

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

AS DIVERSAS MANIFESTAÇÕES

DA VIDA

VOLUME IX



Frederico Celestino Barbosa

Ciências biológicas: as diversas manifestações da vida

9ª ed.

Piracanjuba-GO
Editora Conhecimento Livre
Piracanjuba-GO

9ª ed.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Barbosa, Frederico Celestino
B238C Ciências biológicas: as diversas manifestações da vida
/ Frederico Celestino Barbosa. – Piracanjuba-GO

Editora Conhecimento Livre, 2023

61 f.: il

DOI: 10.37423/2023.edcl732

ISBN: 978-65-5367-333-5

Modo de acesso: World Wide Web

Incluir Bibliografia

1. flora 2. fauna 3. organismos-vivos I. Barbosa, Frederico Celestino II. Título

CDU: 570

<https://doi.org/10.37423/2023.edcl732>

O conteúdo dos artigos e sua correção ortográfica são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

EDITORIA CONHECIMENTO LIVRE

Corpo Editorial

MSc Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior

MSc Humberto Costa

MSc Thays Merçon

MSc Adalberto Zorzo

MSc Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno

PHD Willian Douglas Guilherme

MSc Andrea Carla Agnes e Silva Pinto

MSc Walmir Fernandes Pereira

MSc Edisio Alves de Aguiar Junior

MSc Rodrigo Sanchotene Silva

MSc Wesley Pacheco Calixto

MSc Adriano Pereira da Silva

MSc Frederico Celestino Barbosa

MSc Guilherme Fernando Ribeiro

MSc. Plínio Ferreira Pires

MSc Fabricio Vieira Cavalcante

PHD Marcus Fernando da Silva Praxedes

MSc Simone Buchignani Maigret

Dr. Adilson Tadeu Basquerote

Dra. Thays Zigante Furlan

MSc Camila Concato

PHD Miguel Adriano Inácio

MSc Anelisa Mota Gregoleti

PHD Jesus Rodrigues Lemos

MSc Gabriela Cristina Borborema Bozzo

MSc Karine Moreira Gomes Sales

Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares

MSc Pedro Panhoca da Silva

MSc Helton Rangel Coutinho Junior

MSc Carlos Augusto Zilli

MSc Euvaldo de Sousa Costa Junior

Dra. Suely Lopes de Azevedo

MSc Francisco Odecio Sales

MSc Ezequiel Martins Ferreira

MSc Eliane Avelina de Azevedo Sampaio

CAPÍTULO 1	5
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DA CARNE DE FRANGO COMERCIALIZADA A GRANEL NO VAREJO DE SUPERMERCADOS	
Gabriela Haack Márcia Alves de Medeiros Gorodicht César José Finger Liris Kindlein DOI 10.37423/230507724	
CAPÍTULO 2	16
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO TECNOLÓGICO DE BACTOFUGAÇÃO NA ELIMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS DETERIORANTES E INDICADORES NO LEITE	
Daniela Andreolli Márcia Alves de Medeiros Gorodicht César José Finger Liris Kindlein DOI 10.37423/230507728	
CAPÍTULO 3	29
POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO ENTRE CRISE RENAL ESCLERODÉRMICA E MIELOMA MÚLTIPLO	
Paulo Brandão Sakr Khouri Mayara Figueiredo Mateus Figueiredo Marcos Brandão Sakr Khouri Daniel Brandão Sakr Youssef Khouri Tamirh Brandão Sakr Khouri Sakr Youssef Khouri Neto DOI 10.37423/230507776	
CAPÍTULO 4	36
ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA PRODUZIDA EM MEIO ALTERNATIVO À BASE DE TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM)	
Yasmim de Farias Cavalcanti Alexandre D'Lamare Maia de Medeiros Cláudio José Galdino da Silva Junior Italo José Batista Durval Julia Didier Pedrosa de Amorim Andréa Fernanda de Santana Costa Leonie Asfora Sarubbo DOI 10.37423/230507789	

CAPÍTULO 5 43

DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND PHYTATE IN TRANSGENIC SOYBEAN EXPOSED TO GLYPHOSATE

André Luiz de Souza Lacerda

DOI 10.37423/230507792

CAPÍTULO 6 55

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DA ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE CONYZA SP.

Carlos Alexandre Marochio

Maycon Rodrigo Ruiz Bevilaqua

Rubem Silverio de Oliveira Junior

Maria de Fatima Pires da Silva Machado

Marie Jasieniuk

DOI 10.37423/230607837

Capítulo 1



10.37423/230507724

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DA CARNE DE FRANGO COMERCIALIZADA A GRANEL NO VAREJO DE SUPERMERCADOS

Gabriela Haack

Centro Universitário Ritter (UniRitter)

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht

*PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS / Universidade Federal do
Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter)*

César José Finger

Liris Kindlein

*Faculdade de Veterinária - FAVET -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS*



INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da avicultura de corte representa uma das mais importantes da agroindústria brasileira, sendo atualmente o segundo maior produtor de carne de frango do mundo. Com empresas de pequeno, médio e grande portes, a avicultura brasileira exporta produtos para mais de 151 países, e tem em sua base produtora mais de 100 mil famílias integradas (ABPA,2022).

O consumo mundial de carne de frango vem mostrando crescimento nas últimas décadas, sendo a primeira carne mais consumida no mundo atingindo um consumo per capita 45,2 kg no ano de 2022 (ABPA,2022). Com isso, o consumidor consciente procura em supermercados e hipermercados produtos de qualidade nutricional e sanitária sejam resfriados, frescos ou congelados.

De acordo com a Portaria nº 763/2021 do Estado do Rio Grande do Sul, açougues são estabelecimentos da rede varejista de carne, que realizam armazenamento, desossa, fracionamento e venda de carnes e miúdos de animais no próprio estabelecimento, não sendo permitida qualquer atividade industrial e abate de animais. Tendo estabelecimentos que apenas realizam o recebimento e armazenamento destas carnes e derivados embalados, sem nenhuma atividade de manipulação associada.

No entanto, de acordo com Portaria Nº 656/2022 a qual Altera a Portaria SES nº 763/2021 é permitido a comercialização de carnes de aves e derivados a granel, a pedido do consumidor, devendo ser mantida a apresentação da indústria e o armazenamento em sua embalagem original. Os produtos a qual nas embalagens houver um prazo de validade inferior para o produto após a abertura da embalagem original, o prazo deverá ser respeitado, devendo ser mantido o registro da data de abertura da embalagem. A exigência de barreira física de separação das carnes de aves de outros tipos de carne, devem ser respeitados, com exceção de quando o balcão expositor ou estabelecimento for exclusivo para estes produtos.

A carne de frango, por possuir uma elevada quantidade de água e composição rica em nutrientes, torna-se suscetível a deterioração por agentes microbianos. É um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano, podendo assim ser relacionado à disseminação de microrganismos patogênicos. Conforme o microrganismo observado no alimento, será possível

verificar as condições sanitárias que a carne foi produzida e manipulada, e identificar se houve uso inadequado durante a produção, processamento ou armazenamento (AGUIAR, 2017).

Com a mudança da referida Portaria, que alterou a redação da Portaria SES 736/2021, começou uma pressão dos donos da rede de supermercado para comercialização do produto a granel e acerca do tema existe alguns questionamentos sobre a manutenção das características organolépticas e controle sanitário do frango a granel, quando mantido à disposição nos supermercados. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar a características sensoriais da carne de frango comercializada resfriada e a granel, de acordo com normativa vigente.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido em açougue de um supermercado de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo foi desenvolvido em colaboração com funcionários e o Médico Veterinário RT responsável.

As amostras de frango utilizadas foram provenientes de uma marca comercial, já embaladas e devidamente inspecionadas. Para este estudo foi utilizado dez bandejas de frango acondicionados em bandejas de média barreira com filme atóxico contendo três peitos de frango cada uma sem pele e sem osso. O peso líquido das embalagens fechadas foi em média de 720g, com data de fabricação dentro do prazo de validade. O método de conservação utilizado foi o mesmo utilizado pelo fabricante (0 a +4 OC) e respeitando as normas exigentes.

Figura 1 - Bandeja de peito sem osso e pele de frango Dia “0”



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Figura 2- Pesagem da bandeja de frango Dia “0”



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Figura 3 - Verificação de temperatura Dia “0”



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

As análises sensoriais visuais (organolépticas) foram realizadas nas amostras durante três dias: “Dia 0”, “Dia 1” e “Dia 2” As análises foram realizadas de acordo com a percepção de aceitação do produto,

por quatro diferentes avaliadores treinados e sob as mesmas condições de luz e temperatura. Os mesmos avaliadores foram mantidos durante todo o estudo experimental. As amostras foram avaliadas primeiramente dentro de suas embalagens fechadas e, posteriormente, após a abertura.

Figura 4 - Abertura da bandeja de frango “Dia 0”



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Figura 5 - Aspecto do peito de frango sem pele e sem osso no “Dia 0”

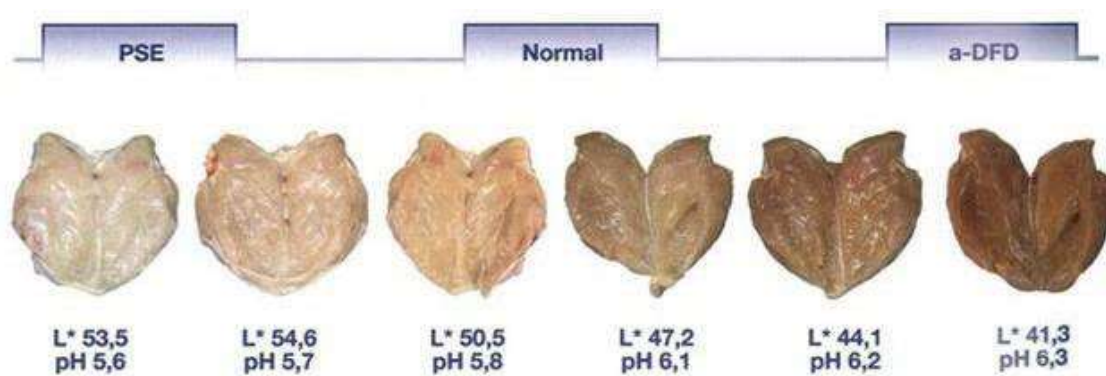


Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Foram realizadas as seguintes análises sensoriais: aspecto macroscópico dos cortes em termos visuais analisando a aparência geral, cor, brilho, odor e exsudato.

A cor 1 foi analisada por meio da avaliação visual de cor da carne, utilizando a escala hedônica estruturada descrita por Oliveira et al. (2019), figura 6 e a cor 2 foi baseado nas orientações de Peryam & Pilgrim (1957): **1**-Desgostei muitíssimo; **2**-Desgostei muito; **3**-Desgostei; **4**-Nem gostei, nem desgostei; **5**- Gostei; **6**-Gostei muito; **7**-Gostei muitíssimo.

Figura 6 - Escala de classificação das cores dos cortes de carne de frango (Cor 1)



Fonte: Oliveira et al. (2019). Adaptada pela autora.

Padrões de cor 1 e 2 (PSE) - carne branco-cinza pálida, bastante flácida e extremamente exsudativa.

Padrões de cor 3 e 4 (NORMAL) - carne branco-rosada, firme e não exsudativa.

Padrões de cor 5 e 6 (DFD) - carne marrom-escura, firme e seca (não exsudativa)

Cada amostra foi submetida ao teste visual de aparência geral ainda dentro da embalagem fechada e aberta através do uso da escala hedônica de 7 pontos. Além disso, foi solicitado a cada avaliador que eles ordenassem as embalagens com o produto de pior aparência até a melhor aparência conforme descrito abaixo:

Aparência: Escala hedônica estruturada de 7 pontos (Peryam & Pilgrim, 2012)

- 1 – Desgostei muitíssimo
- 2 – Desgostei muito
- 3 – Desgostei
- 4 – Nem gostei, nem desgostei
- 5 – Gostei
- 6 – Gostei muito
- 7 – Gostei muitíssimo

Para avaliação do brilho foi levado em conta a presença de pouco até muita presença (Figura7), utilizando escala hedônica descrita por Oliveira et al. (2019).

Figura 7 - Brilho: Escala hedônica estruturada de 7 pontos

	1	2	3	4	5	6	7	
Pouco	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	Muito

Fonte: Oliveira et al. (2019)

Para avaliar o odor, foi utilizado uma escala hedônica estruturada de 5 pontos (1- Sem presença de odor;2-Odor normal;3-Presença de odor levemente diferenciado;4-Presença de odor moderadamente diferenciado;5- Presença de odor fortemente alterado).

O último avaliador avaliava se havia a presença ou ausência de exsudato e media-se o volume deste em proveta de vidro com referência de volume, anotando em planilha específica.

O coeficiente de concordância das respostas dos quatro avaliadores do painel sensorial foi calculado por meio do coeficiente de correlação de kendall (procedimento *corrkendall*). A análise de variância foi realizada por estatística não paramétrica (*Wilcoxon*) e as diferenças quando observadas foram comparadas pelo teste de *Bonferroni*. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS[®] versão Studio e, diferenças significativas foram declaradas quando $P < 0,05$.

