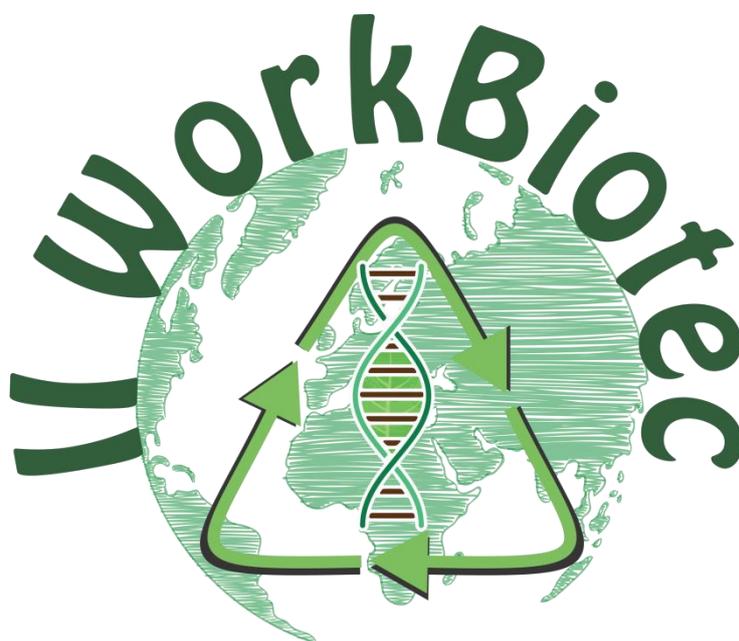


Anais II Workbiotec – Workshop de Biotecnologia



Bioenergia e Sustentabilidade

18 e 19 de agosto de 2016

Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu – São Paulo

Sumário

ALEXANDER, J.	2
BARBOSA, M.A.	3
BARROS, D.C.B.	4
BASSO, C.R.	5
BERNARDES, A.	6
CARANDINA, R.F..	7
CORRÊA, C.V.	8
ESPIRITO SANTO, M.C.	9
EVANGELISTA, D.E.	10
FACCIN, P.C.	11
GANDIN, C.A.	12
GODOY, M.O.	13
HERNANDES, M.P.	14
JIM, A.S.	15
KADOWAKI, M.A.S.	16
KOHORI, N.A.	17
MELLO, B.L.	18
NASCIMENTO, A.S.	19
ORTEGA, L.R.Z.	20
PINTO, L.M.C.	21
PONTES, L.G.	22
PONTES, L.G.	23
ROSSI, M.C.	24
SANTORUM, M.	25
SESSO, A.S.	26
SILVA, M.K.L.	27
SIQUEIRA, G.	28
SOUZA, C.B.	29
TAKAHASHI, G.S.	30
VANZELA, H.C.	31

1. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINOLYTIC BACTERIA AND THEIR POTENTIAL AGAINST PLANT FUNGAL PATHOGENS.

ALEXANDER, J.¹; VELUSAMY, P.¹, RAKAVI, C.S.¹, HEMALATHA¹

¹SRM UNIVERSITY, CHENNAI, INDIA.

Chitin is one of the most abundant biopolymers widely distributed in marine and terrestrial environment. In the present study, 23 bacterial isolates were isolated from different soil samples and screened for chitinolytic activity on the basis of chitin hydrolysis. Screening in colloidal chitin medium, strain KA8 demonstrated the highest chitinolytic activity in 0.5% colloidal chitin at pH 7 and was selected for further study. By 16s rRNA analysis the strain KA8 was identified as *Bacillus thuringiensis* strain BE4-2. The maximum chitinase production was obtained at 37⁰C and pH 5 after 96 hour of incubation. Approximately, the molecular weight of chitinase was estimated to be 49.1 KDa by 8% SDS-PAGE and zymogram. *Bacillus thuringiensis* strain BE4-2 was screened for antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Rhizotonia solani* by agar well diffusion assay on Potato Dextrose agar containing 0.5 % colloidal chitin. *Bacillus thuringiensis* strain BE4-2 had antifungal activity and biocontrol efficacy to *Fusarium oxysporum*.

2. ESTUDO ESTRUTURAL DA ADSORÇÃO IMPRODUTIVA ENTRE FRAGMENTOS DE LIGNINA E GLICOSIL HIDROLASE DA FAMÍLIA GH1

BARBOSA, M.A.¹; GOMES, A.A.S.¹; OLIVEIRA NETO, M.¹

¹Instituto de Biociências – UNESP-Botucatu.

O etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos é chamado de etanol de segunda geração. O processo de obtenção de etanol é dificultado pela recalcitrância da parede vegetal, e esta característica deve-se a presença da lignina. Ligninas são polímeros hidrofóbicos e inertes que preenchem os espaços na parede celular entre as moléculas de celulose e hemicelulose. Um fator que compromete a qualidade da hidrólise enzimática é a lignina residual presente no meio reacional que influencia negativamente a quebra da celulose. Até o momento, não foi demonstrada completamente a natureza da interação entre as celulasas e a lignina. Através do uso de docking molecular e dinâmica molecular demonstramos os tipos de ligações entre os compostos fenólicos precursores da lignina, o ácido tânico (Tan), ácido coniferílico (Con), ácido coumarílico (Cou), ácido sinapílico (Sin) e ácido benzoico (Ben), e a enzima *TpBGII*, uma glicosil hidrolase termofílica da família GH1 que tem demonstrado grande potencial para aplicações industriais. O docking molecular (GOLD v5.4) mostrou que todos os compostos fenólicos utilizados se ligam no sítio ativo das enzimas, sendo que o GoldScore para os compostos foram: 108,71 Tan; 49,59 Con; 41,32 Cou; 42,58 Sin; 36,38 Ben. A dinâmica molecular para *TpBGII*, revelou que todos os compostos se ligam inicialmente ao sítio, porém após alguns segundos de interação se desprendem formando novas ligações com regiões hidrofóbicas aleatórias na superfície da molécula. Contudo o ácido tânico apresentou um comportamento diferente e não se desprendeu totalmente do sítio ativo, ficou ligado a resíduos de triptofano, responsáveis pela ancoragem das moléculas de açúcar, existentes ao redor do sítio ativo. O alto GoldScore do ácido tânico pode ser explicado pela estrutura química da molécula, que apresenta mais grupos hidroxilas, ao contrário dos demais compostos que possuem mais grupos metóxi, isto confere diferenças nas polaridades e cargas e, portanto, no poder de ligação. Os grupamentos hidroxilas também são observados em abundância nos açúcares o que confirma a similaridade das estruturas e a competição pelo sítio ativo. Outro ponto importante é que a molécula de ácido tânico é maior do que os demais compostos possuindo mais resíduos aromáticos que fazem ligações do tipo π - π com os resíduos de triptofano, aumentando as áreas de interação e explicando o porquê de a molécula não se desprender da região catalítica como os demais compostos ao longo da dinâmica molecular.

3. UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTO AMINOÁCIDO VITAMÍNICO (PROMOTOR L®) NA ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL ENERGÉTICA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS.

BARROS, D.C.B.¹; ORSI, R.O.¹; KADRI, S.M.¹; ZALUSKI, R.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu.

A criação racional de abelhas *Apis mellifera* africanizadas que caracteriza a apicultura é de extrema importância, pois contribui para o processo de polinização de cultivos agrícolas e da vegetação nativa, além de possibilitar a exploração de produtos apícolas de grande importância nutricional e farmacêutica. A produção de mel, pólen, própolis, cera, geleia real e apitoxina também são de grande importância para a geração de emprego e renda, sendo que o Brasil possui grande possibilidade de maximizar a produção desses produtos, devido a sua extensão territorial e riqueza de flora apícola. Atualmente um dos desafios da apicultura é aumentar a produtividade, sendo que para isso, uma das condições necessárias é garantir a manutenção das colmeias durante os períodos de escassez de floradas, quando geralmente ocorrem grandes perdas de enxames. O período de escassez de floradas conhecido como entressafra, geralmente prejudica a sobrevivência das abelhas devido à deficiência de nutrientes, o que compromete o desenvolvimento, manutenção e reprodução das colônias, diminuindo o tempo de vida destes insetos e favorecendo o aparecimento de doenças. Uma das alternativas para manutenção dos enxames nesse período é o fornecimento de alimentação artificial energética e proteica, procurando atender as exigências nutricionais das abelhas. Atualmente uma alternativa utilizada por muitos apicultores, visando reduzir os altos custos de fornecer algumas dietas para a manutenção dos enxames, é a utilização de um suplemento alimentar conhecido como Promotor L®. No entanto, a utilização desse suplemento não tem efeitos comprovados sobre a manutenção e crescimento dos enxames. Na literatura os efeitos da suplementação de enxames utilizando Promotor L® juntamente a alimentação artificial permanecem inconclusivos, não se conhecendo se os efeitos observados em estudos realizados se devem ao alimento energético fornecido, ou aos efeitos do Promotor L®. Considerando o fato de que muitos apicultores utilizam esse suplemento na alimentação de abelhas *Apis mellifera*, tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre seu papel na manutenção de enxames em períodos de entressafra.

4. DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE UTILIZANDO SPR E UV-VIS

BASSO, C.R.¹; TOZATO, C.C.²; ARAÚJO JUNIOR, J.P.²; PEDROSA, V.A.¹

¹Instituto de Biociências - Unesp Botucatu; ²Instituto de Biotecnologia – Unesp Botucatu.

