ÁREA DE SUBMISSÃO

BIOTECNOLOGIA E BIOINFORMÁTICA



SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola*: POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO CONTRA LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA

Weslley Aparecido Vicente Luiz[1]; Niumaique Gonçalves da Silva[1]; Sabrina Aparecida Balsarini Marqueti[1]; Yara dos Santos Vieira Dias[1]; Marcos Elias da Silva Almeida[2]; Ingrid Cristine de Sousa Everton[2]; Luiz Henrique Santana Martins[3]; Alessandra Lourenço Cecchini[2]; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi[1].

[1] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia;
[2] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Imunologia, Parasitologia e Patologia;
[3] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral;

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação

Resumo: A radiação solar é um importante fator de risco para danos cutâneos e desenvolvimento do melanoma, uma neoplasia de elevada agressividade e mortalidade. Apesar dos avanços terapêuticos, o tratamento do melanoma avançado ainda apresenta limitações, estimulando a busca por novos agentes bioativos. Os soforolipídios, biossurfactantes da classe dos glicolipídios produzidos por *Starmerella bombicola* destacam-se por suas propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa. Estruturalmente, os soforolipídios são constituídos por uma unidade de soforose ligada a um ácido graxo hidroxilado e nas formas ácida e lactônica. Devido as suas propriedades os soforolipídios se destacam como compostos bioativos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o melanoma. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antiproliferativo dos soforolipídios de *S. bombicola* em células de melanoma murino da linhagem B16F10. A produção de soforolipídios ocorreu em biorreator de bancada, com volume operacional de 3,5 L, por 288 h, utilizando glicose e ácido oleico como fontes de carbono. A fermentação foi monitorada pelos consumos de glicose e ácido oleico, o pH, a biomassa e a produção de soforolipídios. Os soforolipídios foram extraídos no final do processo por extrações líquido-líquido. Os soforolipídios foram caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando coluna C18 e 1′,4″-soforolactona 6′,6″-diacetato como padrão analítico. A citotoxicidade foi avaliada pela determinação da concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC_{50}) da linhagem de melanoma murino B16F10, caracterizada por seu elevado potencial metastático. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina. Em seguida, foram tratadas com soforolipídios nas concentrações de 5 a 80 µg/mL por 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT), e as alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia óptica. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett, considerando $p < 0,05$. Produção de soforolipídios atingiu 71,93 g/L com 17,79 g/L de biomassa e consumo de 99,1% da glicose e 80,7% do ácido oleico, atingindo pH final de 2,5, pH ideal para a produção. A linhagem celular B16F10 apresentou um valor de CC_{50} de 63,16 µg/mL. Foi observado uma redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle à medida que a concentração de soforolipídios aumentou de 20 para 80 µg/mL, evidenciando um efeito dependente da concentração. Não foram observadas alterações morfológicas expressivas até 10 µg/mL, mantendo-se células predominantemente aderidas e fusiformes. A partir de 20 µg/mL, observaram-se redução da confluência e maior heterogeneidade celular. Em 40 e 60 µg/mL, houve maior arredondamento e retração celular, perda aparente de aderência, formação de espaços e alterações compatíveis com estresse celular. Na concentração de 80 µg/mL, observou-se expressiva redução da densidade celular, acompanhada de alterações morfológicas, como formato esférico, formação de vacúolos citoplasmáticos e descolamento celular. Os resultados indicam que os soforolipídios produzidos por *S.*

bombicola apresentam potencial antiproliferativo, reforçando seu potencial como fonte biotecnológica de compostos bioativos para futuras estratégias terapêuticas contra o melanoma.

Palavras-chave: Antitumoral; Biossurfactantes; Biodegradável; Câncer de pele.

Agradecimentos: À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Laboratório de Patologia Molecular e ao Laboratório de Materiais e Moléculas – LAMM.

Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES e à Fundação Araucária.

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* SUGEREM MORTE CELULAR DEPENDENTE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO MEDIADA PELA MODULAÇÃO DO CANAL TRPV2 EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM MISTURA CANABITERPENICA

Dimitri Alves da Costa[1]; Mattheus Pizane de Azevedo Silva[1]; Maria Claudia Terkelli de Assis[1]; Isaura Maria Fuzinatto[2]; Luiz Henrique Santana Martins[1]; Mariana Luiza Silva[3]; Matheus Felipe da Silva [1]; Luan Vitor Alves de Lima [1]; Camila Bernardes do Nascimento[4]; Henrique Esteves[4]; Mário Sérgio Mantovani[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Genética Toxicológica;
[2] Instituto Carlos Chagas / Fiocruz, Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional;
[3] Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais .
[4] Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Pesquisa em Moléculas Bioativas.

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação.

