

ANEXOS I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS

DE *Phoma* e *Phomopsis* POR RAPD

**ALUNA: ANA PAULA MATOSO TEIXEIRA
ORIENTADOR: LUÍS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	5
OBJETIVOS.....	7
BIBLIOGRAFIA.....	8

Introdução

As associações de patógenos (fungos) - hospedeiros (sementes) causam danos às plantas através da interferência em diferentes mecanismos biológicos. Desta forma, a patologia de sementes cresce em importância, não só para os programas de fitomelhoramento, na efetivação da seleção precoce de cultivares resistentes (HEWTH, 1979; TOKESHI, 1980; CHAMPION, 1983), como no entendimento da relação patógeno/hospedeiro, com vista à preservação da qualidade das sementes.

A interferência dos patógenos associados às sementes podem promover redução da população de plantas, debilitação das plantas e desenvolvimento de epidemas (MENTEN, 1991).

Dentre outros danos, que podem facilmente ser causados por estes organismos, podemos citar: aborto, enrugamento e redução do tamanho das sementes, perdas do poder germinativo, podridões, mortes de pré-emergência, manchas necróticas, tombamento e deformações.

Na área florestal pouco se estudou sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica, especialmente em espécies nativas (FERREIRA, 1989).

Dentre os fungos isolados a partir de espécies florestais se encontram os gêneros *Phoma* e *Phomopsis* (CARNEIRO, 1986, 1990; FOSCO MUCCI et al., 1986; HOMECHIN et al., 1986; MARTINS, citado por SALES, 1992; URBEN et al., 1982). No entanto, poucos pesquisadores estudaram a patogenicidade destes fungos (CARNEIRO, 1986; MASCHIO et al., 1990; SALES, 1992), não tendo, nenhum deles, determinado as espécies dos isolados.

Fator que em grande parte determinou esta situação foi o fato de estes gêneros de fungos serem de difícil classificação, sendo problemática a determinação da patogenicidade de cada isolado, ora tidos como saprófitas, ora como patógenos de sementes.

Maiores avanços nos programas de classificação e melhoramento de sementes, são conseguidos com a identificação e caracterização das variedades morfológicas, anatômicas e bioquímicas associadas à resistência das sementes que podem constituir "marcadores" durante o programa de melhoramento.

Segundo Chirlei Glienke (1995), várias técnicas têm sido empregadas para análise de variabilidade em microorganismos. As clássicas, utilizam a caracterização de fenótipos, a partir de características morfológicas ou bioquímicas, principalmente por auxotropia, restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e, muitas vezes, de sistemática.

Assim, fungos dos gêneros *Phoma* e *Phomopsis* são caracterizados a partir de sua morfometria e pelo tamanho e formato de seus picnídios e esporos. Assim, fungos do gênero *Phomopsis* apresentam esporos dos tipos beta e/ou alfa que são diferenciados pelo tamanho e pela forma (conídios beta são maiores e fusiformes enquanto conídios alfa são ovalados) e fungos do gênero *Phoma* apenas produzem conídios alfa.

Problemas porém ocorrem de acordo com o substrato utilizado para crescimento dos fungos. Assim fungos do gênero *Phomopsis*, que normalmente são cultivados em meio

malte-ágar e aveia-ágar podem apresentar ou não formação de conídios beta de acordo com o meio.

Logo, é aconselhado que se faça revisão da antiga classificação destes fungos para que não sejam classificados erroneamente *Phomopsis* como se fossem *Phoma*.

Métodos tradicionais de detecção de fungos e sementes, tais como o "Blotter test" e a incubação em meio ágar, os quais se baseiam na observação direta da morfologia da cultura e no exame microscópico das estruturas reprodutivas após o período de incubação, não têm se mostrado sensíveis na detecção e identificação de fungos, quando se trata de subespécies, variedades e raças, devido à semelhança da maioria das características morfológicas desses agentes, nesses níveis taxômicos (LIMA et al., 1982).

Já foram realizados estudos para a classificação destes fungos de acordo com sua morfometria em diferentes substratos e usando técnicas de isoenzimas, mas atualmente tem-se utilizado mais comumente técnicas de RAPD, que são mais precisas, sendo por isso mais confiáveis.

A utilização de PCR oferece várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de detecção. Esta técnica possibilita avaliação específica, possuindo uma sensibilidade que permite detectar uma única molécula alvo, em um complexo de misturas, sem o uso de sondas radioativas, sendo também muito rápido e versátil (HENSON e FRENCH, 1993; FOSTER et al., 1993).

O método RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), também chamado AP-PCR (Arbitrary - Primed PCR) é indicado por vários autores como uma técnica imprescindível em qualquer projeto de identificação genética de fungos (FOSTER et al., 1993; HENSON e FRENCH, 1993; WILLIAMS e KUBELIK, 1991).

Material e métodos

O trabalho será realizado com dezesseis isolados de fungo obtidos a partir de sementes de espécies florestais nativas como *Tabebuia serratifolia* - ipê amarelo, *Dalbergia nigra* - jacarandá da Bahia e *Triplaris surinamenses* - tachi branco, cedidos pelo departamento de fitossanidade da Universidade Federal de Lavras, já utilizados anteriormente em outros trabalhos de classificação e caracterização.

Também serão utilizados no trabalho mais quatro isolados de fungos dos mesmos gêneros cedidos pelo departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP), para que se possa fazer uma classificação mais segura e eficiente de cada isolado, além de ainda ser utilizado um isolado de *Colletotrichum graminicola*, para que possam ser analisadas as diferenças que surgem quando são comparados fungos de gêneros diferentes.

Os isolados serão cultivados em Erlenmeyer contendo 50ml de meio de cultura batata-dextrose (BD) previamente autoclavado, durante sete dias, a temperatura ambiente e sob luz natural.

Após este período, serão feitas filtrações do conteúdo de cada Erlenmeyer em papel de filtro, primeiramente com água comum, até que comece a passar pelo papel água límpida, então serão feitas mais duas lavagens, com água bidestilada, do material

que ficou retido no papel, a fim de se obter como resultado micélio puro e limpo de cada isolado fúngico.

As hifas serão conservadas em freezer a -20°C , preservando assim suas condições ideais até que sejam utilizadas.

Será obtido das hifas o DNA através da técnica apresentada por Gratapaglia e Ferreira (1994), que será então submetido à amplificação, após ser quantificado em fluorômetro, através de reações de RAPD.

Os produtos das reações de amplificação serão resolvidos em géis de agarose e poliacrilamida de alta resolução por meio de eletroforese a 70-80V em tampão TBE. Para comparações de pesos moleculares, será incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular apropriado e conhecido.

Os isolados que ainda não foram estudados morfologicamente, após cultivo em meios diferenciados, serão agora submetidos a este estudo para que o estudo por técnicas moleculares possa ser complementado e para que, ao final do trabalho, os resultados sejam mais significativos.

Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo estudar a caracterização e a classificação de isolados de fungo dos gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, já estudados e avaliados anteriormente morfológicamente e pela técnica de isoenzimas, tendo sido este antigo trabalho base para dissertação apresentada por Regina Corrêa na conclusão de seu Mestrado em fitossanidade pela Universidade Federal de Lavras.

Pelo fato de o primeiro trabalho realizado não ter tido resultados conclusivos, já que foi contestada a antiga classificação taxonômica para estes isolados, mas não sendo a técnica de isoenzimas precisa o bastante, espera-se que sejam obtidos resultados definitivos agora com análise genética de cada isolado fúngico através da técnica de RAPD, podendo, talvez, ser feita uma reclassificação de alguns dos isolados, que passariam a ser classificados como pertencentes ao gênero *Phomopsis* e não como pertencentes às espécies *Phoma herbarum* e *Phoma glomerata*.

Bibliografia

Chitarra, Gilma Silva. 1994. Deterioração de sementes e técnicas moleculares na identificação de microorganismos.

Foster, L. M.; Kojak, K. R.; Loftus, M. G.; Stevens, J. J.; Ross, K. J..1993. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycology Research** 97 (7): 769-781.

Glienke, C.. 1995. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* *Kiely* detectada por RAPD. Esalq-USP.

