indutor. Uma suspensão da cepa fúngica, previamente selecionada como produtora de lipases em meio contendo Rhodamina B, foi padronizada a 10^8 conídios/mL e inoculada em duplicata a 1% em meio de cultivo de ALVES, adicionando-se 1,5 e 3% de óleo de oliva. Os cultivos foram incubados a 28°C a 160 rpm por 5 dias e interrompidos através de filtração a vácuo e centrifugação (7.500 x g por 20 min). Os sobrenadantes (ELC) foram dialisados exaustivamente contra tampão fosfato 5mM, pH 7,0 a 4°C, liofilizados e as lipases isoladas por cromatografia de troca-iônica em resina DEAE-celulose empacotada em coluna de vidro (20 x 2 cm), com eluição por gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5 e de 0,5 a 1M. Foram coletadas amostras de 3 mL em fluxo de 1mL/min e realizadas leituras em 280 nm. As alíquotas do ELC e as frações da cromatografia com maior atividade de lipase foram reunidas e analisadas quanto ao teor de proteínas e carboidratos pelos métodos de Bradford e fenol sulfúrico, respectivamente. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a liberação de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de p-nitrofenol por mL de extrato enzimático. A biomassa foi quantificada por gravimetria (70°C). Enquanto a produção de lipases no cultivo adicionado de 3% de óleo de oliva foi três vezes maior em relação ao cultivo adicionado de 1,5%, com atividades específicas de 48,84 e 15,30 U/mg, respectivamente, a produção de biomassa, nas mesmas condições, apenas dobrou (0,1471g em 1,5% e 0,2607 em 3%), sendo, portanto, proporcional ao aumento da concentração de óleo de oliva. A cromatografia de troca iônica mostrou-se um método eficiente para a purificação da enzima, uma vez que a eluição em tampão contendo aproximadamente 0,15 M de NaCl separou um pico de proteínas com atividade específica de 73,95 U/mg, e 78% de rendimento em relação ao ELC. Os resultados demonstraram que a adição de óleo de oliva no meio de cultura produziu maior efeito sobre a produção de lipases que sobre a produção de biomassa pelo fungo *B. bassiana*.

Produção de lacases pelo fungo *Beauveria bassiana*

Danielle C. Cardoso^a; Geni Varéa-Pereira^b

^a Aluna do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina.

^b - Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

Fungos entomopatogênicos podem ser isolados a partir de insetos mortos na natureza e apresentam aplicabilidade em métodos biológicos como a redução da contaminação ambiental por inseticidas químicos. A infecção ocorre pela secreção de lipases, proteases e quitinases devido ao contato do fungo com polímeros lipídicos que recobrem a cutícula do inseto e por proteínas e quitinas formadoras das camadas mais internas, respectivamente. Como a cutícula do inseto-hospedeiro é constituída também por uma camada de polifenóis, o presente trabalho investigou a produção de lacases pelo fungo *Beauveria bassiana* através de um delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} em cultivos submersos a 28°C, 180 rpm durante sete dias, utilizando meio de Vogel adicionado de 0,4mM de catecol como indutor, e as variáveis independentes: 0,5, 1 e 1,5% de glucose, e 1, 2 e 4% de extrato de levedura, peptona e extrato de malte. A análise de variância e superfície de resposta dos resultados obtidos indicaram maior produção de lacases nos cultivos contendo 0,5% de glucose como fonte de carbono, e 4% de peptona, extratos de levedura e malte, como fonte de nitrogênio orgânico. Os controles dos testes de atividade enzimática apresentaram alguns interferentes que devem ser removidos em experimentos posteriores para a obtenção de melhores resultados.

Remoção de chumbo pela cianobactéria *Lyngbia sp*: biomassa seca x biomassa úmida

Liege A. Kawai¹, Luana V. Silva¹, João C. Alves², Maria Helena P. Pinotti¹

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

²Departamento de Química, CCE, UEL

O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de remoção de chumbo (Pb^{2+}) em solução pela biomassa seca em relação à biomassa úmida da cianobactéria *Lyngbia sp*. Os cultivos foram feitos em 18 erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BG11 com micronutrientes e 1 mL de cianobactéria, sendo mantidos durante 21 dias sob agitação constante de 120 rpm, a uma temperatura constante de 28 °C. Após a interrupção do crescimento das células, a biomassa foi separada por centrifugação a 10000 x g, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C e ressuspensa em água destilada, completando 6 mL. Em seguida, foi colocado 1 mL de biomassa em cada um dos 3 cadinhos com massa em gramas previamente definida, os quais foram aquecidos a uma temperatura constante de 70 °C e os 3 mL restantes foram reservados em câmara fria. Após 24h, tanto a biomassa úmida quanto a biomassa seca foram ressuspensas separadamente completando 20 mL cada, colocando 5 mL em por membrana de diálise, que foram imersas durante 2 horas em 250 mL de solução de $PbCl_2$ (2mg/L), sob agitação constante de 100 rpm. Amostras de 10 mL foram retiradas nos tempos 0, 1h e 2h. A quantidade de metal removido foi quantificada por Espectrofotômetro de Absorção Atômica antes e após o contato com a biomassa da cianobactéria; a produção de biomassa foi determinada por gravimetria. Na primeira hora, a biomassa úmida removeu 77,71% e a biomassa seca removeu 74,90% do chumbo inicial. Na segunda hora, a biomassa úmida e a biomassa seca removeram respectivamente, 82,71% e 80,10% da solução de chumbo inicial. Pôde-se concluir que a biomassa úmida de *Lyngbia sp* é mais eficiente na remoção de chumbo do meio aquoso do que sua biomassa seca.