Resumo: O câncer de mama é a neoplasia de maior incidência e mortalidade entre as mulheres. Neste estudo, são apresentados canabiterpenos (CBTs) sintéticos derivados do óleo de Pinus spp., cuja atividade antineoplásica ainda não havia sido investigada. O objetivo foi avaliar, in silico, a interação de α-canabipinenos e β-canabipinenos com os receptores canabinoides CB1 (9ERX; 2,9 Å) e CB2 (8GUS; 2,97 Å), bem como com o canal de cálcio TRPV2 (6U88; 3,2 Å), e investigar, in vitro, os efeitos de um produto sintético contendo CBTs sobre células MCF-7 cultivadas em monocamadas bidimensionais (2D) e esferoides tridimensionais (3D). O docking molecular foi realizado no programa GOLD e validado por redocking (RMSD < 2,00 Å), e as interações foram analisadas no Discovery Studio. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 9.0, utilizando-se ANOVA seguida do teste de Dunnett ($p < 0,05$). Para os dados de RT-qPCR, empregou-se o teste t de Student ($p < 0,05$), considerando-se biologicamente relevantes valores de fold change ≥ 2 ou ≤ -2. Os resultados demonstraram afinidade dos CBTs pelos alvos avaliados. Os β-canabipinenos apresentaram maior afinidade por CB1 do que o canabidiol (CBD) e os α-canabipinenos, enquanto todos os CBTs testados exibiram maior afinidade pelo canal TRPV2 do que o CBD. Nos ensaios in vitro com o modelo 2D, a mistura apresentou citotoxicidade dependente da concentração (IC_{50} = 89,46 µg/mL). A microscopia time-lapse, com aquisição de imagens a cada 3 min, mostrou que o tratamento induziu, sequencialmente, vacuolização citoplasmática, perda de adesão, arredondamento celular e ruptura da membrana plasmática. Nos esferoides 3D, a análise da cinética de crescimento entre 24 e 72 h, realizada com os programas AnaSP e ReViSP, revelou redução significativa do volume relativo (V/V_0). Após 72 h de tratamento, os esferoides foram transferidos para meio de cultura sem a mistura e mantidos por mais 72 h. A redução do halo de proliferação observada após esse período indicou comprometimento da capacidade de recuperação proliferativa. A análise microscópica dos esferoides corados com rodamina 123, Hoechst, PI e FDA evidenciou redução da viabilidade e das interações célula-célula, além do aumento da quantidade de células com perda da integridade da membrana plasmática. No modelo 2D, o ensaio de resazurina realizado após o pré-tratamento das células com NAC, um sequestrador de espécies reativas de oxigênio (EROs), demonstrou que a morte celular induzida pela mistura era dependente do aumento de EROs. As análises por citometria com H_2DCFDA, após 3 h de tratamento, e rodamina 123, após 24 h, demonstraram, respectivamente, aumento dos níveis intracelulares de EROs e da proporção de células com membranas mitocondriais despolarizadas. Esse resultado foi corroborado pela microscopia com Hoechst e rodamina 123, que

demonstrou reorganização perinuclear das mitocôndrias, efeito inibido pela NAC. O ensaio do cometa revelou danos ao DNA após 6 h de tratamento, enquanto as análises por citometria realizadas após 24 h, utilizando PI ou anexina V e 7-AAD, demonstraram, respectivamente, parada do ciclo celular na transição G1/S e maior proporção de células em apoptose tardia. Esse resultado foi corroborado pela microscopia com PI e Hoechst, após 24 h, que evidenciou aumento da quantidade de células com perda da integridade da membrana plasmática. A análise por RT-qPCR, realizada após 12 h de tratamento, demonstrou aumento da expressão de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (ERN1), à autofagia (MTOR e SQSTM1), à morte celular (BBC3), à parada do ciclo celular (CDKN1A), à resposta a danos no DNA (GADD45A), ao estresse oxidativo (HMOX1 e GPX1) e ao receptor canabinoide CB2 (CNR2). Em conclusão, os resultados in vitro demonstram que a mistura canabiterpênica avaliada apresenta citotoxicidade dependente de EROs, possivelmente relacionada à sua afinidade pelo canal TRPV2, conforme previsto pelas análises in silico.

Palavras-chave: Canabinoides; Docking; EROs; Mitocôndria; Neoplasia.

Agradecimentos: GenTox, LPMBA, LaSMMed e ESPEC.

Agência de fomento: CNPq, Capes, Finep e Fundação Araucária.

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA MITOCONDRIAL DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) POR MONTAGEM GUIADA PARA COMPREENSÃO DAS INTERAÇÕES COM *Streptococcus agalactiae*

Jean Yujii Sato Kamimura[1]; Kátia Cr. Brumatti Gonçalves[2]; Lucienne Garcia Pretto-Giordano[3]; Renan J. C. Apel[2,4]; Jorge Manuel de Oliveira Fernandes[4]; Rogério F. de Souza[2]; Laurival Antônio Vilas-Boas[2].

[1] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Bioinformática , Cornélio Procópio, PR, Brasil;
[2] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Londrina, PR, Brasil;
[3] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Londrina, PR, Brasil;
[4] Nord University, Faculty of Biosciences and Aquaculture, Bodø, Nordland, Noruega.