Halloin, J. M..1975.Postharvest infection of cotton-seed by *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. **Phitopathology**.65 : 1229-1232.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

P.E.T. Biotecnologia Agrícola

***MICROPROPAGAÇÃO E SUAS APLICAÇÕES EM
BANANEIRAS***

André de Sousa e Silva

Piracicaba, dezembro de 1998

Micropropagação e suas aplicações em bananeiras

- I. Cultivo:**
- aspectos da espécie
 - aspectos econômicos
 - aspectos histórico
 - aspectos genéticos

- II. Problemas da produção de mudas:** - banana maçã e prata (Mal do Paraná)
- outras variedades (quantidade de mudas)

III. Micropropagação

- Técnica:***
- Fase- introdução
 - Fase- multiplicação
 - Fase- enraizamento
 - Fase- Aclimação

Objetivos

IV. Problemas da técnica :

- variação somaclonal

V. Conclusão

Aspectos da espécie

Nome científico: *Musa* spp

Família: Musaceae

Origem: sudeste asiático

- característica da planta:

Planta de clima tropical, exige calor constante e elevada umidade para um bom desenvolvimento. Devido a sua ampla adaptação, é cultivada em quase todos os países tropicais. Seus frutos são fornecidos em menos de um ano e reproduz-se com muita facilidade.

Apresenta caule subterrâneo, horizontal e rico em reservas. A superposição das folhas forma o pseudocaule, cuja a coloração varia de verde claro a bronzeado a dourado e preto, dependendo-se da espécie e da forma de cultivar.

A banana é o desenvolvimento partenocárpico do ovário da flor feminina da inflorescência. Seus frutos são bagas alongadas, com polpa carnosa de coloração amarelada, diversificada de acordo com a variedade.

- característica da flor:

As flores das bananas comestíveis são sempre hermafroditas, verificando-se em algumas a atrofia das anteras (flor feminina)e, em outros, dos ovários(flores masculinas). Estão reunidas em pencas isoladas e protegidas por uma bráctea, que é sempre caduca. Estas pencas surgem em série do chamado coração da bananeira: são inicialmente voltadas para baixo e invertendo posteriormente a posição. A coloração das flores identifica o grupo a que pertence a espécie.

Todas as bananeiras hoje cultivadas são híbridos entre a *Musa balbisiana* e *Musa acuminata*. Os híbridos das duas espécies acima referidas, reúnem - se em dois grupos, de acordo com as características das plantas, nas fundamentalmente tendo em conta a forma como se consomem-se seus frutos.

Um grupo, a que globalmente pode chamar-se de bananeira-pão, compreende um conjunto de cultivares, normalmente de grande porte, cujos frutos são consumidos cozidos ou assados, tal como as batatas, inhames ou batata-doce. Na língua inglesa, são chamados “plantin”.

Existe um outro grupo o da bananeira-fruta, reúne um conjunto enorme de cultivares de portes muito variáveis, de fruto muito diferentes quanto a forma, cor e qualidades sápidas. Todas elas quando maduras são doce devido a hidrólise do amido em açúcar, e são consumidas como frutas.

A banana é um alimento saudável e saboroso; mesmo sendo pobre em proteínas, cada 100 gramas de banana-nanica contém 95 calorias, muito fósforo, ferro, cálcio e vitamina c.

As bananeiras reproduzem-se vegetativamente a partir de brotos laterais, que são utilizados pelos agricultores para o plantio comercial, como pedaços de rizoma de diferentes tamanhos e de rizomas inteiro dos tipos chifrinho, chifrão, muda “alta” e “replante”.

I.2) aspectos econômicos:

A banana é um importante alimento na dieta humana. Além de fornecer vários nutrientes essenciais para a manutenção do metabolismo, ela é acessível a maioria das classes populacionais, devido a seu baixo custo. Ela tem alta aceitação no mercado e não há necessidades de muitas técnicas para produção (“caseira”).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de bananas. Colhe, anualmente, cerca de 570 milhões de cacho, o que corresponde a um volume de pelo menos 15 milhões de toneladas, em uma área plantada de cerca de 500 mil hectares. A tendência, no País, é aumentar a produção a médio prazo, com vistas à exportação, embora ainda haja espaço para o crescimento do consumo no mercado interno;(Frutas do alimento).

III) Micropropagação :

- técnica

- objetivos

Técnica: a propagação em massa de plantas pela cultura de tecidos, é feita através da cultura de ápice meristemático, segmento nodal ou gemas adventícias.

O ápice meristemático é constituído de meristema apical, mais um ou dois primórdios foliares. No caso da cultura da bananeira, normalmente, isola-se o ápice meristemático e um segmento do rizoma, para o início da propagação “in vitro”. O tamanho final do explante é de aproximadamente 1 cm. Após isso esteriliza-se o explante em hipoclorito (3:1), e depois passa por um processo de lavagem em água destilada auto-clavada e dentro do fluxo laminar. Este explante é incubado, no mesmo fluxo, em meio de cultura que favorece a indução de brotação (com regulador de crescimento benzilaminopurina). Os brotos formados são subcultivados até atingir o número de mudas desejado. O enraizamento é realizado em meio de cultura contendo regulador de crescimento que favorece o enraizamento (com o regulador de crescimento ácido indol butírico). O processo de aclimação é a ultima etapa. As mudas então são postas em vermiculita, e levadas a casa de vegetação, onde ficarão por algumas semanas, sofrendo um tratamento especial devido ao stress do processo. Após isso a muda já estará pronta para a comercialização.

A cultura de segmento nodal é feita isolando-se um nó, que contém uma gema axilar, o qual é cultivado em tubo de ensaio, contendo meio de cultura que favoreça o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular (citocinina/auxina). Após o desenvolvimento das plantas, isola-se novamente os segmentos nodais, os quais são subcultivados para meio de cultura fresco.

Gemas adventícias são aquelas que se originam diretamente no tecido do explante, sem passar pela fase de calo. Diferentes partes das plantas podem dar origem a gemas adventícias como: rizomas, segmentos de pecíolo, segmentos de embrióides, pedicelos, etc.

Objetivos: As técnicas “in vivo” de multiplicação por meristema e de viveiros de mudas, foram desenvolvidas visando a obtenção de um grande número de mudas provenientes de um único rizoma. Apesar de todos os esforços, as técnicas desenvolvidas mostravam-se ineficientes com relação a qualidade fitossanitária e improdutiva para um número elevado de mudas em curto espaço de tempo.

Com a introdução da micropropagação na cultura da banana, novas perspectivas foram feitas indicando uma mudança na bananicultura tradicional. A mais importante característica de uma muda de bananeira micropropagada é, sem dúvida, a sua qualidade fitossanitária. Estas mudas podem estar isentas de qualquer tipo de viroses como o CMV-cucumber mosaic virus e o *BUNCH TOP*, nematóide como o *Radopholus similis* e conseqüentemente favorecer uma vida útil mais longa de um bananal comercial.

Outras vantagens proporcionadas pelo correto uso desta técnica, estão relacionados com a possibilidade de produzir uma grande quantidade de mudas em um curto espaço de tempo, na poca de interesse do agricultor. Esta técnica possibilita também a introdução rápida de variedades novas ou então outras variedades de interesse comercial do agricultor.

IV) Problemas da técnica:

- variação somaclonal:

A ocorrência de modificações genéticas durante o processo de cultivo “in vitro”, de células e tecidos vegetais já é bem conhecida, tanto no meio acadêmico como nas biofábricas comerciais. Várias destas manifestadas como mutações na progênie de plantas regeneradas. Por esta razão, muitos autores têm proposto a utilização de diferentes técnicas de cultivo “in vitro”, como geradora de variabilidade genética, para características agronômicas de interesse em culturas de importância econômica.

A variabilidade genética gerada durante o processo “in vitro”, foi denominada de variação somaclonal por Larkin & Scowcroft(1981) que generalizou o termo “somaclone” para plantas regeneradas de qualquer forma de cultura de células. A variação pré existente vai depender da uniformidade genética do clone e das quimeras na constituição genética de seu meristema.

A técnica de micropropagação, na obtenção de variantes somaclonais de interesse agronômico, foi utilizada por Epp, 1988 e Hwang & Ko, 1987, em programas de melhoramento, visando criar resistência a Fusariose em variedades suscetíveis de bananeiras comerciais; obteve-se materiais mais tolerantes, mas por outro lado, o aparecimento de plantas fora do padrão ou variantes somaclonais, inviabilizava o uso comercial de tal metodologia.

Para a uniformidade na qualidade da muda de bananeira micropropagada e para o reconhecimento desse processo com uma técnica séria, será fundamental que todos os laboratórios e centros de pesquisas, relacionados com a prática de cultivo “in vitro”, publiquem suas metodologias procurando criar uma legislação que proteja a biofábrica e o agricultor contra aproveitadores.

Casos típicos de variação somaclonal foram observados por pesquisadores da Seção de Radiogenética (CENA-USP), em vista aos agricultores que usaram mudas micropropagadas.