Figura 8 - Aspecto do frango “Dia 1”.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Figura 9 - Coloração do frango na bandeja no “Dia 3 ”



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando a distribuição das características sensoriais das 10 amostras de carne de frango no dia 0 de avaliação (Tabela 1) evidenciamos a baixa variação para quase todas as respostas. Para o critério de aparência geral da carne, 75% das amostras receberam nota 6 (Gostei muito) e 25% receberam nota 7 (Gostei muitíssimo).

Para a cor 1, 37,5% das amostras receberam nota 5 (Gostei) e 6 e 25% receberam nota 7 (Gostei muitíssimo). Na cor 2, 62,5% das amostras foram classificadas com nota 3 (Carne Normal), 12,5% com nota 1 (Carne PSE) e 25% com nota 4 (Carne normal).

Para o atributo sensorial de odor exatamente metade das amostras receberam nota 2 (Odor normal) e os 50% restante foram classificados com nota 3 (Presença de odor levemente diferenciado). E, para o brilho, 50% das amostras receberam pontuação 5, 37,5% receberam pontuação 6 e 12,5% receberam pontuação 7, indicando um bom brilho.

As propriedades sensoriais das amostras de carne foram influenciadas pelos dias de avaliação ($P < 0,05$; Tabela 2). A cada um dia da carne exposta na embalagem aberta observou-se uma redução de 0,10 pontos na aparência geral e no brilho ($P < 0,05$), de 0,09 pontos na cor 1 e no odor ($P < 0,05$), de 0,14 pontos na aparência geral da embalagem aberta ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Propriedades sensoriais de carne frango de acordo com os dias de avaliação.

Propriedades	Dias			EPM ¹	P*
	0	1	2		
Aparência geral	6,06a	4,72b	3,06c	0,14	<0,01
Cor 1	5,69a	4,72b	3,23c	0,14	<0,01
Cor 2	1,62b	2,35ab	2,50a	0,13	0,02
Odor	5,94a	3,99b	3,05c	0,16	<0,01
Brilho	5,62a	4,89b	3,02c	0,13	<0,01

¹EPM = Erro Padrão da Média; *Probabilidade pelo teste de Wilcoxon.

As notas atribuídas às propriedades sensoriais aparência geral, cor, odor e brilho foram mais baixas no segundo de avaliação em relação ao dia 0 ($P < 0,05$). No “Dia 0”, obteve-se o peso médio de 726g e a quantidade de 5,2ml de exsudato. No “Dia 1”, verificou-se que o peso médio do frango na bandeja foi de 716g, exsudato 4,8ml. No “Dia 2”, houve diminuição do peso para 712g e exsudato ficou na contagem de 4,2ml.

A decisão de compra do consumidor com um produto geralmente é com a apresentação visual, onde se destacam a cor e a aparência. Por outro lado, a maior parte das carnes produzidas no país são comercializadas resfriadas e apesar dos grandes esforços realizados pelas indústrias nas etapas de abate e em operações posteriores para garantir a segurança desse alimento, os fatores intrínsecos como composição química e seu grande conteúdo de água, constitui como substrato para grande variedade de microrganismos deteriorantes, o que a torna um alimento bastante perecível e susceptível as alterações químicas, físicas ou biológicas, o que provoca aumento no desperdício em função do curto período de vida de prateleira (Ordoñez ,2005; Bolumar et al., 2014). Desta forma, as indústria e comércio de uma maneira geral enfrentam um grande desafio pois são alimentos

altamente dependentes da temperatura de refrigeração e materiais de embalagens para garantir a qualidade das carnes durante o armazenamento e *shelf life*.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir com este estudo que a comercialização da carne de frango na modalidade a granel, permitida após a alteração da Portaria SES número 763/2021/RS, conforme metodologia utilizada, mesmo que ainda apresentando resultados parciais para uma conclusão científica, indica que as propriedades sensoriais das amostras de carne de frango expostas à granel, mantida em sua embalagem primária e refrigeradas entre 0 a +4 °C apresentam uma diminuição em suas características organolépticas gerais, o que poderá causar rejeição no consumidor e acarretar prejuízos econômicos ao comerciantes. Sugere-se também que mais estudos sejam realizados para avaliar a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos para garantir a inocuidade deste alimento ao consumidor final.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal ,2023. Relatório anual. <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal ,2022. Relatório anual. <<https://abpa.br.org/mercados/#relatorios>>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. Análise sensorial dos alimentos e bebidas: terminologia. 1993. p-8.
- ANZALDÚA-MORALES, A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza: Acribia SA, 1994. p.198.
- BOLUMAR, T., ANDERSEN, M. L., & ORLIEN, V. (2014). Mechanisms of radical formation in beef and chicken meat during high pressure processing evaluated by electron spin resonance detection and the addition of antioxidants. Food Chemistry, 150(0), 422–428.
- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.161>
- CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. Food Microbiology, v. 20 p. 561–566, 2003.
- FRANCO, B. D. G. M.; LAMDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.
- GUERREIRO-PEREIRA, M. C.; MATOS, R.A.M; C.A; RANGEL-FIGUEIREDO. Molecular markers in the Portuguese Bísaro pig: screening for breed specific microsatellites, p. 105-109, 2000.
- NESPOLO et al. Práticas em tecnologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- Ordoñez Pereda, J.A.; Rodriguez, M. I. C.; Alvarez, L. F.; Sanz, M. L. G.; Minguiñón, G. D. G. F. et al. Tecnologia de alimentos – Alimentos de origem animal , Porto Alegre: Artmed, 2v., v. 2 , 2005, 171p.
- PAULOS, K; TEIXEIRA, A. Porco Bísaro Qualidade da Carcaça e da Carne: Sistemas de Produção-Alimentar. 1º ed. Quinta do Bísaro: Braçanca. p.28. 2015.
- TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: Ed. da UFSC, 1987. 180 p.

Capítulo 2



10.37423/230507728

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO TECNOLÓGICO DE BACTOFUGAÇÃO NA ELIMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS DETERIORANTES E INDICADORES NO LEITE

Daniela Andreolli

Centro Universitário Ritter (Uniriter)

Márcia Alves de Medeiros Gorodicht

*PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS / Universidade Federal do
Rio Grande do Sul - UFRGS
Centro Universitário Ritter dos Reis (Uniritter)*

César José Finger

Liris Kindlein

*Faculdade de Veterinária - FAVET -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul -
UFRGS*



INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil representa uma importante atividade socioeconômica. Atualmente, é o terceiro maior produtor mundial de leite, com mais de 34 bilhões de litros por ano, com produção em 98% dos municípios brasileiros, tendo a predominância de pequenas e médias propriedades, empregando perto de 4 milhões de pessoas. O país conta com mais de 1 milhão de propriedades produtoras de leite e as projeções do agronegócio da Secretaria de Política Agrícola, estimam que, para 2030, irão permanecer os produtores mais eficientes, que se adaptarem à nova realidade de adoção de tecnologia, melhorias na gestão e maior eficiência técnica e econômica (BRASIL, 2023).

Diante desse cenário se faz necessário a implantação de ações públicas e privadas para produção de um alimento seguro por produtores e laticínios (SANTOS et al., 2021). A crescente exigência na melhora da qualidade higiênico-sanitária de matéria prima visa garantir a segurança do produto que é entregue a população, assim como aumentar a competitividade entre produtos lácteos de qualidade no mercado (GUTH, 2022).

Fatores como estado sanitário e manejo do rebanho, local de ordenha, armazenamento e transporte impactam na qualidade do leite cru. Estudos relatam que algumas regiões do país apresentam problemas nos parâmetros de qualidade, podendo o produto ser carreador de microrganismos patogênicos e deterioradores, adquiridos durante as etapas da cadeia de produção (ULISSES, 2022). Mediante a isso, a IN nº 76 de 26 de novembro de 2018 foi criada para regular os parâmetros higiênico-sanitários e classificação em diferentes tipos, conforme a qualidade, manipulação, armazenamento e comercialização do leite, impactando positivamente no mercado nacional e internacional (ESPINDOLA et al., 2020).

Em função das características bioquímicas e físicas e por ser um alimento rico em nutrientes, o leite é considerado um substrato ideal para a proliferação de microrganismos (TRONCO, 2008). Conforme Fonseca e Santos (2007), o leite cru deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas. A qualidade microbiológica do leite cru é um indicador higiênico-sanitário de exigência crescente e visa promover a melhora da qualidade da matéria prima e seus derivados (GUTH, 2022). Segundo Franco (2008), como forma de monitorar a segurança do processamento e fatores relacionados a possível presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes, a indústria de alimentos realiza a determinação de microrganismos indicadores de qualidade. São apontados

como indicadores de condições higiênico sanitárias coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e enterobactérias totais. Como indicadores de condições de deterioração e de condição ambiental, são observados microrganismos aeróbios mesófilos, psicotrópicos, termófilos, bolores e leveduras.

Visando a destruição da microbiota patogênica e deteriorante, o leite cru deve passar por tratamentos térmicos para originar o leite UHT ou longa vida. Na pasteurização, o produto é submetido a uma temperatura de 72 a 75°C por um período de 15 a 20 segundos e imediatamente resfriado, a no máximo 4°C, sem causar alterações em sua constituição física, equilíbrio químico, composição nutricional e características sensoriais. A qualidade do leite cru, o rigor no tratamento térmico, a contaminação pós-pasteurização e a temperatura de estocagem são fatores que afetam a qualidade do leite pasteurizado (PADILHA et al., 1999). O processo UHT, por sua vez, consiste na elevação da temperatura do leite entre 130 e 150°C, por 2 a 4 segundos, mediante fluxo contínuo, e resfriamento imediato a temperatura inferior a 32° C. O envase deve ocorrer sob condições assépticas, em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1996).

Além do processo térmico empregado no beneficiamento do leite cru para redução de microrganismos, a tecnologia da bactofugação tem sido utilizada como forma adjuvante. O processo de bactofugação ou Sistema Ultra Fresh®, como também é conhecido, consiste na centrifugação do leite em alta rotação, visando reduzir o número primário de microrganismos ativos, esporulados e células somáticas presentes no leite cru (TETRA PACK, 2004). A bactofugação deve ser realizada após o pré-aquecimento da matéria prima, em uma temperatura ideal de 55 a 60°C, antecedendo a pasteurização. Este processo mecânico acarreta na melhora da qualidade do leite UHT e prolonga sua vida útil de prateleira, assim como de seus derivados (JURAGA et al., 2021).

O processo mecânico de bactofugação é uma das tecnologias utilizadas para a remoção efetiva de bactérias, esporos e células somáticas do leite (GRAVE, 2011). Apesar da bactofugação não ser um requisito obrigatório do beneficiamento do leite por legislação, mas é um fator que agrega qualidade ao produto e estende seu tempo de vida de prateleira. Além disso, os laticínios devem ter previstas e descritas no Programas de Autocrocole (PAC) as análises microbiológicas do leite cru refrigerado, visando quantificar o número de microrganismos viáveis e determinar o nível higiênico-sanitário desde a coleta no campo, transporte e armazenamento.

Objetivou-se com este estudo verificar a eficiência do uso da técnica de bactofugação para eliminação de microrganismos aeróbios mesófilos, esporos mesófilos e *Enterobacteriaceae* no leite e identificar a

eficiência da utilização do processo de bactofugação dentro do laticínio, visto que a técnica apresenta elevado custo de implementação e manutenção dentro da empresa.

METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada durante o estágio curricular supervisionado em um laticínio localizado no Rio Grande do Sul, Brasil. Foi realizado coletas de amostras de leite cru no silo de recepção, coleta na entrada e saída da bactofuga e coleta na saída do pasteurizador. Foram feitas 15 coletas de cada local, entre o período de março a maio de 2022, seguindo o fluxograma de produção do leite UHT, da entrada no laticínio até a saída do processo de pasteurização. As coletas e análises ocorreram no período noturno, entre 22 e 6 horas, devido a rotina do laboratório de microbiologia da indústria.

Para análise microbiológica do leite cru foi realizada a contagem de microrganismos anaeróbios mesófilos e esporos mesófilos. A análise do leite cru tem como objetivo quantificar o número de microrganismos viáveis, determinando o nível higiênico-sanitário desde a coleta da matéria prima no campo, transporte e armazenamento. Para análise do leite na entrada e saída da bactofuga e saída do pasteurizador foi incluída a contagem de *Enterobacteriaceae*. Os meios de cultura e diluições utilizadas, assim como período e temperatura de incubação são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Tabela demonstrativa dos pontos coleta do leite cru para contagem de microrganismos, com descrição de diluições, meios de cultura, período e temperatura de incubação.