Biotecnologia e Bioinformática; *Experimental; Pós-graduação*

Resumo: A aquicultura desempenha papel fundamental na produção global de alimentos, sendo responsável por mais da metade do consumo anual de pescado, com destaque para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das espécies mais cultivadas no mundo e a mais cultivada no Brasil, destacando-se por suas características favoráveis de crescimento e adaptabilidade. No entanto, a estreptococose é a doença que causa altas taxas de mortalidade e prejuízos econômicos na criação de tilápias. O estudo do transcriptoma mitocondrial por meio de ferramentas de bioinformática pode fornecer informações valiosas sobre as interações entre a tilápia do Nilo e a bactéria *Streptococcus agalactiae*. Este projeto visa analisar a expressão gênica diferencial, os processos biológicos e as vias metabólicas mitocondriais em três condições: controle, infecção por *S. agalactiae* SA08-UEL (sorotipo Ib) e por *S. agalactiae* SA10-UEL (sorotipo III), comparando a resposta transcricional entre tilápias saudáveis e infectadas avaliando alterações relacionadas ao metabolismo energético, estresse oxidativo e função mitocondrial. Foram utilizadas para análise bibliotecas de RNA-Seq provenientes de tecido encefálico de *O. niloticus*. A qualidade das sequências foi avaliada com FastQC, seguida da trimagem com Trimmomatic. Posteriormente, os reads foram alinhados ao genoma de referência de *O. niloticus* com HISAT2, e a montagem guiada e quantificação dos transcritos foram realizadas com StringTie. As contagens gênicas obtidas foram utilizadas na análise de expressão diferencial com DESeq2, considerando padj $< 0,05$ e $|\log2FoldChange| \geq 1$. A variação entre as amostras e os padrões de expressão foram avaliados por PCA, volcano plots e heatmaps. O enriquecimento funcional foi realizado em R com clusterProfiler e enrichplot, por meio de análises de Gene Ontology e vias metabólicas. Os resultados indicaram que os sorotipos SA08 e SA10 induzem respostas mitocondriais distintas no tecido encefálico de *O. niloticus*. A cepa SA08 promove uma alteração funcional mais ampla, com genes de expressão reduzida associados à estrutura mitocondrial, ao metabolismo de aminoácidos, ao transporte de oxigênio e a processos sinápticos, enquanto genes com expressão aumentada estiveram relacionados à homeostase de ferro, ao metabolismo energético e à sinalização apoptótica. Em contraste, a cepa SA10 desencadeia uma resposta mais específica, com genes de expressão reduzida associados à resposta ao

estresse celular e também a mecanismos de reparo de proteínas afetadas por danos oxidativos, enquanto aqueles com expressão aumentada estiveram relacionados à reorganização do metabolismo de acetil-CoA, malato e glicose, ao transporte de aminoácidos e a processos mitocondriais relacionados à aminoacilação de tRNA. Apesar dessas diferenças, ambas as cepas interferem em processos relacionados à função mitocondrial e ao metabolismo celular, reforçando o papel da mitocôndria na resposta do hospedeiro à infecção e contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre *O. niloticus* e *S. agalactiae*. Dentre os resultados, podemos afirmar que as cepas induzem respostas distintas da tilápia à infecção, o que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos da doença, além de contribuir para a construção de estratégias específicas para o seu controle.

Palavras-chave: Bioinformática; expressão diferencial; *Streptococcus agalactiae*; tilápia-do-Nilo; transcriptômica mitocondrial.

Agradecimentos: Ao Projeto NorBraqua e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas e pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho, aos Laboratórios de Bioinformática e de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pelo suporte e infraestrutura disponibilizados.

Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE PROTEASES POR *Penicillium brevicompactum* UTILIZANDO RESÍDUO DE MALTE

Julia Guimarães Chagas [1]; João Eduardo Daniel Marcelino [1]; Daniele Sartori[1]