V) Conclusão:

Em até seis subcultivos “in vitro”, na técnica de micropropagação em bananeiras, permitem lucro a uma biofábrica e garantem ao produtor a ocorrência de baixa frequência de variação somaclonal. Todavia, a simulação no sistema “in vitro”, indica que o aumento no número de subcultivos, não representa lucro significativo para uma biofábrica e sim problemas com qualidade.

A técnica de micropagação em bananeiras, além de ser viável economicamente, ela permite a produção de mudas isentas de qualquer patógeno, como também a produção acelerada de mudas para o agricultor, evitando o investimento a longo prazo.

Portanto, o Brasil com toda a sua dimensão e clima favorável (para a bananicultura) poderia assumir um importante papel no mercado mundial, e a micropropagação poderia ser uma excelente ferramenta no êxito de tal âmbito.

II. Produção de mudas

A cultura de banana, como qualquer outra cultura de exploração comercial, está sujeita a problemas fitossanitários resultantes de moléstias e pragas. Cultivares do subgrupo *Cavendish*, resistentes ao Mal do Panamá ou Fusariose, não estão livres de outras doenças fúngicas como o Mal de Sigatoka Amarela ou *Cercosporiose*, que é a principal moléstia dos bananais comerciais do Brasil. Apesar de poder causar grandes prejuízos em bananais afetados, seu está ao alcance do agricultor.

Entre as pragas, pode-se destacar a broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e o nematóide cavernícola (*Radopholus similis*), como as principais pragas em bananais comerciais, sendo esta última de difícil controle e causadora de danos consideráveis.

A micropropagação é útil no caso de produção de mudas de banana maça e banana prata, que são suscetíveis ao Mal do Panamá ou Fusariose. Isto porque essa doença é transmitida via terra, ou seja, ao comprar mudas para um começo de cultivo, estas se contaminadas levaram consigo a doença para o futuro bananal . Portanto, a micropropagação é viável na produção de mudas que são infestadas por problemas fitossanitários que estão na terra, e não no ar.

As outras variedades de bananas, apresentam como maior problema, a quantidade de mudas, que dependendo da necessidade são muito demoradas para a produção imediata. Com a micropropagação, esse problema seria resolvido, desde que a técnica fosse aplicada de maneira correta, pois com apenas uma muda pode-se conseguir em um ano, vinte outras mudas, isto é muito interessante para o produtor que deseja retorno financeiro rápido e seguro.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

PET Biotecnologia Agrícola

Relatório de seminário

**Mosca branca: *Presença
indesejável no Brasil***

Aluna: Carolina Bueno de Abreu

MOSCA BRANCA

Presença indesejável no Brasil

1. Introdução:

A mosca branca (*Bemisia argentifolii*) é uma velha conhecida da comunidade científica. Os problemas que causa a Agricultura como praga e vetor de vírus já vem sendo descritos há mais de cem anos. Mas não representava uma ameaça, já que recentemente seus danos eram limitados a poucas plantas hospedeiras, em algumas regiões geográficas, com a transmissão de viroses. Na última década a situação da mosca branca mudou dramaticamente no cenário mundial e ela passou a ser considerada, pela imprensa internacional, com uma das principais pragas do século XX.

A disseminação da mosca branca, em nível mundial, vem ocorrendo de forma assustadora. Estima-se que hoje são conhecidas mais de 700 plantas hospedeiras dessa praga e os prejuízos somam alguns bilhões de dólares. Somente nos EUA, os danos causados por este inseto já chegam a US\$ 500 milhões por ano. Na Nicarágua e Costa Rica, essa praga tem causado colapso na produção agrícola de várias culturas e ela já foi detectada também na maior parte dos países da África, América Central e Ásia e ainda na Austrália e Nova Zelândia.

A mosca branca atua como praga nas culturas agrícolas, por se alimentar da seiva das plantas, podendo levá-las à morte ou à diminuição da produção; elimina uma solução açucarada que induz aparecimento de fungos, provocando o apodrecimento de ramos, folhas, flores e frutos, o que prejudica a comercialização de frutas para exportação e plantas ornamentais. A mosca branca também é vetor de vírus, bastante prejudiciais, como os Geminivírus, e por isso, as perdas ocasionadas por essa praga chegam a 100% em diversas culturas de frutas e hortaliças. É importante ressaltar que essa praga adquire facilmente resistência a produtos químicos utilizados em seu controle.

2. A mosca Branca no Brasil:

No Brasil, os primeiros relatos da mosca branca datam de 1928, o primeiro registro oficial ocorreu em 1968 com algodão, soja e feijão, no Paraná. Em SP, no ano de 1972-73.

No início da década de 90 a praga ressurgiu em diversas regiões causando prejuízos em diversas culturas de importância sócio econômica: melão, melancia, abóbora, uva, jiló, etc. Em 1991 foi registrado o primeiro impacto expressivo dessa praga em culturas de tomate, brócolos, berinjela, abóbora e plantas ornamentais (crisântemo e bico de papagaio).

Hoje a mosca branca é encontrada em todos os Estados, causando perdas de 30-100% principalmente cultivos de frutas e hortaliças. Estima-se que os prejuízos causados por essa praga à agricultura brasileira, somados aos gastos com produtos químicos utilizados em seu controle, já estão próximos de meio bilhão de dólares, sem levar em conta os impactos sociais como o desemprego no campo e o conseqüente êxodo rural que ela provoca.

Os maiores impactos são na região Nordeste onde existe a maior área plantada de fruticultura.

3. Programa nacional de controle:

Os prejuízos crescentes que a mosca branca vem causando à agricultura brasileira levaram o Ministério da Agricultura e do Abastecimento a criar no dia 16 de dezembro de 1997, o programa Nacional de Controle de Mosca Branca, que será coordenado pelo ministério, através da Secretaria de defesa Agropecuária – SDA, ficando a parte da pesquisa sob responsabilidade da Embrapa, através do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. As medidas de combate à mosca branca e de controle fitossanitário, nos estados, serão implementados pelos seus respectivos governos, através de secretarias de agricultura.

Para a efetiva implementação do programa, os governos federais vão formar parcerias com a iniciativa privada, através de seus respectivos órgãos de atuação.

O programa prevê a adoção de medidas fitossanitárias para conter a disseminação da mosca branca e também o desenvolvimento de atividades de

pesquisa com o objetivo de estabelecer os métodos mais eficientes para o manejo integrado de pragas, o que inclui a realização de pesquisas de controle biológico e estudos de caracterização molecular de populações do inseto. Serão realizados também estudos para avaliar o impacto sócio-econômico nas culturas agrícolas em todo o país.

Esse programa prevê uma grande concentração de esforços e ações de combate à mosca branca também nas pequenas e médias propriedades rurais, sem o quê não será possível obter o êxito desejável.

4. O que é mosca branca:

A mosca branca (*Bemisia argentifolii*) é um inseto da Ordem Hemiptera, muito pequeno (Fêmea 0,90 mm; Macho 0,80 mm) e bastante parecido com uma mariposa em miniatura. O adulto tem 2 pares de asas membranosas, podendo voar a curtas e longas distâncias. Sob condições climáticas favoráveis, principalmente com temperaturas em torno de 25° C, o ciclo de vida varia de 3-4 semanas.

Esses insetos permanecem na parte inferior das folhas, onde põe os ovos (300-400 ovos durante seu tempo de vida, em média 150-160 ovos) Os ovos medem aproximadamente 0,20 mm e levam, em média, 5-7 dias para eclodirem, dependendo da planta hospedeira e da temperatura. Depois, a fase ninfa dura aproximadamente 2 semanas nos seus primeiros momentos de vida, a ninfa é transparente, mede cerca de 0,3mm e atinge 0,60 mm no final dessa fase. Desloca-se da folha por algumas horas, escolhendo o local para se fixar.

A ninfa se transforma em inseto adulto, através de uma abertura em formato de T invertido, deixando para trás uma espécie de invólucro translúcido, que continua preso à folha. Em altas densidades populacionais, verdadeiras nuvens verdadeiras nuvens desses insetos são formadas quando as plantas são tocadas.

A mosca branca pode causar danos às culturas agrícolas tanto na fase adulta como na de ninfa.

5. Controle fitossanitário:

O vento é um dos principais agentes de disseminação da mosca branca, mas o homem é o maior disseminador desse inseto, ao transportar plantas infestadas de um local para o outro, de forma inadvertida, sem respeitar os procedimentos e normas fitossanitárias do Ministério da Agricultura.