Um dos maiores problemas de saúde pública enfrentado hoje no Brasil é a circulação do vírus da dengue. Pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em conjunto com estados e municípios, registraram 1.566.510 casos notificados em 2015. A região Sudeste aparece como o principal foco de transmissão, sendo responsável por 989.092 casos, cerca de 63,1% [1]. O vírus da dengue é transmitido pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, principalmente *A. aegypti*. O vírus pode afetar pessoas de qualquer idade e os principais sintomas causados pela doença são: febre alta, dor de cabeça, dores musculares e nas articulações, dor nos olhos, náuseas, vômitos, manchas na pele, erupção cutânea característica e em alguns casos, pode haver uma evolução da doença para o tipo hemorrágico [2]. Neste trabalho, nós realizamos a detecção do vírus da dengue através das técnicas de SPR e LSPR (UV-Vis). Ambas as técnicas tem se destacado no campo tecnológico como ferramentas analíticas que podem identificar a presença de patógenos através de anticorpos específicos [3]. Para a LSPR, nanopartículas de ouro (AuNPs) em solução foram utilizadas como base nos experimentos. Os resultados obtidos mostram que as AuNPs apresentaram absorvância de 2,08 com comprimento de onda de 522 nm. Após a modificação da sua superfície e a ligação específica do vírus ao anticorpo houve uma redução no pico da absorvância chegando a 0,51 com deslocamento no comprimento de onda para 670 nm, indicando a detecção. Resultado similar foi encontrado por *Basso et al.* [4] Para a SPR, um sensor de ouro foi utilizado como base para as análises, após sua modificação a ligação específica do vírus ao anticorpo foi obtida em tempo real pela técnica, constatada pela pequena queda no processo de dessorção. Estes testes proporcionaram um diagnóstico rápido, sensível, de baixo custo e com alta seletividade analítica.

Apoio Financeiro: Capes

Referências

- [1] Ministério da Saúde. Acesso em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/2015-035.15.pdf>. Access in 26/07/2016.
- [2] Ross, T. M. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, p. 149, 2010.
- [3] Fernandez, F.; Baeza, F. S.; Marco, M. P. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 34, p. 151, 2012.
- [4] Basso, C. R.; Tozato, C. C.; Araújo Junior, J. P.; Pedrosa, V. A. *Analytical Methods*, v. 7, p. 2264, 2015.

5. O EFEITO SINÉRGICO DE MÓDULOS DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

BERNARDES, A.¹; CURTOLO, F.¹; PELLEGRINI, V.O.A.¹; CAMILO, C.M.¹; MELLO, B.L.¹; GUIMARAES, F.E.C.¹; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos – USP – São Carlos.

Uma alternativa eficaz de produção energética é indispensável ao ser humano na atual sociedade e, a utilização da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis de segunda geração, pode ser uma delas. Todavia, a hidrólise enzimática ultimamente empregada na sacarificação da biomassa é dificultada pela considerável recalcitrância da parede celular. Para que essa tecnologia se torne sustentável e economicamente viável, um entendimento em âmbito atômico-molecular da hidrólise enzimática da biomassa faz-se necessário. O reconhecimento de polímeros de celulose por celulasas é frequentemente mediado por módulos de ligação a carboidratos (CBMs), que aumentam consideravelmente a atividade enzimática destas enzimas em substratos poliméricos e insolúveis. Apesar de conhecida a importância desses módulos no processo de degradação da parede celular, a complementação de coquetéis com esses módulos não foi ainda muito investigada e compreendida. Nesse contexto, esse trabalho envolveu o emprego de métodos científicos modernos em enzimologia e bioquímica de macromoléculas, aliados a estudos biofísicos e estruturais, a fim de obter uma compreensão mais aprofundada da hidrólise de substratos celulósicos. Portanto, nós clonamos vários genes de CBM de fungos e bactérias e os produzimos em larga escala, através da expressão em *Escherichia coli*, para avaliar as suas funções mais detalhadamente. Para isso, realizamos diversos ensaios de atividade sob diferentes condições. O CBM quando combinado com uma preparação enzimática comercial (*Accellerase® 1500*) apresenta um efeito sinérgico que é dependente do pH e com uma ação mais proeminente na fração insolúvel da reação de hidrólise, o que pode indicar um papel desses módulos na amorfogênese dos substratos. Nós verificamos também que esse reforço da atividade hidrolítica das celulasas é dado em diferentes intensidades pelos diferentes CBMs, apesar dos mesmos apresentarem alta identidade sequencial e estrutural. Essas características podem estar relacionadas com a afinidade dos CBMs pelos substratos, propondo uma função de diminuição da inibição enzimática por interações improdutivas. Dessa forma, a adição de CBMs à preparados enzimáticos pode prover um método alternativo de redução na carga enzimática necessária para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, com direto impacto industrial.

Apoio Financeiro: FAPESP

6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE INTESTINO DELGADO DESCELULARIZADO COMO *SCAFFOLD* PARA ENGENHARIA DE TECIDOS.

CARANDINA, R.F.¹; RODRIGUES, M.A.M.²; NASCIMENTO, A.S.¹; ROSSI, M.C.¹; NETO, A.B.³; DEFFUNE, E.⁴; ZAMBUZZI, W.F.¹.

¹Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil; ³Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil; ⁴Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Tendo em vista resultados abaixo das expectativas com as inúmeras modalidades terapêuticas para o tratamento da Síndrome do Intestino Curto, a Engenharia de Tecidos vem sendo estudada com intuito de, um dia, beneficiar pacientes com perda dos órgãos gastrointestinais, proporcionando uma substituição de tecido com morfologia e função semelhante ao tecido nativo. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes protocolos de descелularização de intestino delgado de ratos Wistar, elegendo os mais eficazes na obtenção de *scaffolds* acelulares, os quais podem ser úteis na biofabricação deste órgão. Foram testados o deoxicolato de sódio (DS), o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e o Ácido Cítrico em diferentes concentrações e diferentes tempos de atuação. Posteriormente, avaliamos a integridade da matriz extracelular (MEC) remanescente e este parâmetro foi guiado por amostras de intestino delgado não descелularizado para as análises comparativas, servindo-nos como grupo controle. Nossos resultados mostraram que a criopreservação do intestino delgado a -80°C, seguida da imersão completa do órgão em solução de ácido cítrico (133g/100mL) em agitação moderada por 24 horas e posterior imersão em solução de SDS a 1% por uma hora também em agitação moderada, eficientemente removeu as células e foi melhor caracterizado. Este *scaffold* preservou a organização original da matriz extracelular. Nossos resultados concluíram que o protocolo usando Ácido Cítrico e SDS foi efetivo em obter *scaffolds* acelulares, os quais podem ser úteis para a Engenharia de Tecidos intestinal.

Apoio Financeiro: FAPESP

7. VARIABILIDADE GENÉTICA E ÉPOCAS DE COLHEITAS INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO NUTRACÊUTICA DE FRUTOS DE PIMENTÃO (*Capsicum annum* L.).

CORRÊA, C.V.¹; GOUVEIA, A.M.S.¹; MENDONÇA, V.Z.¹; EVANGELISTA, R.M.¹; CARDOSO, A.I.I.¹

¹Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP-Botucatu.

Na literatura existem vários estudos que relatam que o consumo de frutas e hortaliças contribui para a redução de incidências de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, inflamações, artrites, declínio do sistema imune, disfunção cerebral, diabetes, mal de Alzheimer entre tantas outras. No entanto, todas as propriedades nutraceuticas presentes em frutas e hortaliças são amplamente influenciadas por fatores genéticos, condições ambientais, manejo e sistema de produção. O pimentão caracteriza-se por ser uma olerícola de grande diversidade de formas e cores, sendo muito utilizado na culinária brasileira. Plantas de pimentão foram cultivadas na Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu. Foram estudados 64 tratamentos, sendo todos híbridos comerciais: Orangela, Sansão, Margarida, Platero, Eppo, Cida, Beti, Melina, Magali, Dahra, Anabell, Don Santino, Sócrates, Balico, Lucigno e Lussac e 4 épocas de colheitas, avaliados no delineamento em blocos ao acaso com 4 repetições. As análises bioquímicas foram realizadas no departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP). Três frutos imaturos por parcela foram lavados em água corrente e encaminhados para a realização das análises de carotenóides e antocianinas. Para os carotenóides foi observado efeito com interação significativa. Na primeira colheita o híbrido Lucigno foi o que apresentou maior valor de carotenóides ($6510,13 \mu\text{g g}^{-1}$). Nas demais colheitas não foram observadas diferenças significativas entre os híbridos avaliados. Em relação às épocas de colheitas ocorreram reduções drásticas nos teores de carotenóides, sendo os teores mais elevados foram encontrados na primeira colheita. Em relação às antocianinas o híbrido Balico foi o que apresentou as maiores concentrações ($3071,37 \mu\text{g g}^{-1}$) na primeira colheita. Na segunda colheita o híbrido de maior destaque foi o Don Santino. Não foi observada diferença entre os híbridos nas duas últimas colheitas. Para as épocas de colheitas a maior concentração de antocianinas foi observada na primeira colheita, reduzindo drasticamente nas demais colheitas. Tanto para os carotenóides como para as antocianinas foram observadas reduções em torno 90% nos seus teores entre a primeira e a última colheita. Desta forma, conclui-se que substâncias com características antioxidantes como os carotenóides e antocianinas, são influenciadas pelo genótipo e, principalmente, pelo estágio de desenvolvimento da cultura de pimentão.

Apoio Financeiro: Capes e CNPq

8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS PRÉ-TRATAMENTO POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS SEGUIDO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

ESPIRITO SANTO, M.C.¹; REZENDE, C.A.²; AZEVEDO, E.R.¹, GUIMARÃES, F.E.G.¹; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos - IFSC-USP – São Carlos; ²Instituto de Química – Unicamp – Campinas.