[1]Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação

Resumo: As proteases são amplamente empregadas nas indústrias de alimentos, agropecuárias, sanitizantes, têxteis entre outras e apresentam relevante potencial na degradação de resíduos orgânicos. A produção dessas enzimas por fungos filamentosos tem destaque por estes microrganismos produzirem e secretarem quantidades consideráveis de proteases, tornando o processo economicamente vantajoso. A associação da obtenção de proteases por microrganismos selecionados com resíduo agroindustrial tem sido estratégia sustentável para a geração de produtos de menor custo de produção. O resíduo de malte destaca-se por ser uma fonte rica em proteínas e cujo acúmulo pode acarretar em danos ambientais. Este trabalho teve como objetivo otimizar os parâmetros da produção de proteases em resíduo de malte utilizando *Penicillium brevicompactum* UELSr6.220. Frascos Erlenmeyer contendo resíduo de malte foram inoculados com 10^7 conídios/mL de *P. brevicompactum* UELSr6.220 e incubados por 7 dias, conforme parâmetros de temperatura (entre 21 a 35 ºC) e pH (4,2 a 9,8) definidos por planejamento Composto Central Rotacional (CCR). O Extrato Bruto Enzimático (EBE) obtido pela interrupção do cultivo em estado sólido foi utilizado para avaliação da atividade de proteases por meio do substrato azocaseína, a 37 ºC, por 40 minutos. Os dados de atividade de proteases foram utilizados para a obtenção da superfície de resposta e seleção do melhor parâmetro para a produção destas enzimas, os quais foram utilizados para a avaliação da cinética de tempo de produção de proteases, durante 7 dias. O crescimento de *P. brevicompactum* UELSr6.220 em resíduo de malte foi observado até 28 ºC. O modelo de superfície de resposta demonstrou maior atividade de proteases obtida a 23 ºC, pH 9,0 (162,73 ± 1,11 U/mL), seguido de redução da atividade até 28 ºC (entre 142,87 e 119,60 U/mL), de maneira tempo dependente e sem influência do pH. Com parâmetros estabelecidos a cinética de produção de proteases permitiu detectar aumento da atividade de proteases no terceiro dia com 233,10 ± 2,63 U/mL, mantendo-se estável até o sétimo dia de cultivo. Estes resultados permitiram concluir que sob parâmetros otimizados foi possível obter proteases de forma sustentável por *Penicillum brevicompactum* UELSr6.220 em resíduo de malte, cuja produção foi influenciada pela temperatura. Além disso, o tempo de produção de proteases, como obtido neste estudo é um fator essencial em fermentações em estado sólido.

Palavras-chave: Parâmetros otimizados; Processo; Resíduo agroindustrial.

Agradecimentos: Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, à Fundação Araucária (NAPI), ao CNPq e a CAPES.

Agência de fomento: Fundação Araucária, CNPq e Capes.

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM TRANSCRIPTOMAS DE INSETOS DE INTERESSE ECONÔMICO UTILIZANDO TRÊS BASES DE DADOS DISTINTAS - UMA ANÁLISE PRELIMINAR

Isabella Sayuri Ozeki Camargo[1]; Rogério Fernandes de Souza[1].

[1]Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Laboratório de Bioinformática;

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação

O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração tem permitido a geração massiva de dados transcriptômicos de organismos de interesse econômico, e a transcriptômica consolidou-se como uma ferramenta essencial para a compreensão da expressão gênica. Em experimentos de RNA-seq, parte dos *reads* pode não mapear aos genomas de referência, representando contaminação por DNA exógeno de microrganismos, parasitas ou alimento, sendo a identificação precisa desses contaminantes fundamental para evitar conclusões errôneas em estudos de expressão gênica. Essa dificuldade é potencializada em montagens *de novo*, que não possuem genomas de referência. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho das bases de dados SILVA LSU, SILVA SSU e RFAM na identificação de contaminantes em transcriptomas de quatro insetos de interesse econômico: *Aedes aegypti* (vetor de arboviroses), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja), *Bombyx mori* (bicho-da-seda) e *Euschistus heros* (percevejo-marrom). Os dados transcriptômicos dessas espécies foram obtidos de estudos anteriores realizados pelo do Laboratório de Bioinformática (LBi/LABIO/UEL) com montagens *de novo* realizadas com o software Trinity para *A. gemmatalis* e *E. heros* e guiadas com o StringTie para as espécies *B. mori* e *A. aegypti*. Os transcritos foram alinhados às três bases utilizando BLASTn, com identidade mínima de 80% e cobertura de 70%, e para cada *read* com múltiplas correspondências foi selecionada a de maior grau de confiança. Em uma primeira fase de análise para *Anticarsia gemmatalis*, os resultados indicam que bactérias constituem o grupo de contaminantes mais abundante. A análise integrada das três bases revelou que o banco de dados SILVA LSU apresentou o maior número de transcritos de contaminantes bacterianos (7.631 ocorrências), com destaque para as famílias Enterobacteriaceae (376), Corynebacteriaceae (270), Bacillaceae (272), Comamonadaceae (307) e Moraxellaceae (164). Por sua vez, o banco de dados SILVA SSU, detectando 9.914 ocorrências totais, com ênfase em Endomicrobiaceae (447), Streptococcaceae (334), Enterobacteriaceae (279) e uma quantidade expressiva de sequências de cloroplastos (144) e Poaceae (228), indicando forte contaminação por material vegetal. A base RFAM, com 169 ocorrências de Moraxellaceae, destacou-se na identificação de contaminantes bacterianos e fúngicos, confirmando a presença de Aspergillaceae (73) e Malasseziaceae. A diversidade de contaminantes observada reflete a complexidade das amostras de insetos inteiros, que podem carregar microrganismos associados ao alimento, ao ambiente de criação ou a relações de parasitismo. Como próxima etapa, está prevista a aplicação de programas adicionais para análise refinada dos contaminantes nas quatro espécies, visando uma classificação taxonômica mais detalhada e a comparação do perfil de contaminação entre organismos modelo e não modelo. Os resultados obtidos até o momento reforçam a necessidade de controle de qualidade em dados transcriptômicos, especialmente em organismos não modelo, nos quais a contaminação pode ser incorporada durante a montagem e levar a conclusões equivocadas. Dessa forma, este trabalho contribui para o aprimoramento das técnicas de análise de transcriptomas implementadas pelo LBi, auxiliando na escolha da base de dados mais adequada para a detecção de contaminantes em diferentes contextos biológicos.