Local de Coleta	Contagem de Microrganismos	Diluição da amostra em água peptonada 0,1%	Meios de cultura utilizados	Período de Incubação	Temperatura de Incubação
Leite Cru no silo de recepção	Aeróbios Mesófilos	10^{-5}	PCA	48 horas	35°C
	Esporos Mesófilos	10^{-2}	PCA	48 horas	35°C
Leite na entrada e saída da bactofuga	Aeróbios Mesófilos	10^{-5}	PCA	48 horas	35°C
	Esporos Mesófilos	10^{-2}	PCA	48 horas	35°C
	<i>Enterobacteriaceae</i>	10^{-1}	Petrifilm	24 horas	35°C
Leite na saída do pasteurizador	Aeróbios Mesófilos	10^{-3}	PCA	48 horas	35°C
	Esporos Mesófilos	10^{-2}	PCA	48 horas	35°C
	<i>Enterobacteriaceae</i>	10^{-1}	Petrifilm	24 horas	35°C

Fonte: Autora, 2022.

Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, eram realizadas as diluições decimais utilizando água peptonada esterilizada 0,1%. De cada diluição, era depositado 1 mL da amostra no fundo de placas de Petri e posteriormente adicionado o meio de cultura PCA fundido. Após homogeneização e solidificação em temperatura ambiente, as placas eram incubadas. Para contagem de esporos mesófilos as amostras de leite eram submetidas ao aquecimento de 80°C por 10 minutos e posteriormente resfriadas entre 5 e 10°C. O choque térmico tem como objetivo destruir células vegetativas e esporulação de bactérias com tal capacidade (FRANK *et al.*, 1992). Após diluição, a semeadura seguia o mesmo procedimento que para a contagem de aeróbios mesófilos. Para a contagem de *Enterobacteriaceae*, por sua vez, era acrescentado 1mL da amostra diluída em uma placa de Petrifilm™.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens foram realizadas segundo técnica padrão, em um contador de colônias. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

Após realizada contagem de UFC de microrganismos foi possível obter resultados para avaliação do processo de bactofugação dentro da indústria. Os resultados mínimos, médios e máximos das populações de microrganismos aeróbios mesófilos, esporos mesófilos e *Enterobacteriaceae* foram expressos na Tabela 5, conforme o local da coleta do leite. As Figuras 1, 2 e 3 apresentam gráficos demonstrativos e comparativos das coletas realizadas antes e após a bactofugação, conforme microrganismo analisado.

A quantidade de aeróbios mesófilos variou de $2,7 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^5$ UFC/mL na entrada da bactofuga e de $1,0 \times 10^4$ e $1,2 \times 10^5$ UFC/mL na saída, observando-se uma redução média de 76%. Os aeróbios mesófilos compreendem o grupo de bactérias que possuem temperatura ótima de multiplicação entre 20 e 40°C e são responsáveis pela formação de ácido lático e outros ácidos orgânicos, através da fermentação da lactose. A refrigeração do leite permite que o desenvolvimento de mesófilos não seja favorecido (PAULO *et al.*, 2021).

A presença de esporos mesófilos, oscilou de $1,0 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^3$ UFC/mL e de $2,0 \times 10^1$ a $1,1 \times 10^3$ UFC/mL na entrada e saída do processo de bactofugação, respectivamente. Verificou-se uma redução na média de 57% de esporos mesófilos entre a entrada e saída da bactofuga. Os esporos mesófilos são microrganismos que sobrevivem ao ambiente por muito tempo, podendo ser resistentes até mesmo ao processo UHT, contribuindo para a perda de qualidade de produtos lácteos (PAULO *et al.*, 2021).

Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são considerados os mais importantes contaminantes do leite cru, tendo a presença associada a falta de higiene na produção leiteira (BARROS, 2006).

Para *Enterobacteriaceae*, por sua vez, os resultados variaram de 7,7x10² a 2,3x10⁴ UFC/mL e 2,8x10² a 6,8x10³ UFC/mL na entrada e saída da bactofuga, respectivamente, representando redução de 75% entre as médias. A família *Enterobacteriaceae* é encontrada no trato gastrointestinal de animais ou livre no ambiente e é composta por bactérias Gram negativas, aeróbias facultativas. A ação destes microrganismos está ligada à fermentação da glicose. Englobam os coliformes totais e termotolerantes, que são utilizados como indicadores de qualidade higiênico- sanitária, sendo muitos deles patogênicos à saúde humana (FERRAZ, 2009).

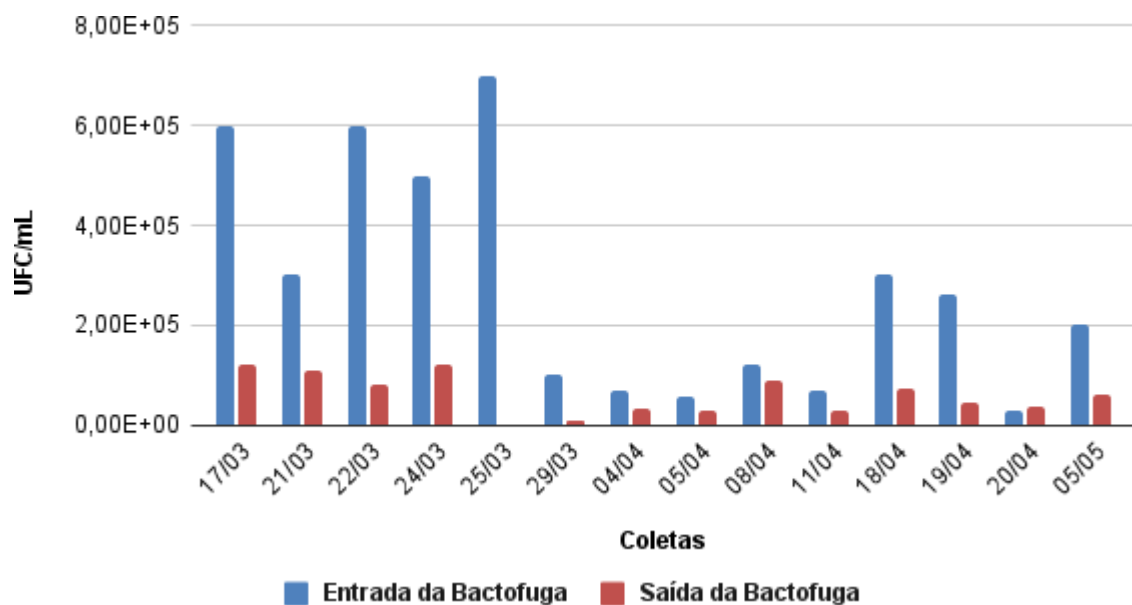
Um estudo realizado por Francisco (2019) demonstrou que o processo de bactofugação apresentou eficiência na redução de microrganismos esporulados e de interesses lácteos, diminuindo os resultados em 2 a 4 ciclos. Conforme resultados obtidos por Grave (2011), o leite UHT bactofugado apresentou melhor qualidade microbiológica em relação ao leite UHT que não foi submetido ao processo.

Tabela 2 - Resultados mínimos, máximos e médios de UFC de microrganismos aeróbios mesófilos, esporos mesófilos e *Enterobacteriaceae*, conforme ponto de coleta do leite.

Amostras	Populações de Microrganismos								
	Aeróbios Mesófilos UFC/mL			Esporos Mesófilos UFC/mL			<i>Enterobacteriaceae</i> UFC/mL		
	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo
Silo de Leite Cru	3,8x10 ⁴ ₀	4,51x10 ⁵	1,8x10 ⁶	1,0x10 ²	2,92x10 ²	6,0x10 ²	-	-	-
Entrada da Bactofuga	2,7x10 ⁴	2,66x10 ⁵	7,0x10 ⁵	1,0x10 ²	4,10X10 ²	2,0x10 ³	7,7x10 ²	6,84x10 ³	2,3x10 ⁴
Saída da Bactofuga	1,0x10 ⁴	6,44x10 ⁴	1,2x10 ⁵	2,0x10 ¹	1,78x10 ²	1,1x10 ³	2,8x10 ²	1,75x10 ³	6,8x10 ³
Saída do Pasteurizado	3,0x10 ¹	1,58x10 ³	6,9x10 ³	2,0x10 ¹	1,41x10 ²	6,3x10 ²	<1,0X10 ⁰	<1,0X10 ⁰	<1,0X10 ⁰

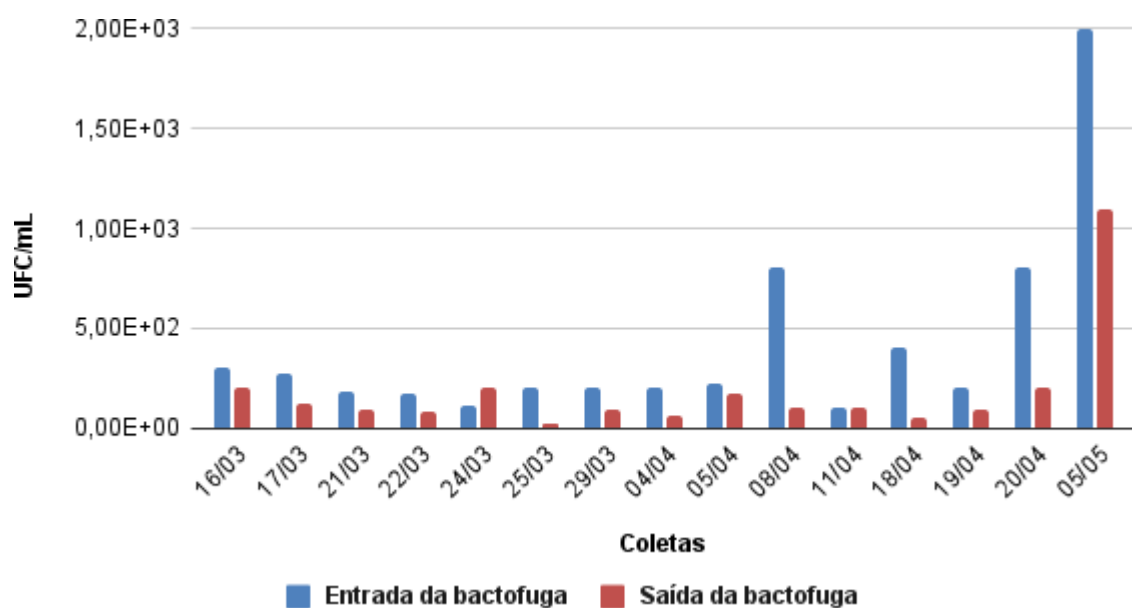
Fonte: Autora, 2022.

Figura 1 - Gráfico de avaliação de microrganismos aeróbios mesófilos na entrada e saída da bactofuga.

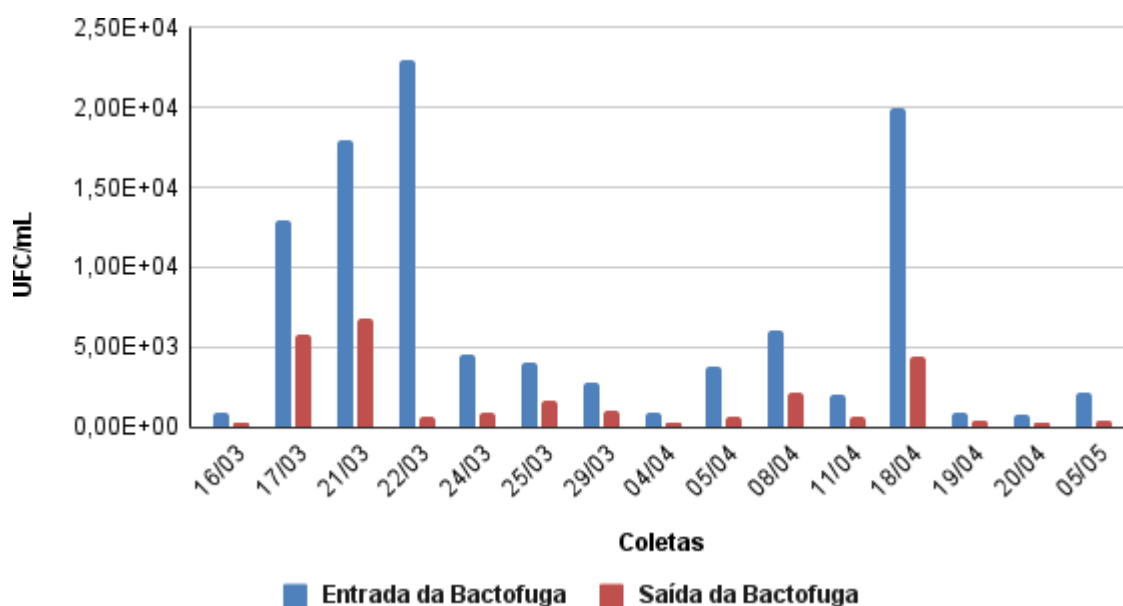


Fonte: Autora, 2022.

Figura 2 - Gráfico de avaliação de esporos mesófilos na entrada e saída da bactofuga.



Fonte: Autora, 2022.

Figura 3 - Gráfico de avaliação de *Enterobacteriaceae* na entrada e saída da bactofuga.

Fonte: Autora, 2022.

A IN nº 76 (BRASIL, 2018) estabelece que leite cru refrigerado deve apresentar limite máximo de até 900.000 UFC/mL na Contagem Padrão em Placa (CPP) antes do seu processamento no estabelecimento beneficiador. As análises realizadas também permitiram avaliar que o leite utilizado pela indústria apresenta boa qualidade microbiológica, visto que os resultados obtidos atendem a legislação.