Existem algumas medidas de controle preventivo, que podem conter a disseminação da mosca branca e que são facilmente assimiláveis pelos produtores rurais. São elas:

- Destruir restos culturais imediatamente após a colheita
- Utilizar plantas invasoras como armadilhas para atrair insetos. Depois de utilizadas devem ser rapidamente eliminadas.
- Não abandonar o cultivo, mesmo que haja alta concentração da mosca branca, o que pode ocasionar infestação de cultivos próximos, aumentando os danos.
- Evitar plantios perto de cultivos já infestados, a menos que a espécie a ser implantada não seja hospedeira.
- Observar a direção dos ventos, evitar plantar em áreas sujeitas a infestações pelo vento.
- Não transitar com veículos, materiais, equipamentos e vestuários provenientes de áreas infestadas.
- Manter vigilância constante, se a mosca branca já tiver sido observada em sua região. Consultar imediatamente o Serviço de Extensão Rural, no caso de detectá-la.
- Uso de variedades mais resistentes, caso já se tenha disponível no mercado.
- Uso de armadilhas adesivas amarelas para monitorar a população. (Evitar uso de óleo, graxa e vaselina para colar os insetos, já que esses materiais derretem com o calor)
- Utilizar detergentes neutros ou óleos na proporção de 1%, durante pulverizações, para diminuir o número de ninfas.

6. Controle químico:

A escolha do inseticida adequado varia de acordo com a fase em que se encontra o inseto. Os reguladores de crescimento atingem apenas a fase de ninfa, enquanto os de contato podem controlar os adultos.

É importante ainda alternar o uso de inseticidas com modos de ação diferentes já que esse procedimento é fundamental para prevenir e evitar a formação de resistência e tolerância nos insetos.

Evitar pulverizações em períodos quentes do dia e momentos de vento forte. E também é importante certificar-se que as folhas tiveram uma boa cobertura, já que a mosca branca permanece na região inferior da folha e em locais sombreados.

Existem algumas regras básicas para aplicação de produtos químicos no combate a pragas e que devem ser rigorosamente seguidas como, por exemplo, ler o rótulo e a bula do produto antes de aplicá-lo, verificando toxicidade e modo de aplicação; não fumar, beber e comer até que a vestimenta de proteção não tenha sido retirada e um banho de água fria não tenha sido tomado; não deixar os produtos químicos próximos de alimentos; não realizar pulverizações em épocas de grande incidência de abelhas por serem estas polinizadoras; usar sempre equipamentos de proteção e aplicar com o receituário agrônomo. Usar somente produtos registrados.

7. Controle biológico:

O controle biológico vem se mostrando, cada vez mais, uma alternativa eficaz e viável, sem agredir o meio ambiente. Esse método potencializa o efeito letal dos inimigos naturais sobre as pragas e doenças.

Mosca branca: pesquisas de controle biológico ainda estão na fase inicial.

O Cenagen, desde 1997, está desenvolvendo um projeto para controle biológico da mosca branca, que consiste principalmente em identificar e avaliar os seus principais inimigos naturais.

É importante frisar que o controle biológico isoladamente não apresentará uma solução definitiva para o controle da mosca branca. À semelhança de outras pragas, o desenvolvimento de métodos biológicos desempenha um papel importante no manejo integrado de pragas da agricultura.

No momento, já são conhecidas algumas técnicas de controle biológico bastante simples e que podem ser facilmente seguidas pelos produtores rurais:

- Deixar uma planta infestada longe da cultura, sem pulverização, para observação e coleta de inimigos naturais.
- Observar a coloração das ninfas e abertura arredondadas das pupas, o que indica presença de inimigos naturais, importantes para diminuição da densidade populacional da praga.

8. Portas abertas:

Essa praga é um exemplo marcante da necessidade de rever o sistema de defesa fitossanitária no Brasil. As portas do país estão abertas para entrada de pragas tão nocivas quanto essa e que podem causar sérios prejuízos à agricultura brasileira.

Existe ainda a necessidade de implantar, para um controle efetivo desta praga, os tipos de manejo: Manejo Integrado de Pragas; Manejo Integrado de Culturas; Manejo Integrado de Áreas de Cultivo; Manejo de Resistência a Inseticidas.

Este ano o Brasil deve gastar mais de U\$ 2 bilhões com defensivos agrícolas, que podiam ser parcialmente economizados se o país investisse maciçamente em medidas de prevenção e quarentenas para impedir a entrada de pragas.

Somente a combinação de práticas culturais com uso de barreiras fitossanitárias e uso racional de defensivos é que tornará possível a diminuição da incidência da mosca branca e de outras pragas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
PET Biotecnologia Agrícola

Relatório de Estágio 1998

PRODUÇÃO DE CELULASE TOTAL DE *Aspergillus niger* IZ-09
POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO DIFERENTES
FONTES DE CARBONO

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP - C. P. 09

CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP

C.L. AGUIAR, C.B. ABREU, J. HORII, T.J.B. MENEZES

Aluna: *Carolina Bueno de Abreu*

ÍNDICE:

Resumo / Abstract.....	3
Introdução.....	4
Materiais e Métodos.....	7
Resultados e Discussão.....	9
Conclusões.....	10
Referências Bibliográficas.....	11

**PRODUÇÃO DE CELULASE TOTAL DE
Aspergillus niger IZ-09 POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO
DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Resumo: O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção enzimática de *Aspergillus niger* IZ-09 em diferentes fontes de carbono. *A. niger* IZ-09 produz um complexo enzimático celulolítico, composto principalmente por exo e endoglucanases, chamado celulase total ou FPase, que torna capaz a conversão da matriz celulósica à celobiose que pode ser convertida posteriormente em glicose, pela ação da β -glicosidase.

Para a produção do complexo FPase, foram testadas diferentes fontes de carbono, sendo elas: a) glicose e b) glicose + bagaço lavado e moído, para meio de CZAPEK-DOX; c) bagaço pré-tratado com NaOH a 4%, d) lactose e e) papel de filtro Whatman nº1, para meio MANDELS & WEBER; os meios assim preparados foram inoculados com uma suspensão de esporos de *A. niger* IZ-09 em água destilada e esterilizada. Cada tratamento recebeu três repetições.

O experimento foi conduzido num incubador tipo "Controlled Environment Incubator Shaker" (New Brunswick Scientific Inc.), à 30 °C, 100 rpm, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL do correspondente meio de cultura, por um período de 10 dias, sob fermentação submersa. A determinação enzimática foi desenvolvida segundo MANDELS (1974), utilizando-se método espectrofotométrico, pela reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com açúcares redutores MILLER (1959). Obteve-se maior produção de FPase com o uso de papel de filtro, onde a atividade média obtida foi de 0,4 FPUI.mL⁻¹.

Palavras-chave: Fontes de carbono, *Aspergillus niger* IZ-09, celulase total.

**TOTAL CELLULASE PRODUCTION OF
Aspergillus niger IZ-09 BY SUBMERSED
FERMENTATION USING DIFFERENT
CARBON SOURCES**

Abstract: The purpose of this project was to evaluate the total cellulase or FPase production of *Aspergillus niger* IZ-09 in different carbon sources. The *Aspergillus niger* fungus produce a complex cellulolytic enzymatic, compose mainly by exo and endoglucanases, called Total Cellulase, which makes it possible the conversion of cellulolytic resource to cellobiose, and that can be converted latter into glucose, by the β -glucosidase action.

For FPase complex production, different sources of carbon were tested, which are: a) glucose and, b) glucose with washed and ground bagasse by means of CZAPEK-DOX culture; c) 4% NaOH pre-treated bagasse, d) lactose, and e) Whatman # 1 paper filter, by means of MANDELS-WEBER culture. The means that were prepared like this, were inoculated with a suspension of fungi in sterilized and distilled water. Each treatment received three repetitions.

The experiment was conducted in a Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Inc.), at a temperature of 86° F and 100 rpm, in 500 mL Erlenmeyer bottles, with 200 mL of corresponding culture means, for a 10-day period under fermentation. The determination of the enzymatic activity was developed accorded to MANDELS (1974), using the spectrophotometric method, by the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) reaction with reductor sugar MILLER (1959). The biggest production of FPase was gotten in the treatment e) with use of paper filter, where the medium activity reached was 0,40 FPUI.mL⁻¹, followed by the treatment c), while the others were characterized by low activity.

Key Words: Carbon sources, *Aspergillus niger* IZ-09, total cellulase

INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em fermentação submersa (DA SILVA et al., 1994). A maioria das enzimas comerciais são obtidas por fermentação submersa, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptadas ao mesmo, obtendo rendimentos maiores e os custos e riscos de contaminação são reduzidos (FERNANDES-SALOMÃO et al., 1996).

A produção econômica de celulases depende da seleção e melhoramento de linhagens e do desenvolvimento de meios de fermentação. A maioria desses estudos tem sido feita com linhagens de *Trichoderma reesei (viride)* (NEVALAINEN & PAIVA, 1978).