Remoção de chumbo pela cianobactéria *Nostoc sp*: biomassa seca x biomassa úmida

Liege A. Kawai¹, Luana V. Silva¹, João C. Alves², Maria Helena P. Pinotti¹

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

²Departamento de Química, CCE, UEL

O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de remoção de chumbo (Pb^{2+}) em solução pela biomassa seca em relação à biomassa úmida da cianobactéria *Nostoc sp*. Os cultivos foram feitos em 18 erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BG11 com micronutrientes e 1 mL de cianobactéria, sendo mantidos durante 21 dias sob agitação constante de 120 rpm, a uma temperatura constante de 28 °C. Após a interrupção do crescimento das células, a biomassa foi separada por centrifugação a 10000 x g, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C e ressuspensa em água destilada, completando 6 mL. Em seguida, foi colocado 1 mL de biomassa em cada um dos 3 cadinhos com massa em gramas previamente definida, os quais foram aquecidos a uma temperatura constante de 70 °C e os 3 mL restantes foram reservados em câmara fria. Após 24h, tanto a biomassa úmida quanto a biomassa seca foram ressuspensas separadamente completando 20 mL cada, colocando 5 mL em por membrana de diálise, que foram imersas durante 2 horas em 250 mL de solução de $PbCl_2$ (2mg/L), sob agitação constante de 100 rpm. Amostras de 10 mL foram retiradas nos tempos 0, 1h e 2h. A quantidade de metal removido foi quantificada por Espectrofotômetro de Absorção Atômica antes e após o contato com a biomassa da cianobactéria; a produção de biomassa foi determinada por gravimetria. Na primeira hora, a biomassa úmida removeu 75,49% e a biomassa seca removeu 53,73% do chumbo inicial. Na segunda hora, a biomassa úmida e a biomassa seca removeram respectivamente, 76,50% e 72,6% da solução de chumbo inicial. Pôde-se concluir que a biomassa úmida de *Nostoc sp* é mais eficiente na remoção de chumbo do meio aquoso do que sua biomassa seca.

Resistência mecânica de filmes plásticos de amido de mandioca e goma xantana

Cristina P.B. Melo^a; Hanelore G. Mendes^b; Suzana Mali^c; Maria Vitória E. Grossmann^d;
Fábio Yamashita^d

^a- Aluna do curso de Mestrado em Biotecnologia, BBTEC, CCE, UEL

^bEstagiário Voluntário, Graduanda em Química, UEL

^c- Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

^d- Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), CCA, UEL

A crescente busca por materiais biodegradáveis como substituintes dos plásticos tradicionais aponta para uma série de polímeros, tanto de origem natural, como sintéticos. Dentre os polímeros de origem natural, o amido é bastante promissor por apresentar ampla disponibilidade e baixo custo, além de ser proveniente de fonte renovável. Embora apresente todas estas vantagens, filmes compostos somente por amido apresentam propriedades mecânicas pobres e sensibilidade às diferentes condições ambientais, o que torna seu uso limitado como substituinte dos polímeros convencionais. Para superar estas limitações, a associação com aditivos e mudanças nos processos de produção têm sido experimentados. A utilização de glicerol como plastificante já é bastante comum em formulações de filmes de amido, entretanto, não é suficiente para melhorar as propriedades destes produtos. Os hexopolissacarídeos microbianos também se apresentam como alternativa devido a sua característica plastificante e de viscosidade. A associação entre amido e goma xantana apresenta comprovada ação sinérgica de melhora de propriedades mecânicas e diminuição da instabilidade e envelhecimento de produtos de amido. Neste trabalho foram estudados filmes formulados com amido, glicerol e goma xantana, produzidos via extrusão, empregando-se uma extrusora monorosca piloto, sendo que cada formulação foi extrusada duas vezes para a homogeneização dos ingredientes e formação dos *pellets* e uma terceira vez para a formação de filme através da técnica de sopro. O efeito da adição de goma xantana sobre as propriedades mecânicas dos filmes foi avaliado através do parâmetro de resistência máxima à tração, que expressa a resistência de um material ao rompimento quando este é submetido à tração. Foram estudadas quatro diferentes formulações: uma contendo amido e glicerol e outras três contendo amido, glicerol e goma xantana nas proporções de 2, 4 e 10g de xantana/100g de amido. Amostras dos filmes produzidos foram condicionadas por 3 dias a 32,8 e 64,5% de umidade relativa (UR) e submetidas ao teste de tração mecânica em um texturômetro Stable Micro Systems modelo TA.TX2i de acordo com as Normas da *American Society for Testing and Material* – (ASTM D882-91). Os resultados demonstraram que, dentre as formulações condicionadas a 32,8% UR, a formulação contendo 2g de xantana/ 100 g amido apresentou uma resistência à tração significativamente maior que as demais (4 e 10g de xantana/ 100g amido), que apresentaram desempenho similar ao da formulação composta de amido e glicerol. Sob umidade relativa de 64,5%, as formulações não apresentaram grande variação de desempenho quando comparadas, mas foram menos resistentes que as amostras condicionadas a 32% de UR, muito provavelmente por causa do efeito plastificante da água. Portanto, pode-se perceber que tanto as condições de armazenamento, quanto a adição da goma xantana, podem afetar as propriedades dos filmes produzidos.