CONCLUSÃO

O processo de bactofugação no laticínio demonstrou eficiência para a redução da quantidade de microrganismos analisados, e de forma mais expressiva, a redução de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae*. Os resultados obtidos corroboram com dados encontrados na literatura. É importante salientar que a remoção parcial de microrganismos do leite depende diretamente da qualidade da matéria prima adquirida. Conclui-se que seu emprego na indústria seja utilizado como forma de aumentar a qualidade do leite e seus derivados.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. DA S.; SILVA, J. B. A. DA. Fraude em leite:

Métodos de detecção e implicações para o consumidor. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 73, n. 3, p. 244-251, 30 set. 2015. Disponível em:

<<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33344>>. Acesso em: 20 maio 2022. Doi: <https://doi.org/10.18241/0073-98552014731611>

ARBELLO, D. D. R.; BRACCINI, V. P. JIMÉNEZ, M.; ERHARDT, M. M., & RICHARDS,

N. S. P. d. S. (2021). Análise microbiológica e físico-química do leite produzido na cidade de Santana do Livramento – Rio Grande do Sul. *Research, Society and Development*, 10(6). Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15561>

BARROS, V.R.M., PANETTA, J.C. Esporulados mesófilos e a qualidade do leite UHT. In: MESQUITA, A.J., DÜRR, J. W., COELHO, K.O. (Org.). *Perspectivas e*

Avanços da Qualidade do Leite no Brasil. 1 ed. Goiânia: Talento, 2006, v. 1, p. 261- 272.

BECCHI, C.S. Estudo do índice crioscópico do leite tipo B “in natura” produzido na bacia leiteira do Vale do Taquari, RS. 2003. 52f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BORSATO-MOYSÉS, J.; CARVALHO, I. F.; HOFFMANN, F. L. Avaliação físico- química do leite pasteurizado tipo c produzido e comercializado na região de Tangará da Serra – MT, Brasil - estudo de caso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, [S.l.], v. 64, n. 366, p. 22-27, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/71>>. Acesso em: 20 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico- Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. D.O.U., 14/12/2006 - Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 10, 30 nov. 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Estabelece os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, n. 48, p. 22. 1996.

CASTANHEIRA, A. C. G. Manual básico de controle de qualidade de leite e derivados comentado, baseado em metodologias de análises físico-químicas e microbiológicas, contidas nas instruções normativas 68/2006 e 62/2003. CAPLAB - Indústria e Comércio Ltda, 2010.

COELHO, P.S.; BRESCIA, M.V.; SIQUEIRA, A.P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.53, n.2, p.1-9, 2001.

DENOBILE, M.; Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2002.

DÜRR, J. W. Como produzir leite de qualidade. 4ª ed. Brasília: SENAR, 2012. 44 p. il.; 21 cm. (Coleção SENAR, ISSN 1676-367x, 113) ISBN 85-8849-725-5 CDu 634.1.076:631.41

ESPINDOLA, W. R.; NASCENTE, E. P.; URZÊDA, M.; TEODORO, J. V. S.; GONÇALVES, G. B.; CASTRO, R. D.; MARTINS, M. E. P.; SOUZA, W. J.

Qualidade do leite cru refrigerado produzido na microrregião de Pires do Rio, Goiás. Brasil. Research, Society and Development, 9(7), e153973958. 2020. Doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3958>

FANGMEIER, M.; HELFENSTEIN, B.; OLIVEIRA, E. C. Avaliação do teor de gordura de leite in natura por meio do método do butirômetro e do método infravermelho. Revista Destaques Acadêmicos, [S.l.], v. 7, n. 4, dez. 2015. ISSN 2176-3070. Disponível em:

<<http://www.univates.br/revistas/index.php/destaques/article/view/513>>. Acesso em: 20 maio 2022.

Ferraz, M. A. Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus spp.* na linha de produção de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais utilizando metodologias tradicional e rápida. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2009.

FILHO, J.S.S.; MELO, E.O.S.M.; SILVA, L.J.S.S.; SILVA, E.C.S.S.; SILVA, W.L.S.

Avaliação da padronização do leite e seu rendimento econômico na produção de queijo coalho. ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA. 53º Congresso Brasileiro de Química, 2013. ISBN: 978-85-85905-06-4

FIRMINO, F. C. et al. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de rio pomba, minas gerais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, [S.l.], v. 65, n. 376, p. 5-11, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em:<<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/136>>. Acesso em: 20 maio 2022.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Estratégias para controle de mastites e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole, v. 1, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020. Rome, 2016.

FRANCO, B. D. G. M, LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Ateneu; 2008.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard methods for examination of dairy products. 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.271- 286.

FRIGERI, D. M. K. et al. 2020. Variação da composição, qualidade, produção e preço do litro do leite nas estações do ano em uma propriedade leiteira no Norte do Estado do Rio Grande do Sul- Brasil. Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.7, n.13. p. 65.

FRYER, P. J.; CHRISTIAN, G. K.; LIU, W. How hygiene happens: physics and chemistry of cleaning. International Journal of Dairy Technology, 59, 76-84. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00249.x>

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo, RS: UPF, 2004. 331p.

Giménez, A.; Ares, F.; Ares, G. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches, Food Research International, Volume 49, Issue 1, 2012. Pages 311-325, ISSN 0963-9969, Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.008>>.

GONZÁLEZ, F.H.D.; NORO, G. Variações na composição do leite no subtrópico brasileiro. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; PINTO, A.T.; ZANELLA, M.B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtrópico, Passo Fundo: UPF Editora, 2011, cap.2, p.28-53. 2013

GRAVE, E. Análise da eficiência do uso da bactofugação na remoção de microrganismos em amostras de leite. Centro Universitário UNIVATES, Química Industrial. Lajeado, 2011.

GUTH, A.; VERDI, L. C.; COSTA, S. M. K.; MOHR, A. L. M.; LOPES, G. V.; Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado na região do médio alto Uruguai, Rio Grande do Sul. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.8, n.2, p. 9072-9078 feb. 2022.

JURAGA, E.; STULIĆ, V.; PAVIČIĆ, T. V.; KLJUSURIĆ, J. G; BRNČIĆ, M.; HERCEG,

Z. The Influence of High-Power Ultrasound and Bactofugation on Microbiological Quality of Milk. Food Technology and Biotechnology, October-December 2021 | Vol. 59 | No. 4 455. ISSN 1330-9862 <https://doi.org/10.17113/ftb.59.04.21.7179>.

LOURENÇO, J. C. S.; MILCZEWSKI, D. S.; SILVEIRA, T. S.; ALMEIDA, R.

Variabilidade dos componentes do leite de vacas da raça holandês em diferentes horários de ordenha. Agron Food Academy, 2021. Doi: <https://doi.org/10.53934/9786599539633-146>

MARQUES, T. M.; PIRES, P. R.; LEÃES, F. L. Avaliação da qualidade de leite cru refrigerado de produtores assistidos pela EMATER/RS no município de São Luiz Gonzaga (RS). Revista Principia, João Pessoa, n. 52, p. 117-128, nov. 2020. ISSN 2447-9187. Doi:<http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2020v1n52p117-128>.

OLIVEIRA E. N. A.; SANTOS D. C. Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 71(1): p.193-7, 2012.

PADILHA, M.R.F. & FERNANDES, Z.F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite tipo C comercializado no Recife – PE. Higiene Alimentar, v.13, n.61, p.105- 110, 1999

PAULA F, CARDOSO C, RANGEL M. Análise físico-química do leite cru refrigerado proveniente das propriedades leiteiras da região sul fluminense. Revista Eletrônica TECCEN. 2010; 3:7-17. Disponível em:

<<http://editora.universidadedevasouras.edu.br/index.php/TECCEN/article/view/257>> . Acesso em: 20 maio 2022. Doi: <https://doi.org/10.21727/teccen.v3i4.257>

PAULO, I. A.; MONTANHINI, M. T. M; RIBEIRO, L. F. Consequência da presença de bactérias psicotróficas em leite e derivados. GETEC, v.10, n.25, p.1-8/2021

PENNA, C. F. de A. M.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. O. P.;

LEITE, M. de O.; RODRIGUES, R. Determinação da densidade do leite. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Belo Horizonte – 2001.

POUPAUD, M. Compreender a cadeia de suprimento de antibióticos veterinários para abordar a resistência antimicrobiana na RDP do Laos: Funções e interações das partes interessadas envolvidas. Acta Tropica, v. 220, p. 105943, 2021. DOI: 10.1016

QUINTANILLA, P. Enrofloxacin treatment on dairy goats: Presence of antibiotic in milk and impact of residue on technological process and characteristics of mature cheese. Food Control, v. 123, p. 107762, 2021. DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107762>.

ROSA-CAMPOS, A. A., ROCHA, J. E. S. .; BORGGO, L. A.; MENDONÇA, M. A.

Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, n. 379, v.66, p.30:34, 2011.

SCHERER, T. Verificação quantitativa dos métodos qualitativos oficiais para detecção de fraude em leite. 2015. 55f. Monografia (Bacharel em Química Industrial) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado

SANTOS, F. F. *et al*,; Análise da gestão da qualidade em um laticínio: um estudo de caso. XXXIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. Salvador, BA, Brasil, 08 a 11 de outubro de 2013.

SANTOS, T. S.; PAULA, H. F.; GOULART, S. M.; CASTRO, L. M.; SANTOS, J. P. V. (2021). Avaliação dos limites de detecção dos testes qualitativos oficiais de redutores de acidez em leite. Tecnia, 6(1), 34-49

SILVA H. O.; AGUILAR C. E. G.; ROSSI G. A. M.; VIDAL A. M. C. Análise do teste de alizarol do leite de um laticínio do município de São Luis de Montes Belos, estado de Goiás, Brasil. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 14, n. 3, p. 95-95, 21 dez. 2016.

SILVA, P. H. F.; Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação. 1a Ed. Juiz de Fora (Brasil): 2004

SIVIERO, E. S.; OLIVEIRA, M. L. C.; CAVALIERI, F. L. B.; EMANUELLI, I. P.; Detecção de resíduos de antibióticos em produtos lácteos. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.18 n.37; p. 156. 2021.

STRÖHER, J. A.; NUNES, M. R. dos S. .; SANTOS JUNIOR, L. C. O.

Physicochemical evaluation during shelf life of UHT milk produced and marketed in Rio Grande do Sul State. Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e19910313193, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.13193. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13193>. Acesso em: 20 may. 2022. TETRA PAK. Manual Operacional da Centrífuga Ultra Fresh. 2004.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4. ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

ULISSES, A. de F.; PÍCCOLO, M. da P. .; RANGEL, O. J. P. .; SANTOS JÚNIOR, A.

C. .; MAIA JÚNIOR, J. de A. . Refrigerated raw milk: microbiological, physical- chemical quality and detection of antibiotic residues. Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e48111123708, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.23708. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23708>. Acesso em: 23 Maio 2022.

VIDAL-MARTINS, A.M. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.25, n.4, p.698-704, 2005 3M©. Manual de Monitoramento Ambiental para as indústrias de alimentos e bebidas. 1ª edição, 2019.

Capítulo 3



10.37423/230507776

POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO ENTRE CRISE RENAL ESCLERODÉRMICA E MIELOMA MÚLTIPLO

Paulo Brandão Sakr Khouri

Universidade Católica de Brasília

Mayara Figueiredo

Universidade Anhanguera - Uniderp

Mateus Figueiredo

Faculdade Presidente Antônio Carlos

Marcos Brandão Sakr Khouri

Universidade Católica de Brasília

Daniel Brandão Sakr Youssef Khouri

Universidade Católica de Brasília

Tamirh Brandão Sakr Khouri

Centro Universitário Antônio Carlos

Sakr Youssef Khouri Neto

Universidade de Brasília



Resumo do caso: Paciente, 53 anos, com diagnóstico há 6 meses de Mieloma Múltiplo e suspeita diagnóstica de Esclerose Sistêmica. Realizava há 4 meses tratamento medicamentoso com glicocorticóides para artralgia, provavelmente secundária a Esclerose Sistêmica. Foi admitido em Unidade de Pronto Atendimento em crise hipertensiva e com piora importante da função renal, sugerindo-se Crise Renal Esclerodérmica, a qual apresentou necessidade de diálise e outras complicações devido ao descontrole pressórico.

INTRODUÇÃO

A crise renal esclerodérmica é definida como insuficiência renal rapidamente progressiva acompanhada ou não de hipertensão maligna de início recente durante o curso da Esclerose Sistêmica, ocorrendo em 15 a 20% dos pacientes com a forma cutânea difusa da doença, sobretudo nos primeiros cinco anos do diagnóstico^{1,2}. A CRE é uma complicação incomum, mas entre 20 e 30% dos pacientes não recuperam a função renal.^{3,4,5} Além disso, a Esclerose Sistêmica pode ocorrer em superposição a outras doenças reumáticas tais como Artrite Reumatoide, Síndrome de Sjögren e Lúpus Eritematoso Sistêmico⁶. Além disso, associa-se a tumores sólidos como pulmão, mama e reto, porém poucos casos relatados na literatura correlacionaram-se à coexistência com Mieloma Múltiplo. Apresentamos, portanto, um relato de caso de paciente, 53 anos, previamente acometido de Mieloma Múltiplo e que evoluiu 6 meses após esse diagnóstico com crise renal esclerodérmica.