A quantidade e propriedades das celulases produzidas por microrganismos dependem das suas condições de cultura, sendo que os fatores ambientais influem na produção de celulase e xilanase de diversos fungos, como o *Aspergillus niger*. Geralmente, as celulases são produzidos por cultura de organismos em meio líquido (estacionário, com agitação ou submersos com aeração) (DRAETTA & LOBO FILHO, 1980; NEDER, 1992).

O uso de enzimas em processos de transformação tem-se estendido a diferentes setores industriais. As enzimas atualmente são comercializadas para indústrias de detergentes, óleos e gorduras, panificação, sucos, celulose e papel, entre outras como produção de xaropes de alto teor de açúcares.

Há na natureza, um grande número de espécies de microrganismos que podem hidrolisar a celulose, porém um número bem mais reduzido consegue degradar o complexo ligno-hemi-celulósico (MENEZES & HIOSHII, 1982). A preocupação do homem com a ecologia e a carência de alimentos e de energia o tem motivado a pesquisar o aproveitamento de resíduos agroindustriais, dentre eles os celulósicos. Esse composto apresenta uma estrutura polimerizada complexa, formada por unidades de glicose unidas por ligações β -1,4, cuja cadeia se localiza dentro das células e tecidos, sendo envolvidas por uma matriz não celulósica e freqüentemente circundadas por lignina. Essas características e a sua solubilidade em água dificultam o seu processo de degradação (SANTOS et al., 1985). A aplicação de um complexo enzimático celulolítico, composto principalmente por endo e exoglicanases, que compõem um complexo enzimático chamado de celulase total ou FPase, tornaria possível a conversão da matriz celulósica à celobiose, que pode ser convertida

consecutivamente a glicose. A síntese de hemicelulases e celulases é uma propriedade que praticamente todos os microrganismos decompositores exibem. Eles diferem no tipo e quantidade em que as enzimas são produzidas (DA SILVA et al., 1997). Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para a produção de celulases (NOVO NORDISK, 1996). Os principais microrganismos produtores de enzimas, como as celulases e xilanase, são listados a seguir. Celulolíticos: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulvurentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp., *Schizophyllum*, *Chaetomium* (BISARIA & GHOSE, 1981), *Humicola* (DA SILVA et al., 1994). Xilanolíticos: As xilanases são as principais hemicelulases estudadas. Elas são encontradas em várias bactérias tais como as dos gêneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Clostridium* (BISARIA & GHOSE, 1981) e fungos dos gêneros *Myrothecium*, *Humicola* e *Penicillium* (DA SILVA et al., 1994). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* também produzem xilanases e celulases. Diversos espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glicosidase (STEVENS & PAYNE, 1977).

A capacidade destes microrganismos crescerem em materiais ligno-hemi-celulósicos pode ser utilizada como uma forma de aproveitamento de resíduos vegetais. A matéria orgânica contida em resíduos agrícolas e agroindustriais, tais como farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar (GÁRZON & HOURS, 1993), aumenta dia-a-dia, tornando-se um problema com relação ao espaço para depósito e poluição do meio ambiente. Entretanto, tais resíduos representam uma fonte para crescimento microbiano para a produção de biomassa ou de enzimas. Na maioria dos casos, um simples enriquecimento destes compostos com uma fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana quanto de atividade enzimática (BISARIA & GHOSE, 1981; ELISASHVILI, 1993).

Diversos têm sido os substratos utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos, bem como diferentes concentrações desses substratos. A eficácia de materiais celulósicos como indutores parece depender de sua susceptibilidade ao ataque pelo fungo (VITTI, 1988).

Segundo LOWE et al. (1987), atividades celulolíticas e xilanolíticas têm sido obtidas *in vitro* com papel de filtro e celulose microcristalina produzidas por *Neocallimastix frontalis*.

LINARDI E ROGANA citados por VITTI (1988), compararam a produção do componente C₁ (exo-β-1,4-glicanase), em quatro diferentes meios de cultura (CZAPEK, REESE, Básico líquido, EGGINS), pelo fungo *Trichoderma reesei* QM6a verificaram que tanto meio REESE como CZAPEK mostraram-se bons indutores desse componente.

TRIVEDI & RAO citados por VITTI (1988), observaram que açúcares como glicose, sacarose, maltose e arabinose, não induziram a formação de celulase por *Aspergillus fumigatus*. Altos níveis da enzima foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de carbono.

JOGLEKAR & KARANTH citados por VITTI (1988), citam que o desenvolvimento de *Penicillium funiculosum* UV-49 em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetilcelulose foi pobre e a atividade celulolítica baixa. Porém, DEKKER citado por VITTI (1988), observou que as celuloses que não são facilmente hidrolisadas pelas celulases, como avicel, algodão, celulose em pó, carboximetilcelulose, parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase. GONG & TSAO (1975) observaram que indutores da síntese de celulases incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose.

Celulase extracelular pode ser produzido por microrganismos em resposta à presença de certos substratos no meio de crescimento. Os indutores conhecidos para síntese de celulase incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose. A resposta das células fúngicas para diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor. É influenciada também pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de celulase tem duas funções, podendo servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese de celulase (GONG & TSAO, 1975).

MENEZES et al. (1991) obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total, quando utilizaram bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de sódio 4%, como fonte de carbono.

A NOVO NORDISK/Dinamarca (1996) produz industrialmente uma preparação celulolítica por fermentação submersa de *Trichoderma reesei*. *Aspergillus oryzae* tem sido utilizado na produção de inúmeras enzimas de alto valor industrial. COSTA et al. (1997) buscaram uma alternativa de obtenção de enzimas pela utilização de substratos de baixo custo, tais como soja, milho e arroz; porém esses substratos não produziram resultados satisfatórios na produção de celulase quando incubados com *A. oryzae* IMI.

Produção de celulase por uma linhagem de *Trichoderma* sp. foi obtida utilizando palha e farelo de trigo como substratos por fermentação semi-sólida, quando neste substrato ocorre excreção de celulase já após 24 horas (SILVA & DILLON, 1988).

Segundo UMIKALSON et al. (1997) uma cepa de *Chaetomium globosum* apresentou bom crescimento e produziu substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, uma fonte de carbono abundante e de baixo custo, em processo fermentativo em batelada. *Chaetomium globosum* produziu um extrato celulolítico cujas atividades de celulase total, CMCase e β -glicosidase foram 1,4, 30,8 e 9,8 UI/mL, respectivamente.

Para VLAEV et al. (1997) a máxima produção de celulase foi percebida com 72 horas de fermentação, e xilanase com 96 horas, sendo que a atividade obtida em fibras de espiga de milho foi menor que para Avicel, devido evidentemente, à presença de inibidores. O valor da atividade de xilanase na fibra de espiga de milho alcançou 70-80% do valor obtido com Avicel e a atividade de celulase alcançou somente 30% de valor medido com Avicel, sendo as atividades iguais à 3,7 U/mL para xilanase e 3,4 U/mL para celulase.

Segundo RAJOKA et al. (1997) a produção média de celulase total por *Cellulomonas biazotea* foi significativamente maior em meios contendo α -celulose ou fibras de grama do que nos meios contendo fibra de algodão, Sigmacell-100 e CMC, atingindo até 18 UI/mL/h a 30 °C.

Após quinze dias de incubação de *Pleurotus sajor caju*, níveis de atividade de celulase total e β -glicosidase iguais a 3,7 UI/g e 0,6 UI/g, respectivamente, foram observados por BISARIA et al. (1997) em palha de arroz.

Bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LM-UC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a produção de celulase total atingindo 13,4 UI/g após 120 horas incubação a 30 °C (GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY, 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

a) Microrganismo e sua manutenção

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* IZ-09, proveniente da Micoteca do Departamento de Agroindústria, Alimentos e

Nutrição, que foi desenvolvido e mantido em meio MANDELS & WEBER (1969) por aproximadamente sete dias em estufa a 30 °C.

b) Fontes de carbono

As diferentes fontes de carbono usadas nos meios de cultivo foram: glicose, lactose (graus analíticos), bagaço de cana foi obtido da Destilaria Capuava S. A. - Piracicaba/SP, sendo o material moído até a granulometria de 200 "mesh". O papel de filtro picado utilizado foi Whatman n°1.

c) Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar moído com solução de NaOH 4%

Uma parte do bagaço de cana-de-açúcar lavado e moído foi pré-tratado com vinte partes da solução de hidróxido de sódio 4% em autoclave por 30 minutos a 121 °C. O material recuperado em filtração foi lavado com água destilada até a neutralidade e seco a 65 °C em estufa até peso constante.

d) Meios líquidos para produção do complexo celulolítico de *Aspergillus niger* IZ-09

Estes meios foram elaborados para produzir o complexo FPase. Para produção deste complexo enzimático, foi utilizado os meios de CZAPEK-DOX-ÁGAR (NEDER, 1992) e o de MANDELS-WEBER (1969), onde foram adaptados para receber as diferentes fontes de carbono: a) glicose e b) glicose + bagaço lavado e moído, para meio de CZAPEK DOX-ÁGAR; c) bagaço pré-tratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4%, d) lactose e e) papel de filtro Whatman n°1, para meio proposto por MANDELS & WEBER; inoculadas com uma suspensão de esporos de *A. niger* IZ-09.

e) Determinação da atividade de FPase

O efeito sinérgico dos componentes exoglicanase, endoglicanase e β -glicosidase foi determinado usando-se papel de filtro Whatman n°1 como substrato da análise. Esta análise expressa a atividade da celulase total. A atividade da celulase total emprega o método descrito por MANDELS (1974). Meio mililitro de extrato enzimático e 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 foram incubados com uma fita de papel de filtro Whatman n°1

(50 mg) durante 1,0 hora a 50 °C. A quantidade de açúcar redutor produzida, em termos de glicose, foi avaliada pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade de celulase total (FPUI) é definida como aquela que libera 1,0 μ mol de glicose por minuto a 50 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FIGURA 1 mostra os resultados de atividade celulolítica do extrato bruto obtido das culturas preparadas com diferentes fontes de carbono. Verificou-se que algumas fontes de carbono provocaram melhor indução à produção FPase que outras. A fonte de carbono que propiciou melhor produção de FPase foi papel de filtro seguido do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado com solução de hidróxido de sódio 4%. Atividades celulolíticas em torno de 0,44 UI/mL com papel de filtro e de 0,16 UI/mL com bagaço de cana pré-tratado, foram atingidas após 192 horas de incubação. Diversos pesquisadores, entre eles MENEZES & HENNIES (1991), afirmam que o bagaço de cana pré-tratado com soluções alcalinas propicia uma maior indução de FPase durante o crescimento de *Aspergillus niger*, podendo ser considerado como uma fonte alternativa para a produção do complexo celulolítico. Porém neste trabalho nota-se que papel de filtro induziu mais a produção do complexo celulolítico que bagaço tratado, fato explicável pela presença marcante da lignina nos resíduos agrícolas, como o bagaço, que impede um contato direto da matriz celulósica com o fungo possibilitando a indução da enzima. Tal condição poderia ser invertida, caso fosse feito um tratamento mais eficiente de remoção de lignina do bagaço, o qual impede o contato da celulose com as células fúngicas e, conseqüentemente, indução do complexo celulolítico. Segundo MENEZES & HENNIES (1991), a lignina age como uma barreira física, impedindo o ataque microbiano às fibras vegetais.

O uso de bagaço de cana-de-açúcar promove uma alta produção de enzimas hemicelulolíticas, como xilanase, fato observado em ensaios preliminares realizados pelos autores. Isto justificaria a menor indução de celulase devido à presença de outras matrizes poliméricas que induziriam o fungo a produzir enzimas específicas. O papel de filtro

Whatman nº1 é composto por mais de 90% de celulose pura, o que possibilita uma maior indução da enzima celulolítica.

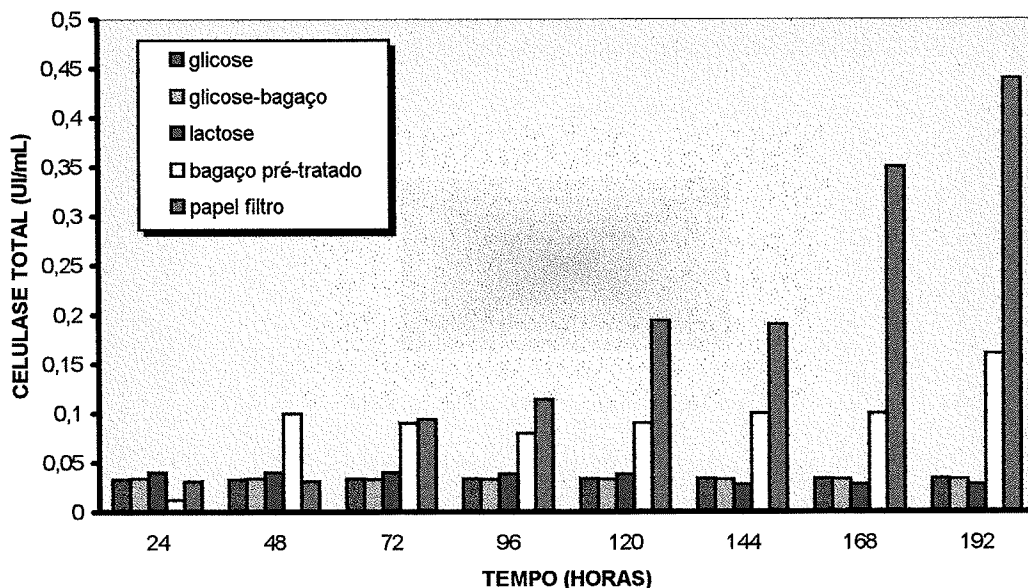


FIGURA 1. Efeito de diversas fontes de carbono na produção de FPase.

Os meios preparados com: glicose; glicose com bagaço não tratado; ou lactose, não apresentaram boa indução à síntese do complexo enzimático com atividades inferiores à 0,05 UI/mL. A utilização da glicose isolada ou acompanhada de bagaço de cana-de-açúcar demonstrou ser inibitório à síntese de celulase, com produção enzimática não superior a 0,033 UI/mL. A lactose é citada na literatura como um indutor da síntese do complexo celulolítico, porém nos repetidos ensaios feitos, a produção de FPase para este substrato, atingiu um pico máximo de 0,04 UI/mL em 24 horas de fermentação, com leve perda de atividade celulolítica após 96 horas.

CONCLUSÕES

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* IZ-09 mostrou ser um bom produtor do complexo celulolítico em cultura submersa a 100 rpm e 30° C, tornando-se uma alternativa

para aplicações industriais. Seu crescimento micelial foi rápido, possibilitando uma fácil separação micélio-extrato enzimático, pela aplicação de um processo físico simples como a filtração.

A utilização do bagaço de cana pré-tratado com solução alcalina, mostrou ser um indutor de FPase em potencial, porém requer um tratamento mais eficaz na remoção de lignina e da matriz hemicelulósica, predispondo a celulose ao microrganismo. Fontes de carbono mais simples como glicose e lactose, mostraram-se importantes na produção de massa celular microbiana, porém a síntese enzimática foi baixa. Conclui-se, portanto, que dentre os diversos substratos utilizados, o papel de filtro foi o melhor indutor na produção de FPase, uma vez que atingiu maior produtividade a partir de 72 horas de incubação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p.5-8, 1997.
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Tecnology**, v. 3, p. 90-104, 1981.
- COSTA, C. J.; MEDEIROS, N.; SILVA, N. L.; LIMA FILHO, J. L.; DA SILVA, M. P. C. Utilização de meios nutritivos regionais no cultivo de *Aspergillus oryzae*, para a produção de amilase, celulase, lipase e protease. CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5, 1997. **Anais**. Recife: UFPe, 1997.
- DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da SBCTA**, v.31, n. 2, p. 249-260, 1997.
- DA SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

- DRAETTA, I. S.; LOBO FILHO, M. Celulases de basidiomicetos: purificação e caracterização. **Coletânea do ITAL**, v. 11, p. 163-184, 1980.
- ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher *Basidiomycetes*. **Applied Biotechnology and Microbiology**, v. 29, p. 257-266, 1993.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; AMORIM, A. C. R.; CHAVES-ALVES, V. M.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 15-18, 1996.
- GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 93-95, 1993.
- GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Process**, v. 3, p. 111-139, 1975.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.
- LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n. 6, p. 1216-1223, 1987.
- MANDELS, M. **Production and application of cellulase**. USA. Laboratory Procedures. U. S.: Army Natick Laboratories, 1974. 22 p.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MENEZES, T. J. B.; HIOSHII, S. H. Efeito do tratamento do bagaço de cana na extensão da hidrólise da celulose. **Coletânea do ITAL**, v. 12, p. 123-135, 1982.
- MENEZES, T.J.B.; MAKINO,Y.; GRILLO, R.L.M. Produção de celulase: efeitos do tratamento do bagaço de cana-deaçúcar na produção de celulase. **Coletânea do ITAL**, v.21, n.1, p.29-44, 1991.
- MENEZES, T.J.B.; HENNIES, P.T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-deaçúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea de ITAL**, v.21, n.2, p.213-219, 1991.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NEDER, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: NOBEL, 1992. 138 p.