Palavras-chave: bioinformática; BLASTn; contaminação; RNA-seq; transcriptômica.

Universidade Estadual de Londrina
Ciências Biológicas UEL
Bioma Consultoria Ambiental

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO

Leonardo Colombo Ueyama[1]; Ana Luiza Envangelista dos Santos[2]; Lucas Baldo do Nascimento Rodrigues[1]; Emerson José Venancio[1]

[1]Laboratório de imunologia IV, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR

[2]Laboratório de imunologia IV, CCB, Centro Universitário Filadélfia, Londrina – PR

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação

Resumo: A clara do ovo é um ingrediente nutricional e repleto de propriedades funcionais fundamental para a indústria alimentícia e de suplementos. Ela é reconhecida por seu alto valor biológico e pelo seu uso como agente espumante, gelificante e clarificante, além de ser usada como suplemento alimentar. A clara do ovo é composta por diferentes proteínas como a ovalbumina, ovotransferrina, ovomucoide e ovomucina. Todas elas possuem propriedades distintas e importantes para aplicação industrial. O objetivo deste estudo foi padronizar uma metodologia de extração de ovalbumina, ovotransferrina, ovomucoide e ovomucina para produção de um padrão de massa molecular para ser utilizado em reações de eletroforese em gel de policrilamida com SDS (SDS-PAGE). Esse protocolo foi baseado em dois estudos previamente desenvolvidos. Inicialmente a clara foi separada da gema do ovo, filtrada e diluída em água destilada. A ovomucina foi a primeira proteína extraída, utilizando a precipitação em pH 4,7, incubação em baixas temperaturas (overnight a 4ºC) e períodos longos de aquecimento (1 hora a 40ºC) para formar um aglomerado. O sobrenadante da extração da ovomucina, foi utilizado para obtenção da ovotransferrina, por precipitação com sulfato de amônio e ácido cítrico. Após o tratamento da amostra, foi possível separar a ovotransferrina do restante das proteínas. Por fim, a extração da ovalbumina e ovomucoide, foi feita pela adição de etanol ao sobrenadante da extração da ovotransferrina. O precipitado formado continha ovalbumina, enquanto o ovomucoide está presente no sobrenadante. As amostras obtidas foram quantificadas utilizando o método de Bradford e analisadas por SDS-PAGE. O resultado obtido mostrou a extração da ovotransferrina e ovomucina, e a presença da ovalbumina em baixa concentração. Além disso, não foi detectado a presença de ovomucoide. Como conclusão, foi observado que é preciso continuar ajustando a metodologia para melhorar a extração das proteínas que estão em menor quantidade na clara do ovo, ovomucoide e ovalbumina, e refinar a extração da ovotransferrina e ovomucina. A obtenção dessas proteínas purificadas permitirá a produção de um marcador de massa molecular para SDS-PAGE.

Palavras-chave: Marcador Molecular; Ovalbumina; Ovomucoide; Ovomucina; Ovotransferrina

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIBACTERIANOS PELO FUNGO MO22-M5c

Fernanda Eduarda Piffer Sorvos[1]; Marcelo Rodrigues de Melo[1].

[1]Laboratório de Biotecnologia e Metabolismo Microbiano, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas (CCE), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-Pr.

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Pós-Graduação.

Resumo: A crescente pressão seletiva associada ao uso intensivo de antibióticos favorece o surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes, comprometendo a eficácia das terapias convencionais e evidenciando a necessidade de novas estratégias de controle microbiano. Nesse contexto, a bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos, associada ao desenvolvimento de processos fermentativos para sua produção, destaca-se como uma abordagem promissora para o enfrentamento da resistência antimicrobiana. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de fatores ambientais na síntese de compostos antibacterianos pelo fungo MO22-M5c, bem como verificar a atividade desses metabólitos frente à bactéria *Bacillus subtilis*. Para isso, o microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 25 mL de Caldo de Batata Dextrose, sob condição estática, durante 15 dias. Ao final do período de incubação, o micélio foi separado do caldo fermentado por filtração a vácuo em papel de filtro. Posteriormente, foram determinados a biomassa micelial seca, o volume do meio fermentado, o pH final e a atividade antibacteriana, avaliada por meio do ensaio de difusão em ágar. Foram investigados diferentes valores de pH, variando de 4,5 a 8,5, e temperaturas de incubação entre 21 e 35 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, considerando-se nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que a maior atividade antibacteriana, expressa pela zona de inibição do crescimento microbiano (ZIp), foi observada em pH 7,5. Entretanto, as variações de pH avaliadas não promoveram diferenças significativas na atividade antibacteriana, indicando que o fungo apresenta estabilidade quanto à produção de metabólitos bioativos nessa faixa. Em relação à temperatura, observou-se menor atividade antibacteriana a 21 °C, enquanto os maiores halos de inibição foram registrados a 24 e 28 °C. Esse comportamento pode estar relacionado à maior eficiência metabólica e enzimática do fungo em temperaturas intermediárias. Por outro lado, temperaturas mais elevadas resultaram na ausência de halos de inibição, sugerindo redução ou inibição da produção de metabólitos antibacterianos. Esses resultados reforçam o potencial do isolado MO22-M5c como fonte de compostos antibacterianos e evidenciam a importância da otimização das condições de cultivo para favorecer a biossíntese de metabólitos bioativos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas à obtenção de agentes naturais para o controle microbiano.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Bioprospecção; Biossíntese; Fermentação; Resistência.