RELATO DO CASO

Paciente do sexo masculino, 53 anos, em acompanhamento ambulatorial de Hematologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) devido a Mieloma Múltiplo, diagnosticado em Junho de 2021 na forma assintomática da doença. Iniciou dois meses após o diagnóstico de Mieloma, quadro de espessamento cutâneo difuso, mais proeminente em região das mãos, braços, pernas e pés, estendendo-se proximalmente às metacarpofalangianas, associado mancha hipocrômica em sal e pimenta presentes em região dorsal de braço, antebraço, tronco e coxas, além de artralgia difusa de moderada intensidade. Negava telangiectasias ou Fenômeno de Raynaud. Foi aventada a hipótese em consulta ambulatorial com reumatologista particular de Esclerose Sistêmica e solicitada, na ocasião, o fator anti nucleotídeo (FAN), reagente 1/160, padrão nucleolar pontilhado, além dos anticorpos anti CCP, anti DNA, anti RO, anti LA, anti SM e anti Centrômero, todos não reagentes. Sorologias virais com anti HCV, HBsAg, Anti HBs, Anti HIV também estavam não reagentes. Iniciado tratamento para as queixas de artralgia Metotrexato na dose de 15mg/dia, associado a Ácido Fólico 5mg/dia e Prednisona 15mg/dia. Paciente evoluiu com melhora dos sintomas articulares, porém sem resposta clínica para as queixas dermatológicas. Após 4 meses com esse esquema terapêutico, o paciente foi admitido no Centro de Pronto Atendimento (CPA) do HUB com quadro de Insuficiência Renal Aguda e Hipertensão Arterial Sistêmica. Na avaliação inicial, o paciente queixava-se de cefaléia em região nuchal, náuseas e vômitos, redução da acuidade visual bilateralmente e diminuição da diurese. Ao exame físico apresentava pressão arterial de 190x130 mmHg, demais sinais vitais estáveis; exame dos aparelhos cardíaco, respiratório e abdominal sem alterações; presença alterações dermatológicas conforme descrito

acima, porém com piora progressiva, mais proeminentemente, da esclerodactilia. Nos exames laboratoriais, a função renal admissional apresentava Ureia de 163, Creatinina de 7.0, valor basal em outubro de 2015 de 0.8, sem distúrbios hidroeletrólíticos e hemograma sem alterações. Iniciou-se o tratamento com Captopril por via oral na dose de 200mg/dia e, em conjunto com a Nefrologia, 3 dias após a admissão, iniciou-se sessões de hemodiálise em razão de piora das escórias nitrogenadas e anúria. O paciente não apresentou melhora dos níveis pressóricos com a monoterapia com Captopril, mesmo com aumentos progressivos de dose. Houve necessidade de associação de outros anti-hipertensivos para se atingir a normotensão, o que aconteceu após 9 dias da admissão, momento em que utilizava Captopril em dose máxima, 450 mg/dia, associado a Hidralazina 150mg/dia e Anlodipino 10mg/dia. Para as queixas visuais foi realizada fundoscopia cujos achados revelavam exsudatos algodonosos e edema macular bilateral, com programação para infiltração de prednisolona intra vítrea e posterior fotocoagulação com laser argônio em ambos os olhos, em conjunto com a Oftalmologia do HUB. Realizou ainda ultrassonografia renal, que revelou aumento difuso da ecogenicidade da camada cortical renal bilateral, inferindo-se nefropatia parenquimatosa. Manteve-se internado em leito de enfermaria da Nefrologia em sessões de hemodiálise com programação de realizar biópsia renal. Seria submetido a quimioterapia por Ciclofosfamida em conjunto com o serviço de Reumatologia após a biópsia renal, porém no dia 15/01/22 paciente veio a óbito devido a choque séptico de foco pulmonar.

DISCUSSÃO DO CASO

A associação de Mieloma Múltiplo e Esclerose Sistêmica (ES) é rara, Gupta R et al. ⁷ cita 13 casos relatados na literatura médica. Quando observamos o percentual de casos de ES que evoluem para Crise Renal Esclerodérmica, cerca de 10% dos casos presentes na forma cutânea difusa da doença, que é de aproximadamente 15 a 20% dos casos totais de ES, essa associação fica ainda mais rara de ser observada na prática diária. O paciente em questão apresentava portanto ambos os critérios diagnósticos atendidos, tanto para Mieloma Múltiplo, quanto para Crise Renal Esclerodérmica.

Dentre os critérios diagnósticos de Mieloma Múltiplo, o paciente apresentava hipercalcemia de 13.9 g/dl, 2.9g/dl acima do valor de referência e insuficiência renal aguda com necessidade dialítica por uremia e anúria, ausentes no momento do diagnóstico, mas presentes durante a evolução clínica na internação no Centro de Pronto Atendimento (CPA) do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Na investigação laboratorial, havia presença de pico monoclonal de proteínas Gama de 3.0g/dl em eletroforese de proteínas, além de presença de proteínas monoclonais IgG/Lambda em imunofixação

sérica e presença de proteínas de cadeias leve lambda em imunofixação de proteínas urinárias. Por fim, Free Light Chain apresentava resultados de pico de proteínas kappa de 26,8, Lambda 52,2 e relação kappa/lambda de 0,513. Ao Mielograma havia presença de 10,8 % de plasmócitos. Portanto, não há dúvidas de que havia o diagnóstico de mieloma múltiplo, por mais que no momento do diagnóstico não houvesse as apresentações típicas da doença tais como hipercalcemia, anemia e insuficiência renal aguda, as quais vieram a surgir durante a internação por crise renal esclerodérmica. Não havia documentação de presença de lesões osteolíticas. No quesito da insuficiência renal, temos dois possíveis diagnósticos que poderiam explicá-la, o Mieloma Múltiplo e também a Crise Renal Esclerodérmica (CRE).

No que diz respeito aos critérios diagnósticos de Esclerose Sistêmica (ES), o paciente apresentava alterações cutâneas compatíveis com os achados clínicos da doença, além de queixas articulares. A epidemiologia também é favorável para ES, adulto de meia idade, entre 30 e 50 anos. Os exames laboratoriais corroboram com essa hipótese, em que o Fator Anti Nucleotídeo (FAN) reagente em 1/160 com padrão nucleolar pontilhado fino possa sugerir a presença da ES, sobretudo se houvesse o refinamento com positividade para anti RNA Polimerase I, que ao nosso ver, falaria ainda mais a favor da associação com a possibilidade da CRE, no entanto esse exame não foi realizado durante a internação até a data do óbito. Os demais exames laboratoriais com os anticorpos não reagentes e as sorologias virais negativas corroboram para afastar possíveis causas secundárias para as alterações clínicas presentes no caso.

O tratamento instituído para as queixas articulares apresentou resposta clínica satisfatória para o paciente. No entanto, contando que o padrão de FAN nucleolar pontilhado fino avança a possibilidade da presença do auto anticorpo anti Polimerase I, que por sua vez aumenta a chance da associação da ES com CRE, poderia-se ter evitado o uso prolongado da corticoterapia com prednisona, em que doses acima de 15mg por dia podem ser causa para CRE. Ao nosso ver, essa foi a principal hipótese etiológica para evolução da CRE. Quanto ao tratamento da CRE, evidencia-se que os inibidores da conversão da angiotensina II de ação rápida, como o captopril, são a primeira linha de tratamento para a hipertensão arterial sistêmica característica desse quadro clínico. Em relatos de casos anteriores, a exemplo do Jaeger et. al², a normotensão foi atingida com três dias de tratamento na dose usual de captopril, 200mg/dia, porém neste presente estudo, isso somente ocorreu no nono dia de tratamento e com a dose máxima dessa medicação e em associação a outros anti-hipertensivos, o que evidenciou prognóstico desfavorável da CRE neste caso em específico. O descontrole pressórico, ainda, é a

principal razão para as alterações presentes na fundoscopia, as quais sugerem lesões isquêmicas crônicas. A programação da Ciclofosfamida estaria respaldada na literatura médica, porém a infusão não foi possível devido ao óbito por choque séptico de foco pulmonar, possível em pacientes internados em ambiente hospitalar.

CONCLUSÃO

Apresentamos um relato de caso em que houve a concomitância entre os diagnósticos de Mieloma Múltiplo e Crise Renal Esclerodérmica, associação infrequente na prática clínica. Essa raridade pode ter contribuído para evolução clínica desfavorável do quadro.

REFERÊNCIAS

1. Appenzeller S, Sampaio-Barros PD, Samara AM, Marques Neto JF. Crise Renal como Manifestação Inicial de Esclerose Sistêmica Sine Scleroderma. *Rev Bras Reumatol*. 2004;44:87–9
2. Jaeger VK, Wirz EG, Allanore Y, Rossbach P, Riemekasten G, Hachulla E, et al. Incidences and Risk Factors of Organ Manifestations in the Early Course of Systemic Sclerosis: A Longitudinal EUSTAR Study. *PLoS One*. 2016;11:e0163894
3. Guillevin L, Bézéné A, Seror R, Teixeira L, Pourrat J, Mahr A, et al. Scleroderma renal crisis: a retrospective multicentre study on 91 patients and 427 controls. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:460-7.
4. Steen VD, Medsger TA Jr. Long-term outcomes of scleroderma renal crisis. *Ann Intern Med* 2000;133:600-3.
5. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, Bunn CC, Stratton RJ, Black CM, et al. Scleroderma renal crisis: patient
6. Stables GI, Taylor PC, Highet AS. Scleroderma associated with paraproteinaemia treated by extracorporeal photopheresis. *Br J Dermatol* 2000;142:781–3.
7. Gajendra S, et al. *BMJ Case Rep* 2013. doi:10.1136/bcr-2013-200639

Capítulo 4



10.37423/230507789

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA PRODUZIDA EM MEIO ALTERNATIVO À BASE DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)

Yasmim de Farias Cavalcanti

Escola Icam Tech, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Alexandre D'Lamare Maia de Medeiros

Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI)

Cláudio José Galdino da Silva Junior

Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI)

Italo José Batista Durval

Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI)

Julia Didier Pedrosa de Amorim

Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI)

Andréa Fernanda de Santana Costa

*Centro de Design Comunicação, Centro Acadêmico da Região Agreste, Universidade Federal de Pernambuco
Escola Icam Tech, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)*

Leonie Asfora Sarubbo



Resumo: A celulose bacteriana (CB) é um polímero sintetizado de forma pura por microrganismos. Tem alta resistência à tração e rede nanofibrilar tridimensional. Também, é biodegradável e renovável, em detrimento disso, tem uma vasta abrangência em domínios tecnológicos, como embalagens, membranas de filtro, cosméticos, têxteis, medicina e outros. No que tange a questões econômicas, o uso de resíduos agroindustriais como fonte alternativa de carbono e nitrogênio seria um bom ponto de vista, pois também pode melhorar o rendimento da produção da celulose e reduzir a poluição ambiental, diminuindo o descarte de resíduos industriais. Nesse projeto, os meios de produção utilizados foram o Hestrin-Schramm (HS), e, meios alternativos à base de tomate (T). Os experimentos foram realizados a 30 °C durante 14 dias, em quadruplicata. O rendimento e a Capacidade de Retenção de Água (CRA) das membranas foram calculados. Este estudo visa diferentes formas de produção da celulose microbiana com resíduos alternativos para a obtenção de um material biotecnológico econômico com aplicações em variados segmentos da indústria.

Palavras-chave: Biocelulose; Nanocelulose; Tomate.

INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero natural produzido em sua maioria por plantas. No entanto, com o crescimento da produção dos seus derivados, tem aumentado o consumo de madeira como matéria-prima, causando problemas ambientais mundialmente, levando a busca por novas práticas de produção (SILVA et al. 2021). Esse biopolímero pode ser produzido também por diferentes microrganismos sozinhos ou em conjunto com outros. Dentre os vários tipos de bactérias que podem ser utilizadas como produtores, se destacam as pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas* e *Sarcina* (SILVA et al., 2021).

A celulose bacteriana (CB) é considerada de alta pureza por não possuir componentes como a lignina e a hemicelulose. Devido à sua rede nanofibrilar tridimensional (3D), apresenta alta resistência à tração e cerca de 99% de capacidade de absorção de água. A biocelulose também é biodegradável e renovável, resultando em uma ampla possibilidade de aplicações em vários domínios tecnológicos, tais como embalagens, membranas filtrantes, cosméticos, têxteis e na medicina (AMORIM et al., 2020). No entanto, a possibilidade de industrialização e comercialização em larga escala continua sendo um desafio, devido ao processo de fermentação possuir alto custo (HUSSAIN et al., 2019).

O meio de cultura padrão estabelecido para produção e manutenção do polímero é o Hestrin-Schramm (HS) (1954). Pesquisas vêm se concentrando em tentar produzir a CB de uma forma menos onerosa, utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio provenientes de resíduos agroindustriais. Assim, a CB produzida nestes meios modificados resulta em um produto de alto valor agregado (COSTA et al., 2018).