- NEVALAINEN, K. M. N.; PAIVA, E. T. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyse cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 11-16, 1978.
- NOVO NORDISK. **Celluclast® 1,5 L**: ficha técnica. 1996.
- RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 21-27, 1997.
- SANTOS, A. L. L.; SHIROSE, I.; ARRUDA, S. M. Influência de alguns fatores na produção de celulase e xilanase pelo fungo *Rhizopus* sp. **Coletânea do ITAL**, v. 15, p. 1-22, 1985.
- SILVA, D.M.; DILLON, A.J.P. Produção de celulases em fermentação semi-sólida por uma linhagem de *Trichoderma* sp. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15, 1988. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p.
- STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **Journal Genetic Microbiology**, v. 100, p. 381-393, 1977.
- UMIKALSON, M. S.; ARIFF, A. B.; SHAMSUDDIN, Z. H.; TONG, C. C.; HASSAN, M. A.; KARIN, M. I. A. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, n. 5, p. 590-595, 1997.
- VITTI, L. S. S. Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana. Piracicaba, 1988. 108 p. **Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo**.
- VLAEV, S. D.; DJEJEVA, G.; RAYKOVSKA, V.; SCHÜGERL, K. Cellulase production by *Trichoderma* sp. grown on corn fibre substrate. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p.561-565, 1997.

ÓLEO DE PALMA: PRODUÇÃO E MARKETING

Andrela S. Ferraz • Elalne C. Castelhadro • Sílvia S. Seoane

A cadeia produtiva do óleo de palma é uma história de sucesso na agricultura deste século; é hoje uma das mais promissoras alternativas econômicas para o desenvolvimento sustentável da Região Norte do Brasil.

O óleo de palma, no Brasil conhecido como dendê, vem sendo consumido há mais de 5.000 anos. É obtido da fruta de *Elaeis guineensis*, originário da Guiné Ocidental. A partir do século XV foi introduzido em outras partes da África, Sudeste Asiático e América Latina, ao longo da zona equatorial. (Consejo de Promoción del Aceite de Palma de Malasia, 1991).

Dos frutos da palmeira são extraídos dois tipos de óleo: o de palma, retirado do mesocarpo (polpa), e o de palmiste, obtido a partir da amêndoa (caroço). Através do processo rudimentar denominado "Roldão", é possível retirar apenas parte do óleo da polpa, produzindo óleo de baixa qualidade, sendo este conhecido por azeite de dendê.

O óleo de palma pode ser usado em vários setores da economia: indústria alimentícia, saboieira, cosméticos, química etc. Tem sido apontado como fonte energética alternativa em substituição aos combustíveis derivados de petróleo. Na Alemanha, já existem carros circulando com motores movidos a óleo vegetal.

Em termos de produção de óleo por hectare, a palma é a oleaginosa que apresenta a maior produtividade: cerca de três a cinco toneladas por hectare, quase dez vezes superior à produtividade da soja que é de 0,4 a 0,6 toneladas de óleo por hectare (veja tabela 1 para uma comparação entre oleaginosas).

O óleo de palma é o segundo em consumo e primeiro em comercialização no mercado mundial, com um volume transacionado quase duas vezes maior que o do óleo de soja

MERCADO MUNDIAL DE ÓLEO DE PALMA

A produção mundial de óleo de palma apresenta aumentos contínuos desde 1984, sempre tendo como liderança isolada a Malásia, seguida pela Indonésia e, bem abaixo, pela Nigéria e países da América Latina. Consta-se disso na tabela 2. É interessante notar as posições da Malásia e da Indonésia com relação às exportações de óleo de palma. A Malásia praticamente controla as exportações mundiais (tabela 3)

Os países que mais importam óleo de palma são China, Paquistão, Cingapura, Índia, Holanda e Alemanha (tabela 4). O consumo desse óleo concentra-se na Indonésia, China, Malásia, Paquistão, Índia e outros, sendo crescente a demanda nesses países (tabela 5).

No que se refere à produção e ao consumo, o óleo de palma perde somente para o óleo de soja. Em 1997, de acordo com o USDA, foram produzidas e consumidas cerca de 20 milhões de toneladas de óleo de soja e 16,6 milhões de toneladas de óleo de palma. Em termos de comércio internacional, as posições relativas desses dois óleos se invertem, ficando o de palma em primeiro lugar. Em 1997, o volume de óleo de palma comercializado no mundo chegou a 11 milhões de toneladas, enquanto que o de óleo de soja ficou em 5,6 milhões de toneladas.

De 1985 a 1997, os preços médi-

Tabela 1

Produtividade de Óleo por Cultura (em kg de óleo/ha)

Cultura	Produtividade	Tipo de óleo
Palma	3.000 - 5.000	Óleo de Palma
	300 - 500	Óleo de Palmiste
Coco	2.000 - 3.000	Óleo de Coco
Oliva	1.500 - 2.500	Óleo de Oliva
Soja	400 - 600	Óleo de Soja
Colza	800 - 1.100	Óleo de Colza
Girassol	600 - 1.000	Óleo de Girassol
Amendoim	600 - 1.000	Óleo de Amendoim

Fonte: VEIGA, A.S. (1994)

Tabela 2

Principais Países Produtores de Óleo de Palma, 1997

País	mil ton	%
Malásia	8800	52,8
Indonésia	4950	29,7
Nigéria	600	3,6
Colômbia	402	2,4
Tailândia	400	2,4
Costa do Marfim	310	1,9
Equador	250	1,5
Papua	248	1,5
Zaire	115	0,7
Costa Rica	100	0,6
Brasil	76	0,5
Outros	426	2,6
Mundo	16677	100,0

Fonte: USDA e Oil World Annual 1998

os anuais do óleo de palma no mercado internacional oscilaram entre US\$ 290, em 1987, e US\$ 480 a tonelada, em 1997. De modo geral, o preço dos óleos de palma e de soja seguem uma trajetória semelhante, como indica a figura 1. Nos últimos dois anos, contudo, o preço dos dois produtos têm-se aproximado. Em 1998, devido à seca que assolou Malásia e Indonésia, creditada em larga medida ao fenômeno climático El Niño, os preços do óleo de palma reagiram, atingindo cerca de US\$ 670 a tonelada em maio de 1998. O preço médio do óleo de palmiste no mercado internacional foi, em 1997, 44% superior ao do óleo de palma.

A Malásia no Contexto Mundial

A Malásia, um dos países chamados tigres asiáticos, estende suas garras para o desenvolvimento, expandindo-se a um ritmo de 8% ao ano, com renda *per capita* que supera os US\$ 10 mil dólares anuais.

O plantio comercial de palma na Malásia começou em 1917. A partir de 1960, houve ampliação e, em 1966, o país surgia como maior plantador de palma do mundo.

Com uma estratégia implantada nos anos 80, a Malásia pretende chegar ao ano 2000 como potência econômica do sudeste asiático, baseada na valorização de suas matérias-primas, óleo de palma e outros produtos. O país tem uma campanha agressiva na divulgação de produto, tentando informar ao mundo quais são seus atrativos técnicos. A campanha tem tido bastante êxito e as vendas acontecem sem maiores dificuldades.

A Malásia é responsável hoje por 54% da produção mundial de óleo de palma e por 63% da exportação. O produto é exportado para mais de 90 países. O governo local está totalmente comprometido com

Tabela 3
Exportações de Óleo de Palma em 1997, 1000 ton

País	mil ton	%	bilhões de US\$
Malásia	7325	63,9	3,52
Indonésia	2190	19,1	1,05
Cingapura	829	7,2	0,40
Brasil	13	0,1	0,01
Outros	1110	9,7	0,53
Mundo	11467	100,0	5,50

Fonte: USDA e Oil World Annual 1998

Tabela 4
Países Importadores de Óleo de Palma, 1997, 1000 ton

País	mil ton	%
China	1500	13,6
Paquistão	1100	10,0
Cingapura	975	8,9
Índia	950	8,6
Holanda	455	4,1
Alemanha	420	3,8
Brasil	72	0,7
Outros	5538	50,3
Mundo	11010	100,0

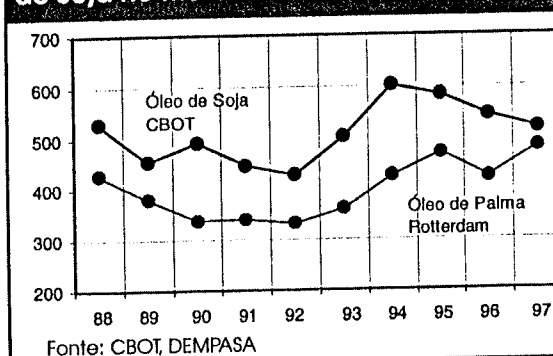
Fonte: USDA e Oil World Annual 1998

Tabela 5
Consumo Aparente de Óleo de Palma, 1997, 1000 ton

País	mil ton	%
Indonésia	2780	17,0
Malásia	1525	9,3
China	1400	8,5
Paquistão	1100	6,7
Índia	990	6,0
Nigéria	750	4,6
Tailândia	415	2,5
Egito	390	2,4
Colômbia	385	2,3
Alemanha	377	2,3
Japão	354	2,2
Holanda	245	1,5
Brasil	105	0,6
Outros	5584	34,0
Mundo	16400	100,0

Fonte: USDA e Oil World Annual 1998

Figura 1
Preço Médio Anual do Óleo de Palma e Óleo de Soja no Mercado Internacional - US\$/ton



a futura expansão da indústria desse óleo. Vários programas têm sido criados para que, por volta de 2010, o país conte com propriedades bem administradas, com aprimoração da produtividade e redução dos custos.