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

ISOLAMENTO DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* OBTIDAS DE AMOSTRAS DE SOLO DE AMBIENTE DE CAMPO CULTIVADO

Bianca Gois Rocha[1]; Felipe Rocha Raggi[1], Karen Cristina Lye Ioshimura[1], Artur Sousa Marchi[1], Kelly Christiane Constanski Silva[2], Gislayne Trindade Vilas Boas[1], Laurival Antonio Vilas Boas[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias, Londrina, Paraná, Brasil.
[2] Instituto Senai de Tecnologia em Celulose e Papel, Telêmaco Borba, Paraná, Brasil.

Biotecnologia e bioinformática; Experimental; Graduação

Resumo: Os insetos-praga estão entre os principais responsáveis pelas perdas na produção agrícola, sendo o controle químico uma das principais estratégias utilizadas para seu manejo. Nesse contexto, o controle biológico constitui uma alternativa sustentável ao uso de inseticidas químicos. A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) destaca-se pela produção de proteínas Cry durante a esporulação, amplamente empregadas na formulação de bioinseticidas devido à sua elevada especificidade contra insetos-alvo. O presente trabalho teve como objetivo isolar cepas de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo de áreas de cultivo, visando ampliar o conhecimento sobre a ocorrência dessa bactéria em ambientes agrícolas e obter isolados com potencial para futuras aplicações em programas de controle biológico. Foram coletadas 21 amostras de solo distribuídas em quatro áreas distintas, sendo dez provenientes de cultivo de eucalipto, uma de área de vegetação herbácea adjacente ao cultivo de eucalipto, cinco de cultivo de soja e cinco de área de cultivo de soja após a colheita. Para o isolamento bacteriano, 1 g de solo de cada amostra foi suspenso em 10 mL de solução salina esterilizada e homogeneizado em agitador tipo vortex por 15 minutos. As suspensões foram submetidas a tratamento térmico a 80 °C por 20 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, visando à seleção de bactérias esporulantes e a eliminação de células vegetativas. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas decimais, de 10^{0} a 10^{-5}. Alíquotas de 100 µL das diluições de 10^{-2} a 10^{-5} foram plaqueadas, em duplicata, em meio sólido NYSM utilizando a técnica de espalhamento em superfície com esferas de vidro estéreis e incubadas a 30 °C por cinco dias. As colônias com morfologia compatível com o grupo *Bacillus cereus* foram selecionadas para serem analisadas por microscopia óptica após coloração com amido black e fucsina, visando evidenciar esporos e cristais proteicos característicos de *B. thuringiensis*. Ao todo, foram examinadas 321 lâminas, a partir das quais foram identificados 26 isolados com cristais proteicos compatíveis com *B. thuringiensis*, sendo 21 provenientes de áreas de cultivo de soja (80,8%), três de cultivo de eucalipto (11,5%), um de área de soja após a colheita (3,8%) e um de área com herbáceas espontâneas (3,8%). As linhagens foram preservadas em estoque seco utilizando papel filtro acondicionado em criotubos, constituindo uma coleção para futuras análises. Como continuidade do estudo, os isolados serão submetidos à caracterização genética por meio da extração de DNA, amplificação por PCR e análises bioinformáticas, visando identificar as linhagens e avaliar seu potencial biotecnológico para utilização no controle biológico de pragas.

Palavras-chave: *Bactérias entomopatogênicas; Bioinseticidas; Controle biológico; Proteínas Cry.*

Agência de fomento: CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ATIVIDADE INSETICIDA DE *Bacillus thuringiensis* BR09 CONTRA *Rachiplusia nu*

Felipe Rocha Raggi[1]; Eduarda Andrade de Lima[1]; Bruna Alves da Silva[1]; Alini Almeida[2]; Daniel Ricardo Soza-Gómez[3]; Gislayne Trindade Vilas-Boas[1]

[1]Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias, Londrina, Paraná, Brasil.;

[2]Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil;

[3]Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/National Center for Soybean Research (Embrapa Soja), Londrina, Paraná, Brazil.