Scale-up in vitro de anticorpo anti-aflatoxina b₁ visando desenvolvimento de imunobioferramentas

Cássia R. Takabayashi; Joice S. Santos; Dani L. D. Silva; Tatiane M. Oliveira; Jayme T. P. Almeida-Filho; Luciana Hayashi; Simone Fujii; Elisabete Y. S. Ono; Eiko N. Itano; Osamu Kawamura; Elisa Y. Hirooka

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA, Universidade Estadual de Londrina

Aflatoxina B₁ (AFB₁) é um carcinógeno classificado no Grupo 1 pela 'International Agency of Research on Cancer' (IARC) e, constitui o principal metabólito secundário tóxico produzido por *Aspergillus* do grupo *flavus*. A produção irrestrita de anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁ consiste de ferramenta fundamental para o avanço nacional visando a inserção em nanobiotecnologia aplicada, reduzindo a dependência de importação de imunorreagentes no controle de qualidade de alimentos. I.e., proporcionaria a obtenção de imunoferramentas como a coluna de imunoafinidade, à inovação direcionada ao desenvolvimento de imunossensores e microarrays. O trabalho objetivou na produção de AcM *in vitro*, iniciando o cultivo de hibridoma AF2 em meio RPMI 1640 suplementado com 15 % de soro fetal bovino, seguida de substituição gradativa pelo meio *Hybridoma*-SFM (*serum free medium*) (H-SFM) na proporção de 25 %, 50 %, 75 % e 100 %. Após incubação a 37 °C com 5 % de CO₂, o cultivo foi centrifugado (2400 x g, 10 minutos, 4 °C) e, o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio (saturação de 40 %), posteriormente, foi dialisado com tampão fosfato-salino (PBS) (4 x 1L), seguida de água ultra-pura (4 x 1L). A concentração protéica foi estimada pela determinação por absorção a 280 nm, sendo analisado o teor pós-centrifugação, pós-precipitação com sulfato de amônio e pós-diálise. Em paralelo, procedeu-se ensaio imunoenzimático i-ELISA para avaliar a atividade de AcM anti-AFB₁. Comparando quantidade de proteína nas três etapas, observou-se uma diminuição no decorrer do processo de precipitação e purificação do AcM (682,5; 107,75; 103,95 mg em meio RPMI 1640 pós-centrifugação, pós-precipitação e pós-diálise, respectivamente, observando-se a mesma tendência em outras composições de RPMI/H-SFM). O fato demonstra a eliminação de outras proteínas da solução devido à precipitação do AcM com sulfato de amônio a 40 % saturação, seguida de diálise para separar AcM de moléculas menores. No meio RPMI 1640 obteve-se maior produção total de AcM (148,5 mg na pós-diálise), enquanto que no cultivo somente com o meio H-SFM, a produção no pós-diálise atingiu 10,44 mg de proteína. Em todas as composições de meio RPMI/H-SFM confirmaram a atividade anti-AFB₁ (OD_{450nm} entre 0,427 a 0,803 em diluição até 1:5000 dos AcM). O anticorpo produzido apresentou atividade anti-AFB₁ e quantidade suficiente para desenvolvimento métodos imunquímicos, com destaque para confecção de coluna de imunoafinidade.