O emprego de resíduos agroindustriais, principalmente de usinas sucroalcooleiras destaca-se como uma alternativa para a produção de fontes renováveis de energia, em especial no Brasil o etanol de segunda geração oriundo do bagaço da cana-de-açúcar. Para facilitar a disponibilidade dos açúcares fermentescíveis desta biomassa, submete-se previamente o material a um pré-tratamento, com a finalidade de contribuir para susceptibilidade da celulose a ataques enzimáticos na etapa subsequente de hidrólise. No entanto, devido à complexidade das estruturas lignocelulósicas, uma melhor compreensão destes processos se faz necessária, a fim de torná-los mais eficientes e economicamente viáveis. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar por técnicas físico-químicas amostras de bagaço de cana de açúcar após o emprego de pré-tratamentos hidrotérmicos e organossolve (etanol 50%) em diferentes condições. Foi possível verificar a influência destes procedimentos na estrutura e composição da biomassa, bem como na hidrólise enzimática. Por meio da microscopia confocal pôde ser verificadas alterações na distribuição da lignina na parede celular decorrente de cada pré-tratamento através de características de fluorescência. O pré-tratamento hidrotérmico em nosso estudo apenas causou uma desordem no arranjo da lignina, sendo as mesmas removidas pelo pré-tratamento organossolve. O resultado desta mesma técnica física foi confirmado por análise da composição química via cromatografia líquida e por ressonância magnética nuclear do estado sólido. Ainda por microscopia eletrônica de varredura foi constatadas alterações morfológicas na superfície do bagaço após o pré-tratamento organossolve, tais como a perda de coesão entre as paredes das células vizinhas, bem como por alterações na estrutura da parede celular interna. Todos esses fatores contribuíram para a compreensão do resultado da etapa de hidrólise enzimática e explicou por que os tratamentos hidrotérmicos combinados com duração de 60 min a 160°C seguidos pelo passo organossolve por 150 min a 190°C resultou no aumento da eficiência de hidrólise enzimática, sendo 22% para o bagaço *in natura* contra 75% para o tratado. Com isto foi possível compreender a importância de se empregar técnicas físicas para investigação das alterações morfológicas e químicas resultantes dos pré-tratamentos e os seus efeitos sobre os resultados da hidrólise enzimática, podendo contribuir para otimizar todo o processo.

Apoio Financeiro: CAPES

9. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Bacillus licheniformis*.

EVANGELISTA, D.E.¹; BERNARDES, A.¹; KADOWAKI, M.A.S.¹; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP, São Carlos, SP.

Dentre os polímeros estruturais da parede celular vegetal, a pectina é o principal constituinte da lamela média. Esse polissacarídeo heterogêneo é caracterizado por uma longa cadeia principal de ácidos galacturônicos (AGal) associados em série via ligações glicosídicas α -1,4. Essas ligações são quebradas pela ação de pectinases do tipo despolimerases, tal como a exo-poligalacturonase (Exo-PG) que age sequencialmente sobre a cadeia principal a partir de extremidades não redutoras, liberando monômeros ou dímeros de ácidos galacturônicos. As pectinases têm ampla aplicação nas indústrias de alimentos, biocombustíveis e demais setores biotecnológicos, revelando uma constante busca pela identificação e caracterização de novas enzimas. Considerando a importância econômica das pectinases, neste trabalho foi clonada, expressa, purificada e bioquimicamente caracterizada uma Exo-PG de *Bacillus licheniformis*. O estado oligomérico da proteína foi determinado por gel filtração com uso da coluna SuperdexTM 200 prep grade 16/60 (GE) e também por gel nativo através do kit Phastgel Gradient (8-25 gradient) e o sistema de eletroforese PhastSystem (GE). A atividade enzimática foi medida pela quantificação dos açúcares redutores liberados, usando o método DNS e uma curva padrão de monômeros de AGal. O padrão de clivagem da enzima foi determinado tanto por TLC quanto por HPAEC (ICS-5000, Dionex) utilizando um padrão contendo mono e trímeros de AGal (Sigma). A avaliação da estabilidade térmica da estrutura quaternária e terciária da proteína frente à variação de pH foi realizada por ThermoFluor usando a sonda fluorescente SYPRO Orange dye (Invitrogen) e leitura em absorvância de 490/530 nm para excitação/emissão realizada pelo equipamento iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Biorad). Os dados revelaram uma enzima dimérica com atividade ótima em pH 6,5 e temperatura próxima à 60°C e considerável estabilidade entre os pHs 5 e 10 e também em elevadas temperaturas. Após incubação da enzima por 30 min nos pHs de 6-10, nenhuma perda da atividade original foi detectada. Em ensaios de termoestabilidade a 50°C, a enzima manteve atividade residual acima de 80% após 15 h de incubação. Estudos cinéticos mostraram especificidade por pectina não esterificada com $V_{max} = 4,18 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $K_m = 3,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $K_{cat} = 2,58 \text{ s}^{-1}$; e o padrão de hidrólise apresentou monômeros de ácido galacturônico como único produto gerado pela ação enzimática.

Apoio Financeiro: CAPES e FAPESP.

10. COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE APLICAÇÃO DO TESTE RESPIRATÓRIO COM ISÓTOPO ESTÁVEL DO CARBONO-13 PARA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO EM INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS.

FACCIN, P.C.¹; GARCIA, B.O.¹; PEREZ, G.G.¹; RAVELLI, M.N.²; COSTA, V.E.¹.

¹Centro de Isótopos Estáveis - Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP;

²Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

No processo de digestão, o esvaziamento gástrico (GE) é um passo importante para a assimilação de nutrientes; alterações no trânsito gastrointestinal podem dificultar o aproveitamento completo dos alimentos ingeridos. Embora a cintilografia com o radioisótopo Tecnécio-99m, seja o padrão ouro para diagnosticar anormalidades no tempo de GE, a sua aplicação tem restrições devido à exposição à radiação. O teste respiratório (BT) que utiliza o substrato marcado com o isótopo estável do carbono-13 (¹³C) como a [¹³C]-*Spirulina platensis* (¹³C-SpBT) ou o [¹³C]-Octanoato (¹³C-OBT), é um diagnóstico não invasivo e não radioativo que apresenta boa precisão e pode ser utilizado em crianças e gestantes. O objetivo deste estudo é comparar se o ¹³C-SpBT e o ¹³C-OBT possuem a mesma praticidade e eficiência no diagnóstico do GE em indivíduos eutróficos e obesos. Participarão da pesquisa 30 voluntárias do sexo feminino com idade entre 20 e 45 anos, sendo 15 eutróficas e 15 obesas grau III. Serão realizados os exames de cintilografia e o ¹³C-SpBT simultaneamente e, em outro momento, o ¹³C-OBT. Após jejum mínimo de 8 h, cada indivíduo receberá uma refeição nutricionalmente balanceada e padronizada, marcada com [¹³C]-*Spirulina platensis* para o ¹³C-SpBT e Estanho coloidal-99mTc para a cintilografia, ou com [¹³C]-Octanoato para o ¹³C-OBT. As imagens cintilográficas serão realizadas imediatamente e a cada 1h, durante 4 h, e as coletas de sopro em 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 minutos após a refeição, e analisadas pelo ABCA-IRMS. Serão aplicados questionários de informações gerais e coletados dados antropométricos. As hipóteses do estudo em andamento são que o ¹³C-OBT e o ¹³C-SpBT possuem a mesma praticidade e eficiência no diagnóstico de anormalidades no tempo de esvaziamento gástrico de sólidos quanto à cintilografia e que os mesmos protocolo de aplicação do ¹³C-OBT e do ¹³C-SpBT podem ser utilizados em indivíduos eutróficos e obesos.

11. CARACTERIZAÇÃO E ESTRUTURA DE BAIXA RESOLUÇÃO DE UMA ESTERASE TERMOESTÁVEL DE *Pyrococcus furiosus* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

GANDIN, C.A.¹; MANDELLI, F.²; GONÇALVES, T.A.^{2,3}; SQUINA, F.M.²; OLIVEIRA NETO, M.¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; ²Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brasil, ³Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), Campinas, SP, Brasil

Enzimas lipolíticas, como as lipases e as esterases, são atrativas para aplicações em indústrias óleo-químicas, indústrias de papel, detergentes, e na produção de ésteres aromáticos. Estas enzimas podem ser usadas como catalisadores em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Análises estruturais aliadas a ensaios de atividade são essenciais para o aprimoramento de processos industriais. Sendo assim, Visamos determinar a temperatura e o pH ótimos para a atividade da esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus* (PfEst), além de determinarmos a estrutura de baixa resolução e o estado oligomérico da enzima em diferentes temperaturas e concentrações. A estabilidade em diferentes pHs foi determinada medindo a atividade enzimática em diferentes tampões (com pHs variando entre 2.5 e 10.5) por 30 minutos a 80 oC. A estabilidade térmica foi estimada medindo a atividade residual da enzima em temperaturas entre 55 oC e 100 oC, em tampão sódio-acetato. Ambos ensaios foram conduzidos usando α -naftilacetato e α -naftilbutirato como substratos. Dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram coletados na linha de luz SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEM) a 20 oC e a 80 oC, a 1, 2 e 5 mg/mL. Tratamento dos dados e modelagem 'ab initio' foram conduzidas com o pacote ATSAS. A massa molecular e o estado oligomérico foram estimados utilizando o programa SAXSMoW. Ensaio de pH demonstraram que a PfEst obteve seu máximo de atividade no pH 7.0 para α -naftilacetato e pH 6.5 para α -naftilbutirato. Nos ensaios térmicos o máximo de atividade foi observado em 80 oC para ambos os substratos. Dados de SAXS demonstraram uma tendência de oligomerização com a diminuição da temperatura e com o aumento da concentração. A 80 oC, temperatura coincidente com a de máxima atividade, observou-se monômeros em solução, já a 20 oC observou-se dímeros e tetrâmeros, indicando que a ação da enzima está intimamente ligada ao seu estado monomérico. O modelo de baixa resolução foi construído à partir da curva de SAXS e comparado ao modelo homólogo ao PDB id: 1JFF (27 % de identidade sequencial). Os resultados obtidos trazem informações importantes acerca da atividade da PfEst que podem gerar novas metodologias tecnológicas-industriais, otimizando e diminuindo o custo de processos biotecnológicos.