Biotecnologia e Bioinformática ; Experimental; Pós-graduação

Resumo: *Rachiplusia nu* é uma importante praga desfolhadora da soja na América do Sul, com registros de redução de suscetibilidade e evolução de resistência em populações de campo à soja Bt expressando Cry1Ac, o que reforça a necessidade de novas alternativas para seu manejo. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade inseticida da linhagem *Bacillus thuringiensis* BR09 contra larvas neonatas de *R. nu* e caracterizar seu genoma, com ênfase em genes pesticidas, organização plasmidial, fatores de virulência e posicionamento filogenômico. Bioensaios foram realizados com suspensões de esporos e cristais aplicados sobre dieta artificial, com avaliação da mortalidade por sete dias e estimativa das concentrações letais por análise Probit/Logit. O DNA genômico foi sequenciado pela plataforma Illumina NovaSeq 6000, seguido de montagem *de novo*, avaliação da qualidade e completude, anotação estrutural e funcional, identificação de regiões plasmidiais e análises genômicas comparativas. BR09 causou 97,916% de mortalidade na concentração de 200 ppm, com CL50 de 10,08 ppm e CL95 de 55,03 ppm. O genoma apresentou 6.445.496 pb, distribuídos em 408 contigs, conteúdo GC de 34,73% e 99,6% de completude, com 6.525 sequências codificadoras anotadas. A fração plasmidial totalizou 801.907 pb e foi organizada em 12 replicons plasmidiais putativos. Os genes *cry1Ia*, *cry2Aa*, *vip3Aa*, *cry2Ab* e *cry1Ac* foram associados ao replicon pBR09-305.1k, em regiões contendo elementos transponíveis e genes relacionados à recombinação. O gene *cry1Ac* foi delimitado como uma sequência completa de 3.537 pb, com 99,52% de identidade nucleotídica em relação à sequência de referência AY730621.1. Também foram identificados genes relacionados a enterotoxinas, citolisinas, fosfolipases, metaloproteases e ao sistema regulatório PlcR–PapR. As análises genômicas comparativas posicionaram BR09 próxima de linhagens de *B. thuringiensis* associadas ao grupo kurstaki, incluindo HD1, HD73, BGSC 4D1, BR145, YBT-1520 e HD133. Os resultados demonstram que BR09 apresenta elevada atividade contra *R. nu* e um repertório plasmidial diversificado de genes pesticidas, destacando seu potencial como fonte de fatores inseticidas para o controle biológico e o manejo da resistência.

Palavras-chave: controle biológico; filogenômica; plasmídeos; proteínas Cry

Agência de fomento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Universidade Estadual de Londrina
Ciências Biológicas UEL
Bioma Consultoria Ambiental

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PANUS STRIGELLUS* MP18-01

Bruna Martins de Souza[1]; Marcelo Rodrigues de Melo [1]; Fabiana Guillen Moreira Gasparin [1]

[1] Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia;

Biotecnologia e bioinformática; Experimental; Pós-graduação.

Resumo: Os fungos apresentam considerável capacidade metabólica para produção de compostos com estruturas químicas únicas. Vários destes compostos apresentam atividades biológicas que podem ser exploradas biotecnologicamente. O uso de compostos bioativos de cogumelos comestíveis pode representar uma alternativa segura, com potencial reduzido de toxicidade, dada a segurança de consumo destes cogumelos. O cogumelo produzido pelo fungo *Panus strigellus* é tradicionalmente consumido por comunidades Ianomamis da Amazônia brasileira e também relatado como produtor de compostos antimicrobianos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo sobre a produção de compostos antimicrobianos de *P. strigellus* MP18-01. O micélio de *P. strigellus* MP18-01 foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, contendo 25 mL de caldo de cultivo. Os frascos foram inoculados com três discos miceliais (10 mm Ø) e incubados por até 21 dias. Foi avaliada a influência de fatores químicos (composição do caldo de cultivo e pH) e de fatores físicos (aeração, pH do caldo de cultivo, incidência de luz, temperatura de incubação) sobre a produção de compostos antimicrobianos por *P. strigellus* MP18-01. Os cultivos foram interrompidos por filtração e o micélio foi separado do caldo fermentado. O micélio foi seco e o caldo fermentado foi avaliado quanto ao volume final recuperado, ao pH, e à produção de compostos antibacterianos por meio do teste de difusão em ágar contra *B. subtillis* ATCC® 6633 (105 UFC/mL) pelo método do pocinho (0,1 mL de caldo fermentado por pocinho). A inibição do crescimento de *B. subtillis* ATCC® 6633 foi determinada pela medida da zona de inibição (ZIp, mm) do crescimento microbiano ao redor dos orifícios. A produção de compostos antimicrobianos foi detectada em todos os caldos avaliados, em condição agitada, sendo a detecção possível a partir de 7 dias de cultivo. Além disso, o crescimento micelial e a produção de compostos antimicrobianos ocorreram em ampla faixa de pH, de 3,5 a 10,5, e em temperatura de 24 a 32 °C, sendo as temperaturas mais baixas estímulos benéficos para a atividade antimicrobiana do *P. strigellus* MP18-01.

Palavras-chave: Antibióticos; Cogumelo comestível; Fermentação.

Agradecimentos: Agradeço ao programa de pós-graduação em biotecnologia.