A produção de CB a partir de subprodutos agrícolas e industriais, incluindo resíduos alimentares (Nascimento et al., 2022), de frutas (AMORIM et al., 2019) e do milho (GALDINO et al., 2020), foram demonstradas. Com isso, além de melhorar o rendimento da produção, também é reduzida a poluição ambiental associada ao descarte de tais resíduos (COSTA et al., 2017).

Neste trabalho, a CB foi produzida em meio HS, e em meio alternativo à base de tomate *in natura*. Junto com o processo produtivo, foram avaliados os rendimentos e a capacidade de retenção de água das membranas produzidas. Ao final deste estudo, pretende-se mostrar o descobrimento de formas alternativas de produção de celulose microbiana com resíduos industriais, visando a obtenção novos

materiais biotecnológicos com diferentes propriedades a serem aplicadas em diversos segmentos da indústria.

METODOLOGIA

MICROORGANISMO PRODUTOR DE CB, MEIOS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

Foi utilizada a bactéria *Komagataeibacter hansenii* UCP1619, da Universidade Católica de Pernambuco. Mantida em meio HS (20,00 g/L de glicose, 5,00 g/L peptona, 5,00 g/L extrato de levedura, 1,15 g/L de ácido cítrico e 2,70 g/L de fosfato de dissódio, pH 6) sob refrigeração a 4°C (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

Os pré-inóculos foram preparados a partir do crescimento dos microrganismos a 30 °C durante 48 h. O inóculo da *K. hansenii* foi preparado através da transferência de 3% pré-inóculo em meio HS aos meios de produção líquidos. Os meios alternativos foram realizados pelo suco de tomate (*Solanum lycopersicum*) na concentração de 2 tomates maduros e 50mL de água. A produção das membranas foi feita estaticamente a 30°C durante 14 dias. Todos os experimentos foram feitos em quadruplicata. As membranas foram pesadas, e os rendimentos de produção por volume de meio de cultura (g/L) em peso seco e úmido foram determinados.

Para a determinação da Capacidade de Retenção de Água (CRA), as membranas de CB úmidas foram pesadas e secas em estufa de fluxo de ar, a 40°C, até a liberação total da água retida e obtenção de peso constante. A CRA (%) foi então determinada por meio da equação: $CRA\% = \left(\frac{\text{Massa CB hidratada} - \text{Massa CB seca}}{\text{Massa CB hidratada}} \right) \times 100\%$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 descreve o meio alternativo de tomate (T) e os meios suplementados com glicose (TG) e a da milhocina (TM) e o baseado partir do meio Hestrin-Schramm (HS) padrão (THS), utilizados para a obtenção das membranas de celulose.

Tabela 1. Meios de produção e seus componentes

Componentes	Meios de Cultura				
	T	TG	THS	TM	HS
Tomate (L)	0,10	0,10	0,10	0,10	-
Milhocina (g)	-	-	-	0,75	-
Glicose (g)	-	6,00	6,00	-	6,00
Peptona (g)	-	-	1,50	-	1,50
Extrato de levedura (g)	-	-	1,50	-	1,50
Fosfato dissodico (g)	-	-	0,80	-	0,80
Ácido cítrico (g)	-	-	0,30	-	0,30
Capacidade de retenção de água (%)	96,56	95,98	94,07	96,31	98,68
Rendimento médio (g/L)	2,42 ± 0,08	5,20 ± 0,20	5,07 ± 0,30	2,71 ± 0,10	2,80 ± 0,10

As membranas produzidas a partir do meio de tomate apresentaram rendimentos de massa seca próximos ao HS padrão. No caso do meio de tomate (T) sem suplementação, apresentou 0,08 g/L, o meio com a suplementação da milhocina (TM) teve um rendimento igual de 0,10 g/L e os meios com a adição de glicose (TG) e o meio baseado no HS (THS) tiveram rendimentos superiores com 0,20 g/L e 0,30 g/L.

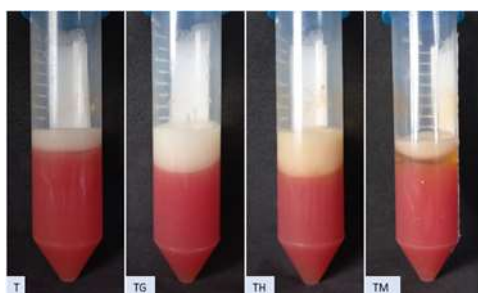


Figura 1. Meios alternativos de produção de celulose bacteriana utilizando suco de tomate.

A CB obtida a partir do meio tradicional, serviu para comparação em relação às propriedades daquelas obtidas pelos meios alternativos. A maioria dos meios testados demonstraram produção celulósica, contudo, a melhor produção de CB analisada foi o meio de tomate baseado no HS (THS).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi avaliada a capacidade da bactéria *Komagataeibacter hansenii* crescer em meios de cultivo alternativos, visando sua aplicação na indústria. Os experimentos revelaram que a utilização do tomate sem qualquer suplementação no meio de cultivo, resultou na produção da membrana com um menor rendimento. Contudo, a adição da milhocina resultou em um rendimento igual ao HS padrão. Os meios alternativos com os melhores rendimentos foram os meios com a suplementação de glicose (TG) e o meio baseado no HS padrão (THS), sendo o THS ainda superior. O estudo de meios de cultivo alternativos para produção de CB é bastante promissor, significando um futuro cada vez mais propício a aplicações dentro da indústria.

REFERÊNCIAS

SILVA, Claudio J.G; CONVERTI, Attilio; COSTA, Andrea F.S.; MEDEIROS, Alexandre D.M.; NASCIMENTO, Helenise A.; AMORIM, Julia D.P. .; SARUBBO, Leonie A. Bacterial cellulose biotextiles for the future of sustainable fashion: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 19, p. 1-14, 2021. doi: 10.1007/s10311-021-01214-x

AMORIM, Julia D.P.; COSTA, Andrea F.S.; DUARTE, Cybelle R.; DUARTE, Izabelle da S.; FARIAS, Patrícia M.A.; RIBEIRO, Francisco de A.S; SOUZA, Karina C.; SILVA, Girlaine S.; STINGL, Andreas; VINHAS, Glória M. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 18, n. 3, p. 851-869, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.066

AMORIM, Julia D.P.; ALMEIDA, Fabiola C.G.; COSTA, Andréa F.S.; MEIRA, Hugo M.; MEDEIROS, Alexandre D.M.; SILVA, Claudio J.G.; SOUZA, Thais C.; SARUBBO, Leonie A.; Use of a bacterial cellulose filter for the removal of oil from wastewater. *Process Biochemistry*, v. 91, p.288-296, 2020. doi: 10.1016/j.procbio.2019.12.020

AMORIM, Julia D.P.; COSTA, Andrea F.S.; GALDINO, Cláudio J.S.; SANTOS, Emilia; SARUBBO, Leonie A.; VINHAS, Glória M. Bacterial Cellulose Production Using Industrial Fruit Residues as Substrate to Industrial Application, *Chemical Engineering Transactions*, v. 74, p. 1165-1170, 2019. doi: 10.3303/CET1974195

HUSSAIN, Zohaib; SAJJAD, Wasim; KHAN, Taous; WAHID, Fazli. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, v. 26, n. 5, p. 2895-2911, 2019. doi: 10.1007/s10570-019-02307-1

ALMEIDA, Fabíola C. G.; COSTA, Andrea F.S.; SARUBBO, Leonie A.; VINHAS, Glória M.; Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-12, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02027

GOMES, F. P. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy*, v. 55, p. 205–211, 2013. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.02.004

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemistry Journal*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954. doi: 10.1042/Fbj0670669

NASCIMENTO, Helenise, Al.; AMORIM, Julia D.P. ;GALDINO, Cláudio J.S.; MEDEIROS, Alexandre D.M.; COSTA, Andréa F.S.; NAPOLEAO, Daniela, C.; VINHAS, Gloria, M.; SARUBBO, Leonie A. Influence of gamma irradiation on the properties of bacterial cellulose produced with concord grape and red cabbage extracts, v. 4, p. 119-128, 2022. doi: 10.1016/j.crbiot.2022.02.001

Capítulo 5



10.37423/230507792

DETERMINATION OF AMINO ACIDS AND PHYTATE IN TRANSGENIC SOYBEAN EXPOSED TO GLYPHOSATE

André Luiz de Souza Lacerda

FIT - Flextronics Instituto de Pesquisa



Abstract: With the increase of glyphosate tolerant transgenic soybean cultivation areas, this substance has become the main herbicide for this crop, its use may interfere in the metabolism and nutritional aspects of transgenic plants. In this scenario, the objective of this work was to verify the oil, protein, phytate and amino acid concentrations in glyphosate tolerant soybean cultivar. Comparing the averages between oil, protein and total amino acid levels in transgenic soybean exposed and not exposed to glyphosate, it was found that there was no significant difference by Tukey test at 5% probability. In conclusion, the data indicate that although the transgenic event affects some routes, amino acid synthesis was not affected nor in nutritional terms at the glyphosate doses studied.

Keywords: soybean, phytate, amino acids, transgenics, glyphosate.

INTRODUCTION

Glyphosate is a non-selective product that controls large numbers of narrow broadleaved plants by inhibiting EPSP synthetase, an enzyme that participates in the metabolic pathway of aromatic amino acid biosynthesis (tryptophan, tyrosine and lysine), which are essential for growth of the plant [8].

Companies have developed genetically modified soybean cultivars, where the gene (CP4) that encodes the enzyme EPSPs [5-enolpyruvate-shikimate-3-phosphate synthase] inhibits the action of glyphosate. Thus, it is possible that glyphosate tolerant soybeans develop even after application of the glyphosate herbicide [8].

To understand what has been accomplished, it is necessary to comment on the mode of action of glyphosate. Glyphosate, active ingredient of Roundup® (N-phosphonomethyl-glycine) herbicide, binds and blocks the activity of the enzyme EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) synthase, which participates in the aromatic amino acid biosynthesis in plants. In the absence of glyphosate, the enzyme EPSPS acts by catalyzing the reaction of S3P (or shikimate-3-phosphate) and PEP (phosphoenolpyruvate), giving rise to the production of EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate), which are the substances responsible for the synthesis of aromatic amino acids. Thus, the presence of glyphosate in the plant, restricting the manufacture of aromatic amino acids, makes it impossible to synthesize various proteins, causing the plant to paralyze growth of both the root system and the shoot.

As for phytic acid (myo-inositol hexachisphosphate), whose main form of phosphorus storage in grains is 50 to 80% of total P, commonly constituting about 1.0 to 2.5% of its dry mass, this substance affects the nutritional value of grains, especially legumes, as it may decrease the bioavailability of minerals and proteins in humans and monogastric animals. On the other hand, it can also have beneficial effects on human health, such as lowering blood cholesterol and triglyceride levels and acting as an antioxidant and anticarcinogen. Due to both positive and negative aspects, the interest in manipulating phytate contents in cereal and pulses has increased. However, it is necessary to better understand the biosynthetic pathway of phytate and the mechanisms that regulate it. One of the priority studies are those relating the levels of phytate and protein in grains, as they are correlated. Phytate is deposited in protein bodies and legumes, it is dispersed in the protein matrix, so it is possible that the accumulation of certain reserve proteins influence phytate synthesis. An experimental model system, in this case the in vitro culture of fruit explants, allows to manipulate the phytate and protein

synthesis via changes in the composition of the culture medium, and to analyze the proteins expressed under contrasting phytate synthesis situations.

MATERIAL AND METHODS

Field experiment: This experiment was conducted in a randomized block design with nine treatments and four replications. The cultivar analyzed was genetically modified soybean BRS Valiosa RR. Sowing was carried out in October in the agricultural year 2006/2007, with density of 14 to 16 linear plants per meter and spacing of 0.5 m between rows. The experimental plots consisted of six 5 m long lines with four replications. It was considered as useful area, the four central lines with 4 m in length, disregarding 0.5 m from the ends of each plot.

Treatments: consisted of glyphosate applied only once T1 and T2, respectively at doses: 1.5 and 2.0 L ha⁻¹ p.c., glyphosate sequentially applied T3, T4 and T5, respectively at doses: 1.5 / 1.5; 2.0 / 1.5 and 2.0 / 1.5 / 1.5 L ha⁻¹ of p.c, with intervals of 15 to 20 days between applications and T6 clean weeded control (without glyphosate application).

Glyphosate application: The commercial product used was Roundup Ready® in the formulation of 480 g L⁻¹ acid equivalent made between 15 and 20 days after emergence of soybean seedlings, from physiological stage V2, when the edges leaves of the second trifolium no longer touch, according to the classification of [5]. Applications have been always done in the morning, without wind to avoid drift, with the aid of a constant pressure (CO2) costal sprayer, adjusted to syrup volume of 200 L ha⁻¹ and with fan nozzles (110° - SF - 02) following the manufacturers recommendations.