Apoio Financeiro: CNPq

12. CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA CELULASE DA FAMÍLIA GH5 DO FUNGO ENDOFÍTICO *Chaetomium globosum*.

GODOY, M.O.¹; KADOWAKI, M.A.S.¹; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos-USP-São Carlos.

O crescente consumo energético mundial gera uma demanda por combustíveis renováveis e por novas tecnologias. No Brasil, o combustível renovável mais utilizado é o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar. Esse combustível é prioritariamente produzido a partir da fermentação do caldo da cana, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas que utilizem além do caldo, o bagaço na produção do etanol. A hidrólise enzimática da biomassa é uma importante via de obtenção de açúcares fermentáveis. Dentre essas enzimas destacam-se as Hidrolases de Glicosídeos (GH), principalmente as celulases, capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 da celulose. Estas são tradicionalmente classificadas como endoglucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases e β -glicosidases de acordo com seu mecanismo de ação. Contudo torna-se necessária a descoberta de novas enzimas capazes de converter a biomassa de forma mais rápida e eficiente. Neste estudo investigou-se a ação da enzima GH da família 5 de *Chaetomium globosum*. Essa enzima foi clonada e expressa de forma recombinante no fungo hospedeiro *Aspergillus nidulans* (A773), e purificada utilizando três etapas de cromatografia. Sua identidade foi confirmada por MALDI-TOF/MS. Ensaio enzimáticos foram realizados através da quantificação dos açúcares redutores liberados pelo método DNS. Esses ensaios revelaram a temperatura e pH ótimos da enzima como 60°C e 6,5 respectivamente. A enzima mostrou preferência por substratos do tipo β -glucano e liquenano e manteve sua atividade a 50°C por mais de 72h. A análise do padrão de clivagem por cromatografia de camada delgada (TLC) mostrou a formação de 44,33% (+-3,11), celobiose (G2), 37,36% (+-1,96) celotriose (G3) e 18,29% (+-1,93) celotetraose (G4) utilizando celulose amorfa (PASC) como substrato. Estes resultados sugerem um mecanismo de ação do tipo endoglucanase com a formação apenas de oligos solúveis também apontados pelos experimentos de açúcares redutores solúveis/insolúveis (85,6% (\pm 11,9) de açúcares solúveis formados). Esse estudo descreveu uma nova endocelulase capaz de produzir somente oligosacarídeos solúveis e com baixo grau de polimerização com potencial aplicação na degradação de biomassa.

Apoio Financeiro: CNPq, FAPESP e CAPES.

13. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Pycnoporus sanguineus* EM BIOMASSA DE SORGO.

HERNANDES, M.P.¹; NEGRÃO, D.R.¹; NABAŽAITĖ, R.²; NETO, M.O.³; LEÃO, A.L.¹

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP); ²University of Edinburgh, Edimburgo, Reino Unido; ³Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP).

Sorgo é uma planta de rápido crescimento, elevada concentração de açúcares fermentescíveis em níveis similares ao cana-de-açúcar sendo, portanto, uma biomassa promissora que pode ser utilizada para a produção de etanol de segunda geração. *Pycnoporus sanguineus* é uma espécie de fungo cosmopolita, facilmente reconhecida por sua coloração laranja-avermelhado. Este basidiomiceto possui elevada habilidade de degradar materiais lignocelulósicos que se reflete no seu potencial biotecnológico. A lignina é o componente mais difícil de ser degradado e sua presença é uma grande barreira na produção de etanol celulósico. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção das enzimas ligninolíticas lacases, peroxidases e manganês peroxidase (MnP), produzidas por *P. sanguineus* durante fermentação em estado sólido em biomassa de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*). O inóculo foi preparado em 1 g de sorgo (umidade 63%), autoclavado a 120°C durante 15 minutos, e incubado a 30°C durante uma semana. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 150 mL contendo 9 g de biomassa de sorgo autoclavado. A incubação deu-se a 30°C durante o período máximo de 28 dias; análises da atividade enzimática foram feitas a cada sete dias. Neste momento, 50 mL de água destilada autoclavada foram adicionados ao sorgo colonizado pelo fungo, sendo o pH e as atividades das enzimas medidos imediatamente. O pH do extrato do sorgo biodegradado apresentou aumento gradual, de 4,5 para 5,1 ao longo de 28 dias, assim como aumento da massa, em função da produção da biomassa fúngica. O pico de atividade da lacase ocorreu no 28º dia (11,8 UI L⁻¹); elevada atividade da peroxidase foi detectada no 14º dia (5,8 UI L⁻¹) e a atividade de MnP foi maior no 14º e 21º dias, respectivamente (28,7 e 35,4 UI L⁻¹). Dentre as três enzimas ligninolíticas avaliadas, MnP teve maior atividade detectada. No geral, *P. sanguineus* produziu enzimas ligninolíticas que possuem elevada capacidade de remover gradualmente a lignina da biomassa de sorgo, indicando uso promissor em processos de biopolpação e na produção de etanol celulósico a partir do sorgo sacarino.

Apoio Financeiro: CNPq

14. A RELAÇÃO ENTRE MASSA, VOLUME E DENSIDADE NA MATÉRIA SECA FOLIAR DE PLANTAS AGRÍCOLAS E FLORESTAIS.

JIM, A.S.¹; FRAGOSO, A.M.¹; ROBIN, C.²; GUERRINI, I.A.¹; ZIMBACK, L.³; GONDAK, M.O.¹

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP-Botucatu; ²University of Northampton, England; ³Instituto Florestal, Avaré-SP.

Há uma intrínseca relação entre a densidade, a massa e o volume na matéria seca foliar de uma planta. Desta forma, pode-se dispor a massa ou o volume resultante de uma equação de nitrogênio ou de fósforo à partir da matéria seca foliar de espécies agrícolas ou florestais. Poder-se-ia utilizar outros nutrientes, contudo seria preciso colocar em uma equação linear apenas um nutriente onde ocorra o efeito de diluição, caracterizado pela diminuição da sua concentração em matéria seca foliar com o passar do tempo (idade do vegetal). Para que possamos obter a concentração específica em cada tempo (ano ou semestre), por exemplo, devem ser coletadas amostras no menor intervalo de tempo possível. O objetivo deste projeto foi mostrar como se poderia obter a relação entre nutrientes nitrogênio ou fósforo foliares com massa/densidade/volume em espécies agrícolas ou florestais. Têm-se os seguintes parâmetros, Densidade = Massa/Volume, portanto, Volume x Densidade = {Y [Massa] = ax (Nitrogênio ou Fósforo na matéria seca) + b} ou Massa / Densidade = {Y [Volume] = ax (Nitrogênio ou Fósforo na matéria seca) + b}, obtido a partir de x = (x1, x2, ... xn, em g.kg⁻¹ do nutriente na folha) e y = {y1, y2, ... yn, em ton.ha⁻¹/planta ou m³ respectivamente), massa (ton.ha⁻¹), densidade (ton.ha⁻¹ / m³) e volume (m³). O modelo proposto, apesar de se tratar de uma relação indireta, pode gerar os parâmetros com uma margem de aproximação, comparando-se a fórmula às condições reais. Deve-se aplicar um fator de ajuste para que se obtenha o valor real por meio do observado via fórmula. Este método tem como vantagem a não necessidade de corte da planta para obter os resultados. São necessários padrões de amostragens foliares, considerando-se que influências de fatores abióticos e bióticos podem afetar os resultados durante o desenvolvimento da planta. Pode-se conceber a ideia de um equipamento que permita a análise no campo e obtenha parâmetros das equações, calibrados para cada situação. O modelo só é válido no intervalo, idade-nutriente, concentração do nutriente, massa ou volume no período de diluição. Por se tratar de um modelo teórico, existe a necessidade de validação com dados de campo.

Apoio Financeiro: Capes

15. EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA OXIDATIVO CELOBIOSE DESIDROGENASE/MONOOXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO (CDH-LPMO) DO FUNGO TERMOFÍLICO *Myceliophthora thermophila*.

KADOWAKI, M.A.S.¹; ORTIZ, M.O.¹; PRADE, R.A.²; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos-USP-São Carlos; ²Departamento de Microbiologia e Genética Molecular. Oklahoma State University. Stillwater-OK-USA.

Polímeros lignocelulósicos são uma fonte massiva e renovável para a produção de biocombustíveis e derivados químicos. Contudo a degradação enzimática desta biomassa em açúcares fermentescíveis constitui ainda um processo recalcitrante. O alto custo dos preparados enzimáticos comerciais (coquetéis) também é um passo limitante para este processo, tornando a descoberta de novas enzimas um desafio necessário. Enzimas com mecanismo oxidativo como monooxigenases líticas de polissacarídeo (LPMO) e celobiose desidrogenase (CDH) foram recentemente descritas como impulsionadoras da atividade de enzimas hidrolíticas (celulases). LPMOs são enzimas que utilizam oxigênio molecular para oxidar diretamente a celulose, no C-1, C-4 ou ambos, levando à quebra de ligações glicosídicas e aumentando o acesso das celulases à biomassa. Esta enzima pode constantemente receber elétrons da enzima bi-modular Cdh que oxida celobiose a ácido celobiônico. Fungos termofílicos como *Myceliophthora thermophila* são capazes de secretar enzimas com atividade hidrolítica e oxidativa, constituindo uma fonte de exploração para produção de sistemas de ação mixta. O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar e caracterizar enzimaticamente o sistema oxidativo CDH-LPMO assim como explorar brevemente a transferência de elétrons entre as duas enzimas. As proteínas foram expressas individualmente utilizando como hospedeiro o fungo *Aspergillus nidulans*. Os produtos diretos de oxidação foram detectados utilizando as técnicas de espectrometria de massas (MALDI TOF/MS) e cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD). A transferência de elétrons foi seguida pela análise do espectro de absorvância na região do UV-visível dos estados reduzido/oxidado de cada enzima. A LPMO purificada neste estudo gerou oligossacarídeos oxidados com grau de polimerização entre 2 e 6 (DP2-6*) em um intervalo de retenção na coluna de 20-26 min, característico de carboidratos do tipo δ -lactona. Este padrão classifica esta enzima como uma monooxigenase específica do C-1 de polissacarídeos confirmado também por dados de espectrometria de massas. CdhA foi também capaz de transferir elétrons para a LPMO somente na sua forma intacta, mostrando a importância do linker no posicionamento correto dos domínios flavina e heme. Assim, este trabalho foi capaz de expressar enzimas ativas e capazes de oxidar biomassa celulósica utilizando mecanismos de transferência de elétrons.