VII CONGRESSO DE BIOLOGIA DA UEL
CONECTANDO OS ELOS DA VIDA
DO MOLECULAR AO ECOSSISTÊMICO

ANÁLISE DE RNA RIBOSSOMAL CONTAMINANTE NO TRANSCRIPTOMA DE *Belostoma sanctulum* (HEMIPTERA: BELOSTOMATIDAE)

Ryan Sozo Cordeiro[1]; Rogério Fernandes de Souza[1]

[1] Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de bioinformática;

Biotecnologia e Bioinformática; Experimental; Graduação.

Resumo: As tecnologias de RNASeq permitem, dentre outras coisas, o estudo de espécies cujos genomas não foram sequenciados. Entretanto, conforme o seu ARN é extraído, principalmente aquele obtido da maceração total dos seus corpos, incluindo o exoesqueleto e o aparelho digestório, é comum a contaminação por ARNs de outros táxons que comprometerão o seu estudo. Por esse motivo é costume proceder à limpeza dos transcriptomas montados. Por outro lado, esses mesmos contaminantes podem fornecer informações relevantes sobre o ecossistema onde tais espécies se inserem. Este trabalho busca investigar transcritos contaminantes não pertencentes ao transcriptoma de machos e fêmeas de *Belostoma sanctulum* montado *de novo* pelo LBi/LABIO/UEL. O software *BLASTn* foi utilizado para alinhar os transcritos aos bancos de dados de ARNr *SILVA* LSU (subunidade grande do ribossomo) e SSU (subunidade pequena do ribossomo) (v138.2). As informações obtidas foram analisadas via Visual Studio Code, sendo excluídos da análise os transcritos de ARNr de artrópodes. Todas as entradas restantes, agrupadas utilizando o menor *E-value*, foram divididas em quatro tabelas, sendo duas para eucariotos e duas para bactérias. Para o domínio Bacteria encontraram-se 746 (LSU) e 486 (SSU) transcritos. Para o LSU, 330 (44,24%) se associaram ao clado Bacillota, sendo 54 relacionados a *Clostridium*; 190 (25,47%) ao Pseudomonadota, sendo 30 ligados a *Pseudomonas*; 91 (12,20%) ao Bacteroidota, com 10 a *Dysgonomonas* e 64 (8,58%) ao Actinomycetota, com 15 relacionados com *Streptomyces*. Também foram encontrados 13 clados com abundâncias variando entre 1 e 16, representando 9,49% do total identificado. Para os transcritos identificados pelo SSU, 184 (37,86%) indicaram o clado Bacillota, com 38 a *Streptococcus*; 117 (24,07%) Pseudomonadota, com 30 a *Klebsiella*; 61 (12,55%) a Bacteroidota, com 34 classificados como *Myroides*; 56 (11,52%) Elusimicrobiota, onde a totalidade de transcritos indicou "*uncultured bacterium*". Foram ainda encontrados mais 11 clados, com abundâncias variando entre 1 e 20, representando 14,00% do total identificado. Para o domínio Eukarya, as análises com os bancos LSU e SSU identificaram, respectivamente, 238 e 215 transcritos. Quanto ao LSU, 105 (44,12%) se associaram ao clado SAR, sendo 14 relacionados a "*wastewater metagenome*"; 96 (40,32%) ao clado Amorphea, com 13 associados a *Mortierella elongata* e 20 (8,40%) ao clado Archaeplastida, sendo estes distribuídos de forma homogênea em diversas classificações, como nos gêneros *Pinus, Daucus, Citrus, Characiopodium, Betula, Triticum,* entre outros. Foram encontrados mais dois clados, com abundâncias variando entre 3 e 14, que perfazem 7,14% do total. Por fim, para os transcritos alinhados ao banco SSU, 78 (36,28%) indicaram o clado Amorphea, onde 9 foram agrupados a *Aphelidium desmodesmi*; 71 (33,02%) ao clado Archaeplastida, com 14 associados a *Triticum aestivum*; 55 (25,58%) ao clado SAR, onde 16 indicaram "*uncultured eukaryote*". Por fim, foram ainda encontrados mais dois clados, com abundâncias de 3 e 8, que perfazem 5,12% do total. Mesmo em menor quantidade, essas análises indicaram a presença de ARN de espécies aquáticas, como *Clavariopsis aquatica, Stentor coeruleus, Colpodella angusta, Naegleria gruberi, Codosiga hollandica*, *Daphnia magna, Bodo saltans* e algumas espécies de *Paramecium;* de espécies saprófitas, como *Mortierella elongata* e *Multiclavula mucida*; e de parasitas, como *Angomonas deanei, Strelkovimermis spiculatus* e *Aphelidium desmodesmi;* juntamente com a detecção de ARN de plantas, como *Triticum aestivum.* Embora o transcriptoma em si tenha sido montado para *B. sanctulum*, esses resultados indicam o potencial dessa metodologia para identificar espécies do

ecossistema em que esses insetos se inserem, o que pode abrir espaço para diferentes estudos ecológicos.

Palavras-chave: Banco SILVA; ecologia aquática; limpeza de dados; RNA contaminante; RNASeq.