Tratamento biológico de corantes e efluentes da indústria têxtil por *Ganoderma spp*

Eliane S. Otaguiri¹, Leonardo C. Alves¹, Luciano N. Aoyagi¹, Aline F. Souza²,
Suely M. O. Doi³

¹Estagiário Voluntário, ²Aluna do Curso de Especialização em Bioquímica Aplicada,
³Docente do Depto de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC), CCE, UEL

As indústrias têxteis são responsáveis pela liberação de efluentes corados ao meio ambiente. Os corantes têxteis são misturas de estruturas moleculares complexas, com alta estabilidade e por isso de difícil biodegradação, tornando-se compostos tóxicos e cancerígenos. Há diversas formas de tratamento dos efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos, sendo que o tratamento biológico com a utilização de microrganismos tem se demonstrado muito eficiente e economicamente viável. Os fungos basidiomicetos denominados “da podridão branca da madeira” tem se destacado como bons degradadores de efluentes. As principais enzimas envolvidas na biodegradação são lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, as quais podem ser produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a descoloração dos corantes e efluentes têxteis realizadas pelo *Ganoderma spp* em meio líquido. Os experimentos foram realizados em meios de Vogel (2%) suplementado com glucose (0,5%), extrato de levedura (0,2%) e 12,5mL de efluente corado em volume final de 25mL, pH inicial de 5,0, em erlenmeyer de 125 mL. Os cultivos foram incubados a 28°C e 180 rpm de agitação, durante 7 dias ou até se observar a descoloração. Após esse período o processo foi interrompido por centrifugação e as análises de remoção de cor e atividade de lacase determinados. Os resultados obtidos em relação a atividade de lacase e ao cálculo de percentagem de descoloração foram respectivamente: Empresa 2 (0,01 U/mL e 99,97%), Empresa 3 (0,12 U/mL e 81,40%), Remazol Preto Intenso (0,33 U/mL e 8,77%), Reativo Brilliant Orange (0,40 U/mL e 99,97%) e Remazol Brilliant Blue (0,09 U/mL e 100%). Esses resultados sugerem que o *Ganoderma spp* apresenta um bom potencial para ser utilizado em bioprocessos para remoção de cor de efluentes e corantes têxteis e que além da lacase outras enzimas a serem estudadas podem estar envolvidas no processo de descoloração.

Ultrafiltração de lipases de *Beauveria bassiana* produzidos em cultivo submerso

Vanessa H. Sugahara¹; Polyana M. Melo²; Geni Varéa-Pereira³

¹Aluna do Mestrado Biotecnologia

²Aluna de graduação em Farmácia e Bolsista iniciação científica (PIBIC)

³Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

As lipases ou glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) são enzimas ativas na interface óleo/água. Podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana e apresentam diferentes aplicações industriais como: aditivos na indústria de detergentes, no processamento de óleos e gorduras, e na remoção de triacilgliceróis e ceras indesejáveis na indústria de papel e celulose. Mais recentemente, as lipases têm merecido atenção como agente catalítico da produção de combustíveis alternativos como os derivados metil ésteres de ácidos graxos, ou biodiesel. Devido aos maiores rendimentos de lipases serem obtidos de fontes microbianas avaliou-se a produção de lipases pelo fungo *Beauveria bassiana* CG 432. Foi realizado um macrocultivo em quatro repetições em frascos erlenmeyer com capacidade de 1000mL contendo 100mL do meio de Vogel adicionado de 3% de óleo de oliva, 0,1% de CaCl₂ e 0,1% de Triton X-100. Os meios de cultivo foram inoculados com 1% de uma suspensão contendo 10⁸/mL conídios fúngicos, incubados em agitador orbital, a 28°C, 200 rpm, durante cinco dias e interrompidos por filtração a vácuo e centrifugação a 8.500g por 15 minutos a 4°C. Os filtrados (extratos brutos) foram dialisados exaustivamente em papel celofane contra tampão fosfato 5mM, pH 7, a 4°C, concentrados por ultrafiltração em membrana de exclusão molecular de 100 KDa, até obtenção de cerca de 10mL do extrato denominado C₁₀₀. A atividade lipolítica foi realizada sobre substrato palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) solubilizado em isopropanol e emulsificado em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 8,5 contendo surfactante Triton X-100. Alíquotas de 0,1 mL extrato bruto e C₁₀₀, adequadamente diluídas, foram incubadas com 0,9 mL de substrato emulsificado a 50°C durante 1 minuto. Uma unidade de atividade de lipases (UL) foi definida como µg de *p*-nitrofenol, determinado por espectrofotometria a 410nm, liberados pela ação da enzima por mL de extrato, por minuto de reação. Os resultados demonstraram que na condição de cultivo utilizada o fungo *B. bassiana* produziu média de 452,86UL±20,76 com ótima reprodutibilidade. A técnica de ultrafiltração mostrou-se adequada, pois concentrou cerca de 10 vezes±1,98 a atividade de lipases presentes inicialmente nos extratos brutos.

Apoio financeiro: CNPq, Fundação Araucária e PROPPG/UEL