Apoio Financeiro: FAPESP e CAPES.

16. DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZANDO BIOCSENSOR BASEADO EM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO MODIFICADO COM LACASE.

KOHORI, N.A.¹; CAMARGO, J.P.C.²; SILVA, M.K.L.¹; CESARINO, I.¹

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP-Botucatu; ²Instituto de Biociências – UNESP-Botucatu.

Nos últimos 30 anos, diversas pesquisas sobre a utilização de enzimas em bioeletrocatalise têm sido realizada. No entanto, apesar do considerável número de publicações disponíveis sobre o assunto, há poucos estudos sobre o comportamento eletroquímico de enzimas imobilizadas na superfície de eletrodos não modificados. Uma estratégia recente para imobilização de enzimas é a preparação de superfícies contendo materiais a base de carbono capaz de facilitar a imobilização eficiente de biomoléculas. Nesse contexto, filmes formados por óxido de grafeno reduzido (rGO) foram avaliados na imobilização da enzima lacase para detecção eletroquímica de dopamina. O objetivo do trabalho foi sintetizar, caracterizar e aplicar o biossensor eletroquímico baseado no compósito rGO imobilizado com a enzima lacase (Lac) na determinação de dopamina em fluidos biológicos. O compósito rGO e rGO/Lac foram gotejados na superfície do eletrodo de Carbono Vítreo (GC), previamente limpo e polido, utilizando voltametria cíclica (CV) para otimização do rGO, lacase e caracterização da modificação dos eletrodos. Foi preparado uma solução contendo 1 mL de água ultra-pura, 0,3 mg rGO, sonicado por um hora e adicionado 0,3 mg de lacase. Foram gotejados 10 µL dessa solução no eletrodo, seguido de secagem. A caracterização eletroquímica do eletrodo de GC/rGO-Lac foi realizada em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 7 contendo 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de dopamina, e comparada com o eletrodo de GC sem modificação. Observou-se que o biossensor apresentou um aumento da área superficial e gerou um incremento de três vezes tanto nas correntes de pico anódica quanto catódica. O processo de imobilização da enzima lacase junto ao composto rGO foi aplicado com sucesso sobre o eletrodo de GC. Através da Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), esta configuração do eletrodo apresentou um melhor sinal de resposta analítica em relação aos eletrodos de GC e GC/rGO, utilizando a mesma concentração do substrato dopamina. Sem requerer ao uso de mediadores redox ou agentes de reticulação (gluteraldeído), o biossensor revelou-se promissor para detecção de dopamina, conforme resultados obtidos em tampão fosfato (PBS). O biossensor apresentou um ganho de sensibilidade devido a presença da enzima lacase, que leva a soma dos processos de redução da dopamina-o-quinona formada a partir de etapas química e eletroquímica. Sem requerer ao uso de mediadores redox ou agentes de reticulação, o biossensor revelou-se promissor, conforme resultados obtidos em tampão fosfato (PBS), urina sintética e plasma sanguíneo sintético.

Apoio Financeiro: FAPESP

17. METATRANSCRIPTOMA DE UMA COMPOSTAGEM ENRIQUECIDA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: EXPLORAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.

MELLO, B.L.¹; ALESSI, A.M.²; GUIMARAES, F.E.G.¹; RIAÑO-PACHÓN, D.M.³; MCQUEEN-MASON, S.²; BRUCE, N.C.²; POLIKARPOV, I.¹

¹Instituto de Física de São Carlos - USP; ²Department of Biology - University of York;

³Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CNPEM

A utilização de resíduos agrícolas para a produção de energia se mostra uma solução promissora para reduzir nossa dependência em combustíveis fósseis. Na natureza, comunidades microbianas degradam eficientemente a biomassa de plantas, sendo que para acessar as funções metabólicas empregadas, o sequenciamento do metatranscriptoma tem sido recentemente utilizado. Entretanto, a desconstrução da lignocelulose ainda é um desafio para a indústria já que o substrato se mostra de difícil degradação pelas enzimas comercialmente disponíveis, aumentando o preço do combustível produzido. Estudos do metatranscriptoma dessas comunidades irão revelar enzimas desconhecidas e novas funções que podem facilitar a conversão da lignocelulose na indústria. Neste estudo, a comunidade microbiana de uma compostagem foi crescida em meio mínimo suplementado com bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono. A degradação do substrato foi monitorada e o metatranscriptoma foi montado, anotado e genes alvo foram selecionados e caracterizados. Os resultados confirmaram a habilidade da comunidade em degradar o substrato, o que foi realizado por múltiplas espécies, com uma inesperada crescente participação de eucariotos. A expressão de genes da biblioteca revelou atividades biotecnologicamente interessantes. Este estudo demonstra o potencial metabólico de consórcios adaptados a ambientes ricos em lignocelulose, abrindo diversas possibilidades para estudos adicionais.

Apoio Financeiro: FAPESP

18. FOSFOPROTEOMA REVELA ENVOLVIMENTO CRÍTICO NA SINALIZAÇÃO DE JAK-STAT NA RESISTÊNCIA QUÍMICA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

NASCIMENTO, A.S.¹; FERREIRA, M.R.¹; FERNANDES, C.J.C.¹; ROSSI, M.C.¹; CARANDINA, R.F.¹; ZAMBUZZI, W.F.¹

¹Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum no mundo, sendo responsável por 25% dos casos de câncer e por 15% das mortes por câncer entre as mulheres. O tratamento é geralmente longo e as células tumorais adquirem resistência contra o tratamento à quimioterapia. Neste sentido, faz-se necessário entender a identidade molecular deste processo com o intuito de propor tratamento mais eficaz. Nosso principal objetivo foi realizar o fosfoproteoma das células resistentes a fim de identificar potenciais biomarcadores deste fenótipo. As células MCF7^{ADR-res} foram cultivadas na presença de DaunorrubicinaTM, a fim de manter o fenótipo resistente. A análise de fosfoproteoma das células MCF-7 (controle) e MCF7^{ADR-res} foi feita por meio de *Pepchip array* e posteriormente os resultados foram validados por meio de *Western Blotting*. Como o fosfoproteoma mostrou a proteína JAK como um potencial biomarcador deste evento, decidimos validar este resultado tratando as células com um inibidor de JAK (5 e 10 mM) antes de tratá-las com a DaunorrubicinaTM. Os resultados indicaram o envolvimento da via de sinalização da JAK-STAT e a diferença na atividade das isoformas de PKC no processo de resistência de células cancerosas de mama. Não obstante, mostramos a ativação de ERK, Ras e um aumento da expressão de MMP-9. A partir disto, decidimos avaliar a resposta das células resistentes à quimioterapia associada a um inibidor de JAK-2 e os nossos resultados demonstraram claramente que, inibindo JAK-2, as células MCF7^{ADR-res} se tornam mais sensíveis à DaunorrubicinaTM, aumentando a taxa de morte celular frente à resposta quimioterápica. Com base nestes resultados, concluímos que a ativação do JAK-STAT é um dos eventos responsáveis pela aquisição do fenótipo de resistência das células de câncer de mama. Assim, estes dados indicam o potencial desenvolvimento de inibidores de JAK-2 como uma estratégia para o tratamento de pacientes que não respondem a terapias convencionais.

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES

19. DECONTAMINATION OF OILED SOIL INTO CBA-W-SEDIMENTS BY USING BIOCELLS.

ORTEGA, L.R.Z.¹; COVARRUBIAS, M.R.¹

¹Gabriel René Moreno Autonomous University, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Improper handling of hazardous materials and waste generated worldwide is a problem of contamination of soil, air and water. Among the most severe contamination highlights, extraction and handling of oil or all oil producing countries has been occurring worldwide. In Bolivia, the transport of oil and its derivatives has been affected considerably over the past 18 years, due to the permanent demand that cause problems in the activities of pipelines and oil facilities. On the floor, hydrocarbons prevent the gas exchange with the atmosphere, initiating a series of physical processes - simultaneous chemical as evaporation and penetration. Depending on the type of hydrocarbon, temperature, humidity, soil texture, the quantities leak can be more or less slow, resulting in greater toxicity as well as having a moderate, high or extreme salinity, preventing treatment. High salinity gradients can destroy the protein tertiary structure, enzymes denature and dehydrate cells, which is lethal to many microorganisms used for water treatment and contaminated soils. In this review, bioremediation as a healthy alternative to progressive deterioration of environmental quality by shedding crude was analyzed, since this problem generates a real public health threat, as well as the extinction of large numbers of plant and animal species.

20. MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA ÁGUA DE FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS.

PINTO, L.M.C.¹; SILVA, E.T.¹; COSTA, V.E.¹

¹Centro de Isótopos Estáveis - UNESP - Botucatu.