Determination of oil and protein: The protein content in 1.0 g and 0.1 g oil in soybeans were determined by the Kjeldhal method, using copper sulfate and the Soxhlet method as catalyst, respectively, hexane as a solvent [4].

Phytate determination: 25 g aliquots were taken from the triplicate soybean sample in the laboratory, which were previously homogenized, crushed and kept in a freezer at a temperature of around -18 °C until the time of analysis. The method used was suggested by [9]. Extraction consisted of the addition of 20 mL 0.5 m Mol⁻¹ HCl to 500 mg of sample. All inositol phosphates in the extract were retained in previously prepared Dowex AG 1-X8 ion exchange resin (400 to 800 mesh). The method was based on the dark blue coloration of the ferro-sulfosalicylic acid compound. In the presence of phytate, the iron complex was precipitated, reducing the intensity of the blue color. The reading was performed in a spectrophotometer at a wavelength of 500 nm.

Separation and analysis of amino acid composition and quantification of seed soluble lysine by HPLC:

High performance Liquid Chromatography (HPLC) was employed for the separation and quantitative determination of free amino acids using a Spherisorb ODS-2 reverse phase column (C18) after derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) [10]. OPA derivatives were detected by fluorescence, for which 1 g of flour obtained from the grinding of mature seeds in 10 ml of MCW (methanol, chloroform and water in the ratio 12 : 5 : 3) was used. The mixture was left overnight at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 6000 rpm for 20 min, then 1 mL chloroform and 1.5 mL water were added to each 4 mL MCW. It was centrifuged again by carefully removing the formed aqueous phase and then lyophilized. The pellet was resuspended in 300 mL of water and the free amino acid solution frozen at -20 °C. After thawing, the samples were filtered on a 0.22 µ pore PVDF Millipore filter to remove fractions of reserve proteins, albumin and globulin, which are water soluble and then analyzed by HPLC. OPA derivatives were detected by fluorescence or UV absorption. To a 20 mL aliquot (standard or sample) was added 60 mL of the OPA reagent. OPA reagent was prepared by dissolving 50 mg of OPA in 1 mL of methanol and mixing 6.5 mL of borate NaOH buffer (2.4% w v⁻¹ boric acid in H₂O; pH adjusted with 2 M NaOH). On the day of the analyzes, 5 mL of 2-mercaptoethanol was added to 625 mL of OPA. After exactly 2 minutes, 10 mL corresponding to each genotype or standard was injected into the HPLC, starting the elution of the mixture on a linear gradient (20-100% B [methanol 65%]) in buffer A (50 mM Na Oac, 50 mM Na₂ HPO₄, tetrahydrofuran, methanol, pH 7.25). The flow rate was 0.8 mL min for 50 min. The gradient has been programmed to linearly increase the ratio of "B" to "A". OPA amino acid derivatives were detected by a fluorescence monitor, 265 nm excitation and 480 nm emission. Amino acid concentrations in the samples were determined by the area of the integrated peaks, compared to the peaks of a standard at 250 nmol mL⁻¹. For quantification of lysine specifically, the gradient was repeated, but at a 75-100% gradient, to allow the appearance of the lysine peak prior to amino acid degradation. Results were expressed as a percentage of moles of amino acids recovered in relation to total amino acids (mol%).

Total free soluble amino acid (ALT) dosage: After extraction of amino acids, an aliquot of this solution was analyzed to verify total soluble amino acids. An a calibration curve was constructed using a leucine standard at concentrations of 40, 80, 120, 160 and 200 nmol mL⁻¹. A 100 mL fraction of the amino acid solution was placed in a test tube by adding 900 mL of water. For both unknown sample and standard curve analysis, 0.5 mL of sodium citrate buffer (0.2 M, pH 5.0), 0.2 mL of ninhydrin reagent (5% in methylglycol) and 1 mL KCN (2% 0.01 M solution in methyl glycol). The test tube was covered with glass balls to prevent evaporation and placed in a water bath at 100 °C for 20 min. It was allowed to

reach room temperature and was completed with 60% ethanol. Spectrophotometer reading of standards and samples against white was taken at 570 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of proteins, lipids, phytate and amino acids are shown in Tables 1 and 2. Table 1 shows that there was no interference in oil and protein production in transgenic soybean due to glyphosate spraying on the crop, but there was an effect phytate production, which should be carefully analyzed, as it is a very important antinutritional factor.

It can be noted that when the application of the product was sequential there was a tendency to decrease phytate, as well as when the applied dosage was lower. But further work must be done to clarify the reason for such behavior, and whether this fact repeats itself in other experiments. The decrease in phytate production may be an incentive for a higher consumption of soybeans within human food.

According to [7] the interaction of calcium, phytate and soybean protein seems to be affected by the pH of the medium and the concentration of the three components. At low pH (<4), phytate associates with soybean protein to form insoluble complexes in which calcium participation will depend on its concentration. When calcium is in excess, it can displace the phytate from the phytate-protein complex and make it soluble. With high pH (> 6.5) and high calcium concentration, phosphorus precipitates and protein remains soluble as a result of the formation of insoluble calcium-phytate complexes. Therefore the pH may be another factor that explains the lower phytate production due to the ideal pH in the herbicide syrup used to be acidic.

[11] They report that transgenic (T) and non-transgenic (NT) soybean seeds have different concentrations of Co, Cu, Fe and Sr. Bioaccessible fractions of elements such as Cu, Fe, Mn, Zn and S are higher in soybean seeds transgenic.

In Table 2, mean total amino acid values in genetically modified soybean seeds are tolerated and exposed to glyphosate as glyphosate applications, and it was verified that there was no significant difference at the Tukey test level of 5% without total amino acid levels (nMol ml⁻¹) for glyphosate doses studied in relation to the control as glyphosate herbicide applications that do not influence the metabolism of soybean plants after total amino acid levels.

Evaluated the activity of some key enzymes involved in combating reactive oxygen species (ROS) as well as differential protein species in the leaves of both soybean genotypes, transgenic (T) and non-

transgenic (NT). The results revealed that all the evaluated enzymes presented higher activity in T soybean leaves when compared to NT. Higher concentrations of hydrogen peroxide and malondialdehyde were also observed, clearly indicating an oxidative stress condition established in the transgenic genotype. In addition, 47 proteins were differentially abundant when comparing the leaves of both plants, 26 species were accurately identified, including proteins involved in genetic modification (CP4 EPSP_s) [1].

The differential evaluation of enzymes and proteins expressed in T and NT soybean seeds. Analysis of malondialdehyde, ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11), glutathione reductase (EC 1.6.4.2) and catalase (EC 1.11.1.6) revealed higher levels in transgenic seeds (29.8; 30.6; 71.4 and 35.3%, respectively). Protein separation in soybean seeds was performed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and 192 proteins were obtained by laser matrix desorption / ionization (MALDI) in flight time quadrupole (MSQ) analyzed and electrospray ionization (ESI). In addition, CP4 EPSP_s enzyme, involved in genetic modification, was identified by enzymatic digestions using trypsin or chymotrypsin and ESI-QTOF MS / MS. Among the identified proteins, cytosolic glutamine synthetase, glycinin subunit G1 and glycine-rich RNA-binding were differentially expressed after analysis using the two-dimensional electrophoresis technique and the application of a regulatory factor of 1.5 or greater [2].

The results obtained in the above study indicated that the genetic modification itself could be a stress factor, causing changes in the activity of some enzymes. Changes in soybean seed proteome were corroborated with the production of MDA, which is an indicator of lipid peroxidation and oxidative stress and was higher in soybean seeds. In addition, higher enzymatic activities were observed for APX, GR and CAT in transgenic seeds. This set of results suggests a higher stress level in soybean T seeds, even when no herbicides were used, since the herbicide resistance gene was inserted into the seed DNA. This fact explains some results previously reported in the literature, stating that transgenic seeds have a greater ability to transport metals from the soil and have greater bioavailability of metals in seeds when compared to non-transgenic soybeans.

In addition, the enzyme involved in genetic modification (CP4 EPSP_s) was also easily identified by ESI-QTOF MS / MS using trypsin as a cleavage enzyme. Among the 192 proteins identified, four of them were differentially expressed by 2-D DIGE analysis with a regulatory factor of 0.5 or higher. Given the correlation between differentially expressed proteins and the enzymatic activities found, it is not difficult to rationalize that genetic modification induces a condition of oxidative stress in seeds. Tables

3 and 4 show the average values of free amino acids (asparagine, glutamine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucina, leucina and lysine) in glyphosate tolerant soybean seeds after exposure to glyphosate applications and none. The treatment significantly influenced the average values of free amino acids and the correlation coefficients between the variables lipids (L), proteins (P), phytate (F) and amino acids (A).

Data indicated that although the transgenic event affects some routes, amino acid synthesis was not affected. From the results obtained, the studied organism apparently maintained a similar balance to conventional soybean, so that the genetic modification did not produce significant alterations to maintain its metabolism. This fact is moving researchers working with genetically modified organisms to better understand the specific aspects of genetically modified plant metabolism and to identify key proteins that may eventually be subject to genetic modification so that soybeans can have higher tolerances to the glyphosate herbicide.

Others researchers concluded that isolated or sequential applications of glyphosate did not affect the growth and yield of GM cultivar BRS Valiosa RR soybean, as well as the oil content and protein of GM cultivar were not altered by glyphosate, regardless of its time and dose application [6].

Table 1 - Average values of oil, protein and phytate content in glyphosate tolerant genetically modified soybean seeds exposed to glyphosate applications, Esalq / USP, 2007.

Treatments	Dose (g.i.a ha ⁻¹)	Oil (%)	Protein (%)	Phytate (mg L ⁻¹)
T1 – Glyphosate	720	18.4 a	39.3 a	157.17 bc
T2 – Glyphosate	960	18.9 a	37.1 a	172.72 ab
T3 - Glyphosate / glyphosate	720/720	18.5 a	39.1 a	181.84 a
T4 - Glyphosate / glyphosate	960/720	18.4 a	38.1 a	162.45 ab
T5 - Glyphosate /glyphosate/glyphosate	960/720/720	18.6 a	38.7 a	160.42 abc
T6 – Witness	---	18.8 a	38.6 a	174.75 ab
DMS		0.89	2.3	18
CV (%)		2.0	2.5	6.0

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% probability.

Table 2 - Average values of total amino acids in glyphosate tolerant genetically modified soybean seeds exposed to glyphosate applications, Esalq / USP, 2007.

Treatments	Dose (g.i.a ha⁻¹)	Amino acids (nMol ml⁻¹)
T1 – Glyphosate	720	159.73 a
T2 – Glyphosate	960	136.05 a
T3 - Glyphosate/glyphosate	720/720	175.81 a
T4 - Glyphosate/glyphosate	960/720	147.42 a
T5 - Glyphosate/glyphosate/glyphosate	960/720/720	127.43 a
T6 – Witness	---	136.99 a
DMS		51.87
CV (%)		26.6

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% probability.

Table 3 - Mean values of free amino acids (asparagine, glutamine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine) in glyphosate tolerant genetically modified soybean seeds exposed to glyphosate applications, Esalq / USP.

Treatments	Doses (g.i.a ha ⁻¹)	Asp	Glu	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
T1 – Glyphosate	720	166.4 a	334.3 a	163.6 a	127.9 a	146.0 a	76.1 a	83.1 a	78.4 a	0
T2 – Glyphosate	960	140.5 a	346.6 a	134.3 a	107.6 a	129.7 a	49.6 a	54.9 a	53.7 a	0
T3 - Glyphosate/glyphosate	720/720	151.0 a	326.3 a	129.0 a	79.6 a	137.6 a	49.0 a	54.0 a	55.8 a	0
T4 - Glyphosate/glyphosate	960/720	137.5 a	338.6 a	130.7 a	79.8 a	153.5 a	45.9 a	52.4 a	52.2 a	0
T5- Glyphosate/glyphosate/glyphosate	960/720/720	145.7 a	339.9 a	127.2 a	118.3 a	141.7 a	49.4 a	53.1 a	53.6 a	0
T6 – Witness	---	131.1 a	348.6 a	132.8 a	111.5 a	117.8 a	50.3 a	52.8 a	51.7 a	0
DMS		111.4	291.7	105.3	114.5	107.7	42.3	44.6	43.8	---
CV (%)		30.9	34.6	31.6	44.0	31.0	32.7	31.4	31.1	---

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% probability.

Table 4 - Correlation coefficient between the variables lipid (L), protein (P), phytate (F) and amino acids (A), Esalq / USP.

Variables	Correlation Coefficient (r)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
L x P	-0.45 ns	-0.31 ns	-0.93 ns	0.14 ns	-0.25 ns	-0.67 ns
L x F	0.23 ns	0.62 ns	0.41 ns	-0.72 ns	-0.11 ns	-0.20 ns
L x A	0.92 ns	0.21 ns	0.88 ns	0.54 ns	0.90 ns	0.02ns
P x F	0.14 ns	-0.91 ns	-0.36 ns	0.51 ns	0.18 ns	0.19 ns
P x A	-0.19 ns	-0.71 ns	-0.98*	-0.22 ns	0.10 ns	0.49 ns
F x A	0.01 ns	0.49 ns	0.15 ns	-0.82 ns	-0.31 ns	0.77 ns

ns = not significant * = significant at 1% probability level (p < 0.01)

CONCLUSION

In conclusion, the data indicate that although the transgenic event affects some routes, amino acid synthesis was not affected nor in nutritional terms by glyphosate applications at the studied doses.