Análise de fluidos biológicos (urina e plasma) em espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) requer a extração da água das amostras. Esse tratamento evita que moléculas sólidas afetem o resultado da análise, além de evitar problemas de ordem prática (e.g. entupimento da agulha de injeção). A técnica comumente utilizada é a destilação. Porém, métodos de destilação já descritos utilizam altas temperaturas, aumentando o risco de acidentes e os gastos de energia. Aqui, validamos um método de destilação criogênica a vácuo que não necessita temperaturas elevadas. O aparato, com capacidade para até dez destilações simultâneas de 1,5 mL, consiste em um sistema fechado com: duas bombas, que mantêm o alto-vácuo ($p = 10^{-2}$ mbar) durante a extração, duas flautas de vidro contendo cinco bocais, cada, e um cilindro de gás nitrogênio ultrapuro (N_2), que remove o ar restante no sistema para evitar contaminações. Os bocais têm saída dupla para acoplamento da amostra bruta e do frasco coletor. O frasco coletor é envolto em nitrogênio líquido (LN_2). No processo, a baixa pressão causa a evaporação da água das amostras, que serão capturadas nas armadilhas criogênicas de LN_2 ($-196^\circ C$). Após 20 min, removemos o LN_2 para o descongelamento das amostras resultantes. Essas são, então, devidamente armazenadas até a análise. Para evitar que a água congele antes da evaporação ocorrer, colocamos béqueres com água a temperatura ambiente envolvendo as amostras. Testamos a eficácia da extração medindo, com condutivímetro de bancada, a condutividade [$\mu S\ cm^{-1}$] de amostras ($n = 2$; 20 mL) destiladas e não destiladas, de água de torneira (AT) e água mineral comercial (AM). Em teoria, a destilação reduz a presença de íons na água, acarretando uma redução em sua condutividade. Ambas as fontes de água apresentaram redução de mais de 90% de condutividade em resposta ao processo de extração. Medimos a composição isotópica de oxigênio ($\delta^{18}O$ [‰]) de amostras AT ($n = 10$; 1,5 mL), destiladas e não destiladas, em IRMS, com erro analítico de 0,5‰. A correlação entre os resultados foi testada pelo teste t (intervalo de confiança de 95%). Valores de $\delta^{18}O$ de amostras destiladas e não destiladas não diferiram entre si ($p = 0,232$). O método de destilação é eficiente em extrair, em curto tempo, volume suficiente de água de fluidos biológicos para análise de isótopos estáveis, uma vez que as amostras tratadas não apresentaram fracionamento isotópico. Portanto, ressaltando ser desnecessário o aquecimento das amostras, verificamos que o método possui melhores condições de segurança e demanda menos energia.

Apoio Financeiro: CAPES.

21. ROTINAS NO PREPROCESSAMENTO DOS DADOS E CONTROLE DE QUALIDADE NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM ANÁLISE PROTEÔMICA CLÍNICA LABEL FREE.

PONTES, L.G.²; CAVASSAN, N.R.V.²; FERREIRA, C.S.T.²; MIOT, H.A.³; SANTOS, L.D.¹

¹Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), UNESP, Botucatu, SP; ²Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP; ³Departamento de Dermatologia e Radiologia – Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP.

Proteômica clínica tem potencial exploratório na identificação de biomarcadores para diagnóstico e compreensão da expressão diferencial ou correlata de proteínas que revelam processos fisiopatológicos. Neste contexto, a validação de proteínas a partir de espectrometria de massas envolve a análise simultânea de grande número de proteínas, e de etapas de sua execução. O objetivo deste estudo foi propor uma rotina de processamento dos dados de espectrometria de massas adquiridos a partir de análises *label free* pela estratégia *shotgun*, a fim de validar marcadores moleculares. Estabelecemos procedimentos em três etapas: pré-analítica, que aborda assepsia, processamento, armazenamento, rastreamento da amostra, e quantificação de proteínas pelos métodos comparativos; analítica, que requer a manutenção do equipamento de espectrometria e a padronização dos métodos de aquisição dos dados; e, pós-analítica, que valida proteínas diferencialmente expressas, por meio de ensaios confirmatórios e rigorosa análise estatística. Previamente à identificação dos biomarcadores, devem-se realizar controle de qualidade e pré-processamento dos dados, disponíveis em contagens espectrais (e não concentração biológica), em número expressivo de variáveis (proteínas identificadas e seus clusters). Experimentos realizados em triplicata, podem apresentar diferenças nas medidas. A medida de tendência central interfere na magnitude dos valores por sofrer influência dos extremos. Proteínas pouco expressas na amostra (<30% dos casos) são de baixo potencial biomarcador, e devem ser excluídas da análise posterior. Outliers e valores ausentes de proteínas expressas em grande fração da amostra (>90% dos casos), devem ser revistos e imputados de acordo com o comportamento do grupo. Finalmente, casos devem ser analisados quanto ao padrão de expressão global de suas proteínas a partir de análise de componentes principais, para identificação de indivíduos fora do padrão do grupo. A exploração de biomarcadores individuais deve seguir o desempenho de classificadores como curva ROC, sensibilidade e especificidade. Posteriormente, deve-se proceder a centralização, escalonamento e normalização dos dados visando a exploração da coocorrência de proteínas nos grupos e o estudo de fenômenos fisiopatológicos. Padronizar as atividades de cada etapa, maximiza a preditividade dos potenciais marcadores moleculares frutos da expressão diferencial do processo biológico e não erros sistemáticos do pesquisador.

Apoio Financeiro: CAPES; FAPESP 2014/13277-6

22. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE *Brucella spp.* NO SORO DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)

PONTES, L.G.²; HAGA, G.S.I.⁴; ALMEIDA, B.S.³; ROCHA, F.R.³; LOSNAK, D.O.²; PEREIRA, V.B.R.³; JUNIOR, R.S.F.¹; BARRAVIERA, B.¹; SANTOS, L.D.¹

¹Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), UNESP, Botucatu, SP Brasil. Email: lucilene@cevap.unesp.br; ²Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP. Brasil; ³Instituto Adolfo Lutz, Bauru, SP. Brasil; ⁴Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA

As ferramentas atuais para o diagnóstico de brucelose em animais de grande porte são específicas para a detecção em bovinos, porém, adaptações tem sido realizadas para a sorologia em bubalinos. Neste contexto, foi avaliado a congruência/viabilidade de duas técnicas de PCR como ferramenta diagnóstica para a detecção de *Brucella spp.* no soro búfalo (*Bubalus bubalis*). Para este estudo, utilizou-se 40 amostras de soro de búfalos fêmeas com idades entre 24 a 60 meses do Vale do Ribeira - São Paulo, soropositivas pelo teste de Rosa Bengal e pela fixação do complemento (sorológico). A extração do DNA presente no soro destes animais foi realizada utilizando o kit de rotação Illustra® Mini Prep (GE Healthcare, Reino Unido). As reações de PCR foram realizadas na presença de dois pares de iniciadores de amplificação com diferentes regiões do genoma *Brucella*: 1) os iniciadores B4 (5-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3) e B5 (5-CGC TCG TGC CTT TCA GGT CTG-3), que amplificam um fragmento de 223 pb da proteína da membrana externa de 31 kDa (Baily et al., 1992). A primeira reação foi realizada com iniciadores B4 / B5 a uma temperatura de desnaturação de 95°C durante 2 min. Em seguida, 40 ciclos a 95°C durante 30s, 60°C durante 30s, e 72°C durante 30s e uma extensão final à 72°C durante 10 min. A segunda reação foi realizada também com os iniciadores B4/B5 a uma temperatura de desnaturação de 95°C durante 40 min, seguido por 55 ciclos a 95°C durante 30s, 72°C durante 60s, e 72°C durante 60s e uma extensão final a 72°C durante 10 min. Paralelamente, as 40 amostras de soro foram incubadas em ágar chocolate por 72 horas a 35-37° C em CO₂ para posterior extração do DNA e amplificação pelas duas técnicas de PCR já mencionadas. Foi utilizado como controle negativo da reação água ultrapura e como controle positivo soro contendo *B. abortus* na diluição 10-2 baseada na escala 1 de MacFarland, em 200 µL de soro. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v), corados com brometo de etídio e digitalizados. Como resultados, somente duas amostras foram positivas para a primeira reação realizada com iniciadores B4/B5. A análise estatística dos resultados obtidos nos dois grupos foram realizadas pelo emprego do teste t de Student, considerando como significativo p < 0,05; utilizando como ferramenta estatística o software Graphpad Stat®. Os resultados do presente estudo indicam que a primeira e a segunda reação de PCR não podem ser implementadas como um teste rápido para o diagnóstico de *Brucella spp.* em amostras de soro. No entanto, recomenda-se que avaliações com maior tempo de cultura, diferentes primers e ciclos para PCR sejam realizadas e validadas. Concluiu-se que, os métodos empregados neste estudo, para o diagnóstico de *Brucella spp.* no soro búfalo (*Bubalus bubalis*) contribuíram para futuras investigações.

23. LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E QUANTIFICAÇÃO METALÔMICA NO TRATAMENTO DE OSTEÓBLASTOS COM TITÂNIO COMERCIAL DE GRAU IV.