REFERENCES

- [1] ARRUDA, S.C.C.; BARBOSA, H.S.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes. *Journal of Proteomics*, v.93, p.107-116, 2013.
- [2] BARBOSA, H.S.; ARRUDA, S.C.C.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. *Anal Bioanal Chemistry*, v.402, p.299–314, 2012.
- [3] BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, v.17, p.278-293, 1996.
- [4] BONATO, R.E; BERTAGNOLLI, P.F.; LANGE, C.E.; RUBIN, S.A.L.R. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.2391-2398, 2000.
- [5] FEHR, W.E.; CAVINESS, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S. Stage of development descriptons for soybeans. *Glycine max (L.) Merrill. Crop Science*, v.11, p.929-31, 1971.
- [6] FRANCO, D.A.S.; ALMEIDA, S.D.B.; CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O.; MORAES, R.M.; LACERDA, A.L.S.; MATALLO, M.B. Evaluation of Glyphosate Application on Transgenic Soybean and its Relationship with Shikimic Acid. *Planta Daninha*, v.30, p.659-666, 2012.
- [7] GRYNSPAN, F.; CHERYAN, M. Phytate-calcium interactions with soybean protein. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v.66, p.93-97, 1989.
- [8] JEZOVSEK, G.K. Uma nova proposta para o controle das ervas daninhas: o uso de plantas transgênicas. 1997. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1 Simpósio sobre herbicidas e plantas daninhas. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 62-74.
- [9] LATTI, M.; ESKIN, M.A. Simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v.28, p.1313-1315, 1980.
- [10] MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A.C.N. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, v.6, p.103-108, 1994.
- [11] MATAVELI, L.R.V.; POHL, P.; MOUNICOU, S.; ARRUDA, M.A.Z.; SZPUNAR, J. A. Comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics*, v.2, p. 781–832, 2010.
- [12] YEMM, E.W; COCKING, E.C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, v.80, p.209-214, 1995.

Capítulo 6



10.37423/230607837

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DA ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE CONYZA SP.

Carlos Alexandre Marochio

Universidade Estadual de Maringá

Maycon Rodrigo Ruiz Bevilaqua

Universidade Estadual de Maringá

Rubem Silverio de Oliveira Junior

Universidade Estadual de Maringá

Maria de Fatima Pires da Silva Machado

Universidade Estadual de Maringá

Marie Jasieniuk

University of California



Resumo: A proposta no presente estudo foi investigar a variabilidade genética em nível molecular, e verificar a forma como estão geneticamente estruturadas as espécies de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, analisando o polimorfismo em locos de sequências simples repetidas (locos SSR) de DNA, também denominados locos de microssatélites. Foram analisadas amostras de *C. canadensis*, sensíveis e resistentes ao glifosato, e *C. bonariensis* resistentes e com múltipla resistência, coletadas no Vale Central da Califórnia (EUA), e amostras de *C. sumatrensis* sensíveis e resistentes coletadas em seis municípios do Estado do Paraná (Brasil), usando os *primers* HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, e HWSSR11 para analisar o polimorfismo nos 12 locos microssatélites. O maior número de alelos (26) foi encontrado em *C. sumatrensis*. A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$), e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$), também foi maior nas amostras de *C. sumatrensis*, indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatrensis*. As amostras de *C. sumatrensis* formaram populações geneticamente estruturadas ($F_{ST} = 0,4822$). Nos municípios de Campo Mourão e Cafelândia há exemplares de *Conyza* com características em nível molecular, para locos microssatélites, de *C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, e exemplares que compartilham alelos característicos das três espécies, sugerindo que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.

Palavras-chave: Microssatélites, SSR, Plantas Daninhas.

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas agrícolas, selecionadas pela manutenção das culturas feitas pelo homem, são hoje um fenômeno ecológico e evolutivo relativamente recente (NEVE et al., 2009). Dentro do grupo das plantas daninhas o gênero *Conyza* contém aproximadamente 50 espécies conhecidas, as quais se distribuem em quase todo o mundo (KISSMANN; GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo são: *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis*, e *Conyza canadensis*, sendo as duas primeiras originárias da América do Sul e a terceira originária da América do Norte.

Segundo Thebaud e Abbott (1995), a espécie considerada como a mais difundida em todo o mundo é *C. canadensis*. Isso se deve a algumas características reprodutivas associadas ao alto potencial invasivo dessa espécie, entre as quais a grande produção de sementes, germinação rápida e a alta capacidade de dispersão dos aquênios (HAO et al., 2009).

Os autores Ferreira e Gattapaglia (1995) definem marcador molecular como sendo qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como por exemplo, as isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas, ou não expressas, do genoma.

Os microssatélites são uma categoria de marcadores moleculares definidos por Litt e Luty (1989), como sequências simples repetitivas (SSR) em genomas eucariotos. Os microssatélites, ou locos SSR, têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com finalidades diferentes, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *C. sumatrensis* foram coletadas nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru e Toledo no estado do Paraná em Janeiro de 2011 e a semeadura foi realizada no mês de Maio de 2011 no CTI (Centro de Treinamento de Irrigação) da Universidade Estadual de Maringá – UEM. As sementes de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foram coletas em 4 locais diferentes dentro do Vale Central do estado da Califórnia, Estados Unidos, o experimento foi realizado em casa de vegetação na University of California, Davis, CA. no mês de Janeiro de 2013.

Para a extração de DNA das plantas de *C. sumatrensis* foi utilizada a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). Para a extração de DNA das plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foi utilizado o protocolo elaborado por Soltis Lab. (2002) com referências de Doyle e Doyle (1990) e Cullings (1992).

A padronização das condições de amplificação do DNA das diferentes amostras de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatensis*) foi realizada no Jasieniuk Lab, Departament of Plant Science da University of California, Davis, CA. Foram selecionados os *primers* desenvolvidos para *Conyza*: HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, e HWSSR11.

Para a análise do produto amplificado para cada *primer* de microssatélite e para cada amostra analisada foram utilizados os programas POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999) e STRUCTURE software 2.0 (PRITCHARD; WEN, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a diversidade genética das 88 amostras selecionadas das espécies de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatensis* foram utilizados os pares de *primers*: HW02, HW06, HW07, HW14, HW17, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, HWSS11. *C. sumatensis* apresentou o número máximo de 4 alelos usando o *primer* HWSSR01, sendo este o maior número alelos encontrado para todas as amostras de *Conyza*. Na espécie *C. sumatensis* foi observado maior número de alelos (26), *C. bonariensis* (24) e *C. canadensis* (20), nos 12 locos analisados.

A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$) e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$) também foi maior nas amostras de *C. sumatensis* indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatensis*, por outro lado, as amostras de *C. canadensis* apresentaram a menor diversidade genética.

A maior diversidade de alelos e de valores de heterozigosidade esperada nas espécies *C. sumatensis* e *C. bonariensis*, indica que estas duas espécies tem maior diversidade genética do que a espécie *C. canadensis*, e que o controle destas deve mais difícil, e deve requerer estratégias adicionais ao controle usado para *C. canadensis*. Isto porque, em amostras com maior diversidade genética há maior chance de se encontrar exemplares (plantas) que respondem diferentemente às alterações ou pressões (ação de herbicidas) exercidas pelo ambiente.

De acordo com as premissas de Allendorf e Luikart (2007), a existência de variabilidade genética em amostras de uma população aumenta a chance de algumas amostras para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie. No que se refere às plantas daninhas com maior diversidade genética, há uma chance maior de serem

selecionadas plantas que não sofrem os efeitos deletérios de aplicações de herbicidas, garantindo a preservação destes exemplares.

A divergência genética mensurada pelo valor de F_{ST} foi maior no loco *HW29* ($F_{ST} = 0,5366$), indicando que o primer *HW29* parece ser o mais adequado para diferenciar amostras das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*). A diferenciação genética entre as amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis* coletadas no mesmo continente (América do Norte) também foi alta ($F_{ST} = 0,2861$), indicando que estas duas espécies estão geneticamente bem estruturadas e devem requerer estratégias de controle diferencial. A análise conjunta dos locos microssatélites das três espécies mostrou que o valor maior de identidade genética ($I = 0,8293$) foi observado entre as espécies *C. canadensis* e *C. sumatrensis* e que as espécies mais divergentes ($I = 0,6303$) foram *C. canadensis* e *C. bonariensis*.

O agrupamento das duas amostras de plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, e das 10 amostras de *C. sumatrensis*, de acordo com modelo baseado no algoritmo Baysiano (Figura 1), evidenciou que a maior diversidade genética dentro das amostras é decorrente de maior diversidade dentro da espécie *C. sumatrensis*.

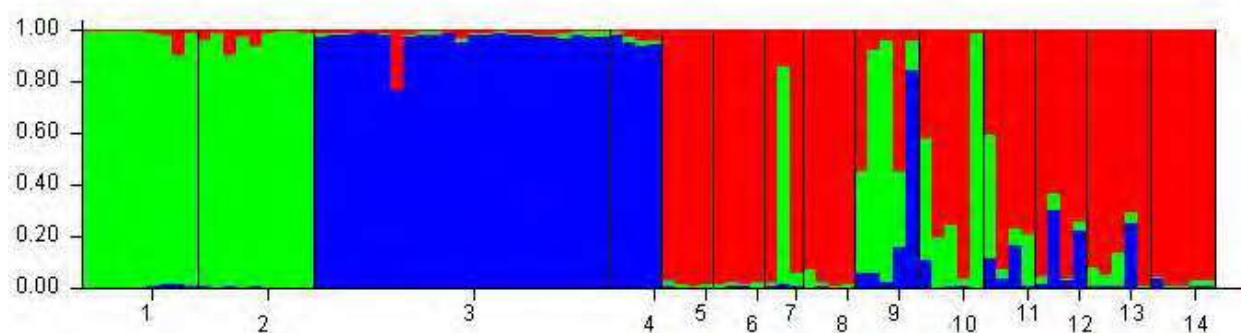


Figura 1. Gráfico *bar plot* obtido de acordo com modelo baseado no algoritmo Baysiano, a partir da análise de locos microssatélites das amostras de plantas de *C. canadensis* (1-2), *C. bonariensis* (3-4), e *C. sumatrensis* (5-14). Cada planta está representada por uma barra vertical uniforme, ou dividida em K segmentos coloridos ($K = 3$), com tamanhos proporcionais para cada grupo K de alelos, inferido na análise. Cada cor (verde, azul, e vermelho) representa a proporção de alelos de cada grupo, ilustrado na barra vertical.

Amostra (1): *C. canadensis*-S; (2): *C. canadensis*-R; (3): *C. bonariensis*-R; (4): *C. bonariensis*-RR; (5-14): *C. sumatrensis* [Campo Mourão1-S (5); Floresta1-S (6); Floresta2-S (7); Cascavel1-R (8); Campo Mourão2-S (9); Cafelândia1-S (10); Cafelândia2-S (11); Peabiru-S (12); Toledo-R (13); Cascavel2-S/R (14)].

O valor ótimo de K ($K = 3$; $\Delta K = 54,1987$), determinado pela análise Baysiana foram consistentes com a evidência que os alelos estão misturados em várias amostras de *C. sumatrensis*, e que há pouca mistura de alelos de dois ou três grupos nas amostras de *C. canadensis* e de *C. bonariensis*.

CONCLUSÕES

A análise dos locos microssatélites mostrou que a diversidade genética é maior nas espécies de *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*; a espécie de *C. canadensis* foi a que apresentou a menor diversidade genética.

A aplicação de herbicidas para o controle de *C. sumatrensis* nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru, e Toledo, do estado do Paraná tem selecionado amostras da espécie que são geneticamente divergentes.

As amostras de *C. sumatrensis* dos municípios de Campo Mourão, Cafelândia, Floresta, Peabiru, e Toledo, compartilham alelos característicos das espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, indicando que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Maden Massachusetts, 2007, 642 p.
- CULLING, K.W. Desing and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* v.1, p. 233-240, 1992.
- DEMORE, P.S. Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus de Jaboticabal. Dissertação de mestrado, 2008. 45p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* v.12, p. 13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- GOULART, I.C.G.R. et al. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 29, p. 1175-1181, 2011.
- HAO, J.H. et al. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. *Journal of Systematics and Evolution* v. 3, p. 245-254, 2009.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Bernardo do Campo: Basf, p.152-156, 1999.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 44, p. 398-401, 1989.
- NEVE, P. et al. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist* v. 184, p. 783-793, 2009.
- PRITCHARD J.K., WEN W. Documentation for *STRUCTURE software: Version 2*. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>. 2003.
- SOLTIS LAB CTAB DNA EXTRACTION PROTOCOL. The Soltis Lab, Florida Museum of Natural History, 2002.
- THEBAUD, C.; ABBOTT, R.J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany* v.3, p. 360-368, 1995.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, 1999.