ROSSI, M.C.¹; BEZERRA, F.¹; NASCIMENTO, A.S.¹; CARANDINA, R.F.¹; CRULHAS, B.P.¹; ZAMBUZZI, W.F.¹

¹Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Sabe-se que o estresse oxidativo pode regular algumas funções celulares que são vitais para um bom funcionamento e osteointegração de materiais à base de titânio, tais como: diferenciação celular e mineralização de cálcio. Também é mostrado que os osteoblastos mostram uma preferência em se aderir em biomateriais que apresentam certa rugosidade em sua constituição, e que implantes à base de Titânio favorecem uma boa osteointegração e assim melhorar a qualidade de vida de pacientes sujeitos à cirurgia. Primeiramente, pela técnica de MEV verificou-se o efeito da rugosidade do implante na morfologia destas células perante sua pré-fixação. De maneira geral, os osteoblastos aderiram nas superfícies desse biomaterial demonstrando que a rugosidade desse substrato influencia de maneira positiva para sua fixação. Em seguida, analisou-se a composição química de determinados elementos de interesse (C e Ti) pelo método de EDX. Após, para determinar o papel do estresse oxidativo na manutenção da adaptação celular, mediu-se a quantidade de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) que as células liberam em diferentes intervalos de tempos, através do método de Voltametria Cíclica. Esse experimento mostrou que houve maior liberação de H_2O_2 no meio de cultura condicionado com o biomaterial de titânio, quando comparado ao grupo controle. Após essa constatação, usou-se a técnica de Espectrometria de absorção atômica, que verifica se houve ou não liberação de átomos de Titânio presente no meio de cultura e quanto haviam sido liberados (ng/ml). O resultado mostrou que houve a liberação desse elemento químico, o qual influenciou juntamente com as espécies reativas de oxigênio (ROS) na modulação da diferenciação de osteoblastos.

24. AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO INSETICIDA NOVALUROM EM LAGARTAS DO BICHO DA SEDA (*Bombyx mori*).

SANTORUM, M.¹; SANTOS, J.S.²; REIS, G.H.²; GUIMARÃES, A.T.B.²; BRANCALHÃO, R.M.C.²; SANTOS, D.C.¹

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu, SP;

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Cascavel, PR.

O Bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) é o lepidóptero mais utilizado na produção de seda e em estudos biotecnológicos. Se alimenta de folhas de amoreira e é altamente sensível a agrotóxicos. O uso de inseticidas em culturas circunvizinhas às plantações de amoreira, pode afetar a criação de *B. mori*, acarretando em desequilíbrio nas suas funções metabólicas, comprometendo a produção de casulo e levando a morte do inseto. Entre estes inseticidas destaca-se Novalurom, inibidor da síntese de quitina nos insetos e empregado no controle de insetos pragas de culturas próximas as plantações de amoreira. Objetivou-se avaliar os efeitos de Novalurom na sintomatologia e mortalidade em *B. mori*. Lagartas de *B. mori* foram separadas em 1 grupo controle e 5 grupos tratamento, onde cada grupo contou com 6 repetições de 20 lagartas cada. Após ecdise do 2º para o 3º instar, lagartas dos grupos tratamento foram alimentadas por 24 horas com folhas de amoreira tratadas com o inseticida nas concentrações de 0,003; 0,03; 0,3; 0,4 e 0,5 mL/L. A taxa de mortalidade, bem como sintomas manifestados pelas lagartas foram realizados a cada 24 h até um total de 240 h após exposição. As proporções de mortes em 240 h de exposição foram comparadas entre as concentrações por meio do teste de Qui Quadrado para k proporções, seguido do teste de acompanhamento de Marascuilo. Evidenciamos que o uso de diferentes concentrações de Novalurom causou efeitos tóxicos em *B. mori*, promovendo efeitos sub-letais e mortalidade nas lagartas. Ao avaliarmos as frequências de mortalidade acumuladas ao longo das 240 h de experimentação, verificou-se que as concentrações de 0,003 e 0,03 mL se mantiveram constantes durante o período, apresentando valores equivalentes a 17 – 23% e 7 – 8%, respectivamente, já nas concentrações de 0,3, 0,4 e 0,5 mL foram observadas frequências de mortalidade crescentes ao longo de todo o período atingindo, respectivamente, 83%, 79% e 82% em 240 h de exposição. No decorrer do período experimental, também foi possível verificar sintomas manifestados pelas lagartas dos tratamentos 0,3, 0,4 e 0,5 mL/L, as quais apresentaram rompimento no tegumento, completa cessação da alimentação, desenvolvimento tardio, ecdise incompleta e presença de excrementos em forma de rosário de contas. Portanto, Novalurom apresentou efeitos subletais e efeito dose-dependente causando maior mortalidade a medida que as concentrações se elevaram. Concluímos que a exposição ao Novalurom prejudica a criação de *B. mori*, afetando tanto a sericicultura, como sua aplicação em estudos biotecnológicos.

Apoio Financeiro: FAPESP

25. ELABORAÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTE DE LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*).

SESSO, A.S.^{1,2}; FERREIRA, R.S.J.^{1,2}

¹CEVAP - Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – UNESP – Botucatu;

²Faculdade de Medicina- UNESP- Botucatu.

O lobo-guará é um canídeo que existe exclusivamente na América do Sul. No Brasil, esta espécie encontra-se ameaçada de extinção, devido as ações antrópicas [1]. A utilização de células-tronco tem novas perspectivas ao tratamento em patologias e lesões, por apresentar a capacidade de diferenciação em variados padrões celulares e por diferenciar em múltiplos padrões celulares. Seu uso em terapia mostra grande tropismo para o local lesionado e gerencia o processo de cicatrização e reparação, pois secreta fatores de crescimento e citocinas [2]. O objetivo desse trabalho foi coletar a medula óssea e isolar as células tronco mesenquimais de lobo-guará, afim de estabelecer um banco de células tronco para a espécie. Foram anestesiados três animais, com cetamina, xilazina e midazolam. Os animais foram induzidos com propofol e mantidos sob anestesia inalatória. Com o animal em decúbito lateral foi introduzido uma agulha hipodérmica no osso ilíaco até atingir o canal medular, obtendo ao todo 30 mL de medula. O material foi levado ao laboratório, diluído em meio DMEN alta glicose e centrifugado em gradiente de ficoll. O anel de células mononucleares formado foi retirado, centrifugado e colocados em frascos de 25cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose e 20% de soro fetal bovino (SFB) contendo penicilina e estreptomicina. Os frascos foram mantidos em estufa de CO₂ durante 15 dias. Após o crescimento do tapete de células mesenquimais nos frascos, as células foram retiradas com tripsina e o procedimento se repetiu até a segunda passagem, aumentando o número de células. No término da segunda passagem as células foram contadas e congeladas com 90% SFB e 10% de DMSO. Ao todo foram 18 criotubos contendo 1 milhão de células em cada. Considerando a importância da conservação de *Chrysocyon brachyurus*, a iniciativa da criação de um banco de células permite gerar pesquisas, caracterização celular, clonagem de seu material genético, além de promover o tratamento clínico e cirúrgico desses animais de vida livre ou de cativeiro, aumentando as chances de sobrevivência da espécie. A técnica de cultivo e isolamento das células mesenquimais foram promissoras chegando no objetivo de sua obtenção, armazenamento e a formação de um banco de células tronco para a espécie.

Apoio Financeiro – CAPES

[1] Paula, R.C.; Médici, P.; Morato, R.G. Plano de ação para a conservação do Lobo-guará: análise de viabilidade populacional e de habitat. Brasília: IBAMA. 158p. 2008.

[2] Wu, X.; Ren, J.; Li, J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. v.14, p.555-62, 2012.

26. SÍNTESE DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE ANTIMÔNIO PARA DETECÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS.

SILVA, M.K.L.¹; CESARINO, I.¹

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP-Botucatu.

O óxido de grafeno (GO) é um composto que vem ganhando a atenção de pesquisadores na eletroquímica e eletroanalítica devido a sua extraordinária propriedade de transporte de elétrons, alta atividade eletrocatalítica e grande área superficial. Desde sua descoberta em 2004, várias publicações mostram sua grande aplicação em biossensores e produção de compósitos para determinação de diferentes poluentes ambientais. Em sua forma reduzida (rGO) é possível observar um aumento nas propriedades eletroquímicas do material. Quando modificado com nanopartículas metálicas, podemos observar melhora significativa nas propriedades analíticas do material como: aumento da corrente de resposta, excelente atividade eletrocatalítica e melhora no comportamento voltamétrico. O objetivo deste trabalho foi sintetizar um novo compósito de óxido de grafeno reduzido modificado com nanopartículas de antimônio (rGO-SbNPs) capaz de modificar o eletrodo de carbono vítreo (GC) para a detecção do antibiótico levofloxacina em amostras ambientais. A síntese do rGO foi realizada utilizando-se o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) como agente surfactante. Uma suspensão contendo uma proporção de 10:4 GO/SDS em 15 mL de etanol, juntamente com borohidreto de sódio foi sonicada durante 1 hora. Após etapas de limpeza, 0,025 mg de rGO foram dispersos em 1 mL de água ultrapura com 0,33 mg de cloreto de antimônio sob agitação magnética. Foram gotejados 10 µL do compósito rGO-SbNPs na superfície do eletrodo GC, e mantido em temperatura ambiente até a secagem. O comportamento eletroquímico do eletrodo GC/rGO-SbNPs foi observado por meio de uma Voltametria Cíclica em HCl 0,5 mol L⁻¹, na qual foi possível observar o pico de corrente anódica correspondente à oxidação do antimônio, mostrando assim sua modificação em relação ao eletrodo GC/rGO. Voltametrias de Pulso Diferencial (DPV) foram utilizadas para observar o comportamento eletroquímico da levofloxacina. Foi desenvolvido o estudo de pH, no qual foi possível observar que o novo eletrodo apresenta uma melhor resposta analítica em pH 3. O novo eletrodo modificado apresentou uma resposta analítica 190% maior em relação ao eletrodo GC com a mesma concentração de levofloxacina (2,5 µM). Sendo assim, o novo eletrodo modificado com rGO-SbNPs se mostrou muito eficaz para a determinação da levofloxacina em concentrações relativamente baixas do antibiótico. Podemos afirmar que o material é uma excelente ferramenta analítica para a determinação de poluentes ambientais.

Apoio Financeiro: FAPESP

27. PREPARO DE CELULOSE NANOCRISTALINA POR TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ENDOGLUCANASES.

SIQUEIRA, G.¹; ARANTES, V.¹

¹Laboratório de Biorrefino e Bioprodutos Renováveis – BBioPRO, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, USP.

Nanocelulose é um material renovável produzido a partir de biomassas vegetais. Os métodos convencionais de produção a partir de polpas celulósicas envolvem tratamentos mecânicos intensos para celulose nanofibrilada (CNF), ou hidrólise ácida severa, para celulose nanocristalina (CNC). Durante a produção de CNC, as regiões menos organizadas (amorfas) são hidrolisadas em taxas mais elevadas que os domínios cristalinos mais organizados, preservando parte destes na forma de nanocristais. Apesar de ser um conceito simples, a hidrólise ácida apresenta sérias desvantagens, como baixo rendimento e grande quantidade de água para remover o ácido residual dos cristais, limitando o escalonamento do processo. Alternativamente, tem sido proposto o uso de enzimas em um conceito mais ambientalmente amigável de produção de nanocristais baseado na maior especificidade das endoglucanases pelas regiões menos organizadas, o que resulta no enriquecimento da celulose em frações cristalinas. Nesse trabalho, foram comparadas as modificações resultantes do tratamento enzimático de polpa kraft de eucalipto com endoglucanases de diversas famílias com ou sem um tratamento mecânico prévio. Será discutida a cinética de hidrólise de cada uma das enzimas, bem como os produtos liberados. As características da fração sólida (composição química, distribuição do tamanho de partículas e dimensão lateral dos cristais de celulose) serão apresentadas. Finalmente, com base no perfil de hidrólise e nas propriedades dos resíduos cristalinos, será apresentada a combinação de enzimas de diferentes famílias como potencial catalisador no processo de produção de celulose nanocristalina.

Apoio Financeiro: FAPESP (2015/00397-3 e 2015/02862-5).

28. TEOR DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COOKIES PRODUZIDOS COM FARELO DE ARROZ.

SOUZA, C.B.¹; ALCARDE, C.G.²; ALCARDE, B.G.²; LIMA, G.P.P.³

¹Pós-Graduanda do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UNESP, Botucatu, SP; ² Curso de Nutrição do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP; ³Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP.

O farelo do arroz é um subproduto valioso da agroindústria brasileira, pois se origina das camadas externas do grão, contendo diversos nutrientes e compostos bioativos, principalmente com atividade antioxidante. Esses compostos fornecem diversos benefícios à saúde, como por exemplo, a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. No entanto, este farelo vem sendo subutilizado pois seu principal destino tem sido a alimentação animal. Para aumentar o consumo de produtos de origem vegetal, que sejam ricos em substâncias com potencial antioxidante, várias alternativas têm sido propostas, dentre as quais a produção de novos itens alimentícios que possam ter um valor nutricional superior ao alimento original. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo produzir biscoitos tipo cookies com farelo de arroz e verificar a capacidade antioxidante dos compostos bioativos. Todas as matérias-primas foram adquiridas no comércio local de Botucatu/SP, com exceção do farelo de arroz, que foi doado pela Indústria Grano Brasilis Ltda. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos: controle, 25%, 50%, 75% e 100% de substituição da farinha de arroz por farelo de arroz na formulação. O forneamento resultou em média 380 gramas de massa de cada tratamento. Esses cookies resfriaram naturalmente, foram macerados para formar amostras homogêneas de seus respectivos tratamentos, e em seguida, congelados sob temperatura de -80°C para serem analisados nos dias subsequentes. Foram verificados o teor de fenóis totais expressos em equivalentes de ácido gálico e capacidade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH. Os cookies cujas formulações continham maiores quantidades de farelo de arroz apresentaram teores maiores de fenóis totais. Os cookies controle apresentaram em média 0,207mg eq. ácido gálico/mg de amostra, com desvio padrão de 0,001, enquanto os cookies 100% farelo apresentaram em média 0,372mg eq. ácido gálico/mg de amostra com desvio padrão de 0,004. Os cookies cujas formulações continham maiores quantidades de farelo de arroz também apresentaram maior atividade antioxidante. Constatou-se que os cookies controle obtiveram 11,02% de atividade oxidante enquanto os cookies com 50% e 100% de farelo de arroz, obtiveram 19,58% e 33,27% respectivamente. Desta forma, os cookies formulados com farelo de arroz, resultaram em um produto com conteúdo de propriedades biologicamente ativas maior, que podem desempenhar muitos benefícios à saúde humana.

29. ELABORAÇÃO DE UM KIT PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE *Bacillus cereus*

TAKAHASHI, G.S.¹; BASSO, C.R.¹; PEDROSA, V.A.¹

¹Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, Câmpus de Botucatu

Sabe-se que a contaminação por bactérias durante a produção de alimentos tornou-se um problema mundial, para isso é necessário um diagnóstico rápido desde o ponto de partida até o produto final na indústria alimentícia. O nosso objetivo foi demonstrar um método rápido e simples de detectar *Bacillus cereus* utilizando nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas com anticorpo através do reconhecimento antígeno-anticorpo. Para a produção de AuNPs, foi aquecida 100 mL de solução de ácido cloroáurico (HAuCl₄) 1 mmol L⁻¹ sob agitação até ebulição, em seguida, adicionou-se 10 mL de citrato de sódio 39 mmol L⁻¹. Esta solução foi mantida sob agitação até atingir uma coloração vermelha intensa. Em seguida adicionou-se 10 µL de ácido mercaptoundecanóico 95% (MUA), esta solução foi agitada por 1 hora à temperatura ambiente. O último passo para preparar o conjugado de AuNPs é a adição de 200 µL da solução 1:1 de 0,1 mol L⁻¹ de N-hidroxissuccinimida (NHS) e 0,4 mol L⁻¹ de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) para formação de ligação coloidal com as amins dos anticorpos. O anticorpo policlonal para *B. cereus* (100µg/mL) foi imobilizado nas AuNPs e as culturas bacterianas foram fornecidas pelo departamento de microbiologia. As AuNPs foram monitoradas utilizando um espectrômetro UV-Vis, com os espectros variando o comprimento de onda de 400-800 nm com passo de 1 nm e velocidade de 500 nm/min. Os resultados obtidos pelo espectrômetro indicam que o máximo de absorção plasmônica das AuNPs é de 0.8 e comprimento de onda de 528 nm. Após a ativação com o EDC/NHS ocorreu um deslocamento de 106 nm e redução para 0,12 no pico de absorbância. Depois da conjugação com anticorpo, ocorreu um aumento no índice de refração local devido ao anticorpo e isto resulta em um pico de 0,07 e deslocamento de 12 nm no comprimento de onda. Após a adição e detecção da bactéria, o pico de absorbância foi de 0,03 e o comprimento de onda foi de 637 nm, com isso deslocando 9 nm no comprimento de onda e 0,04 no pico de absorbância. A diminuição do pico de absorbância e o deslocamento do comprimento de onda confirmam que toda superfície da nanopartícula está imobilizada com as modificações e, com isso, a luz do equipamento está sendo transmitida e não absorvida. Neste ensaio apresentamos uma metodologia de detecção universal para bactérias utilizando nanopartículas de ouro modificadas com anticorpo específico, abrindo uma nova possibilidade de diagnósticos, utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície localizada em nanopartículas de ouro modificadas.

Apoio Financeiro: FUNDIBIO

30. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO GRAFENO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E SUA APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS

VANZELA, H.C.¹; DEFAVARI, L.M.¹; CAMARGO, J.P.C.²; SILVA, M.K.L.²; CESARINO, I.²

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP-Botucatu; ²Instituto de Biociências – UNESP-Botucatu.

Materiais baseados em nanopartículas metálicas são amplamente utilizados em eletroanálise devido as suas características como grande área superficial, rápida transferência de elétrons, excelente condutividade e propriedades eletrocatalíticas. Particularmente, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm propriedades tais como compatibilidade biológica e condutividade, sendo atrativas na confecção de biossensores baseados em óxido de grafeno (GO) e AuNPs. A síntese do compósito rGO-AuNPs foi realizada utilizando-se uma suspensão contendo o GO/dodecilsulfato de sódio, etanol, boroidreto, acondicionado a 75°C para secagem. A modificação do eletrodo GC foi realizada pela deposição de 10 µL de uma suspensão contendo o compósito rGO-AuNPs e água. O eletrodo GC modificado com o compósito rGO/AuNPs foi seco a temperatura ambiente. A caracterização eletroquímica do eletrodo GC/rGO-AuNPs foi realizada utilizando-se voltametria cíclica (CV) em solução 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄, no intervalo de potencial de 0,0 a 1,8 V. O eletrodo compósito CG/rGO-AuNPs apresentou picos em +1,52 e +0,82 V correspondente a oxidação e redução do Au. Portanto, observou-se que as nanopartículas de Au foram incorporadas no suporte rGO. A síntese do compósito rGO-AuNPs foi otimizada utilizando-se CV no intervalo de -0,3 a +0,5 V vs. Ag/AgCl em solução de K₃[Fe(CN)₆], realizando-se quatro sínteses, nas quais, variou-se o volume da solução 0,5 mol L⁻¹ de HAuCl₄ a ser adicionado, e mantendo-se a quantidade da suspensão do GO. Observou-se que a maior corrente de pico anódica, foi obtida quando 25 µL da solução 0,5 mol L⁻¹ de HAuCl₄ foi adicionada na síntese do compósito. Portanto, esse valor foi considerado como valor ótimo e esta síntese do compósito rGO-AuNPs foi caracterizada morfológicamente.

Apoio Financeiro: FAPESP (processos 2015/02136-2 e 2015/17274-1), CNPq e PROPe-UNESP