A Palma no Brasil

Apenas na década de 60 é que foi criado no Brasil o primeiro projeto-piloto com intuito de avaliar as condições regionais para o desenvolvimento da cultura do dendê. Na década de 70, houve aumento inesperado da produção nacional do dendê, estimulado pela elevação do preço dos óleos no mercado internacional. Somente a partir da década de 80 as atuais empresas responsáveis pela produção nacional (CRAI/AGROPALMA, DENTAUA, DENPASA) iniciaram seus projetos, quando o Pará, substituindo a Bahia, tornou-se o principal estado produtor do país. Desta forma, vê-se que o óleo de palma no Brasil está, apesar de introduzido há muitos anos, no início de seu processo. A distribuição da produção brasileira, organizada por estados e, nesses, por empresa, é apresentada na tabela 6.

Um balanço da produção e consumo de óleos e gorduras é apresentado na tabela 7. Nessa tabela, verifica-se, de um lado, a predominância do óleo de soja na matriz de produção e consumo, de outro, a necessidade de importação de óleo de palma e palmiste para atendimento das necessidades nacionais. Embora o óleo de soja seja o mais consumido no

Brasil, o de palma tem crescido, atingindo um total de 105 mil toneladas em 1997. A produção brasileira de óleo de palma fechou 1997 em 83 mil toneladas. Este valor representa menos que 1% do total mundial produzido. O volume de produção nacional está muito aquém da demanda interna, cujo potencial é estimado em 350 mil toneladas por ano, principalmente nas indústrias de margarinas e gorduras especiais, na indústria saboieira e na de oleoquímicos (PFAU, 1995).

Óleos Tropicais

A produtividade das áreas maduras está alcançando níveis de 3,5 a quatro toneladas de óleo por hectare, comparável com a dos principais países produtores, Malásia e Indonésia.

O desenvolvimento da cultura da palma e da agroindústria para extração e refino do óleo no Pará e Amazonas poderia beneficiar substancialmente a economia desses dois estados.

Segundo a CRA (Companhia Refinadora da Amazônia), o Brasil tem a maior área favorável para o cultivo de palma de dendê do mundo, mas ainda é pequeno produtor no setor de óleos. São 45 mil hectares plantados, com potencial para mais de 60 milhões de hectares.

MARKETING DO ÓLEO DE PALMA

Dentro da estrutura de marketing do óleo de palma, existe um apelo muito grande sobre os efeitos nutricionais, ambientais e sociais, entre outros. Estes são divulgados tanto em revistas científicas, quanto em folhetos informativos, embalagens de produtos etc. Grande número de pesquisas é realizado nessa área visando a colocar o óleo de palma em um patamar superior às outras opções de óleos, de modo a aumentar sua demanda tanto no nível industrial como diretamente pelo consumidor.

Posicionamento do Produto

Pode-se posicionar um produto em um ou vários fatores, tomando cuidado para que, ao tratar de inúmeros fatores, não resulte em confusão na mente do consumidor.

No caso do óleo de

palma, optou-se por posicionamento em diversos fatores, tais como saúde, ambiente, qualidade e até mesmo aspectos sociais, predominando as vantagens relacionadas com a saúde do consumidor final.

a) Saúde

Estudos têm demonstrado que o óleo de palma não aumenta o risco de fatores associados a doenças nas coronárias (CHD) e outros efeitos indesejáveis

O aumento da participação do óleo de palma deve-se a crescente oferta, versatilidade do produto e tendência mundial em substituir gorduras hidrogenadas por gorduras naturais, com qualidade e características benéficas para a saúde (PARRA, 1995).

O azeite de dendê (óleo de palma não-refinado) é uma rica fonte de beta-caroteno, o precursor mais comum da vitamina A. Além disso, também é encontrada nesse azeite a vitamina E, em quantidades significativas (MPOPC, 1991).

Em meados dos anos 80, surgiram muitas suspeitas infundadas de que o óleo de palma era impróprio ao consumo humano por fazer mal à saúde. A razão dessa associação negativa, estabelecida na mente de alguns consumidores, veio do conceito de que o óleo de palma era alta-

mente saturado, continha colesterol e aumentava o risco de doenças cardíacas. Esse equívoco foi desfeito com vários estudos que demonstraram que o óleo de palma não aumenta o risco de fatores associados a doenças nas coronárias (CHD) e outros efeitos indesejáveis (SUNDRAN, K., BASIRON, Y., IBRAHIM, A. 1994). Por fim, essas campanhas foram até favoráveis à promoção do óleo de palma, pois foi realizada uma série de estudos nutricionais em todo o mundo que hoje rebate qualquer campanha contrária que possa surgir no futuro. O FDA (Food and Drug Administration), órgão norte-americano

Tabela 6
Produção Nacional de Óleo de Palma por Estados e Empresas

	1992		1997		1998 (estimativa)	
	ÁREA	PRODUC.	ÁREA	PRODUC.	ÁREA	PRODUC.
	ha	ton	ha	ton	ha	ton
PARÁ		42.850	25.455	70.654	2,78	75.374
AGROPALMA		20.120	9.739	35.805	3,68	38.724
DENPASA		14.380	3.075	10.439	3,39	8.800
COACARÁ		0	2.570	7.182	2,79	8.500
CODENPA	3.000	3.850	3.400	5.302	1,56	6.000
DENTAUÁ	3.000	2.650	2.201	4.400	2,00	5.000
PALMASA	3.000	1.200	2.560	4.106	1,60	4.500
MARBORGES	2.000	0	1.910	3.420	1,79	3.850
MOEMA	700	650				
AMAPÁ	4.000	7.500	3.500	4.960		5.000
CODEPA	4.000	7.500				
COPALMA			3.500	4.960		5.000
BAHIA	10.000	8.800	2.000	2.673		4.100
OLDESA	4.000	4.000	2.000	2.673		4.100
OPALMA	3.000	3.800				
PINDORAMA	3.000	1.000				
AMAZONAS	3.400					
CAIAUÉ	2.000					
EMADE	1.400					
TOTAL	17.400	59.150	30.955	78.287	3	84.474

Fonte: DENPASA

Tabela 7
Produção e Consumo de Óleos e Gorduras no Brasil em 1997, em mil toneladas

	Produção	Importação	Exportação	Consumo
Óleo de Soja	3544	185	1105	2700
Óleo de Algodão	82	15	13	83
Óleo de Palma	83	72	34	105
Óleo de Palmiste	9	41		50
Outros	707	115	51	786
Total	4425	428	1203	3724

Fonte: Oil World Annual 1998

Óleos Tropicais

que fiscaliza e libera produtos alimentícios, não permite mais o uso da frase "não contém óleo de palma" nas embalagens.

Uma vez que os consumidores tenham conhecimento das propriedades atrativas do óleo de palma, não serão mais influenciados por campanhas de difamação. A cada dia que passa, mais e mais descobertas nutricionais positivas são feitas a seu respeito, consolidando sua reputação de produto de excelente qualidade.

b) Meio Ambiente

O segmento dos consumidores que se preocupam com o meio ambiente está atento a questões que vão desde o controle de poluição até operações energéticas mais eficientes (KOTLER, 1993). A perspectiva de plantios em regiões devastadas na Amazônia pode ser um atrativo importante para estimular o crescimento da cultura da palma nessa região.

Em nível nacional, empresas como a CRAI e a Agropalma exportam óleo de palma bruto de alta qualidade para a Alemanha. O negócio foi fechado após as empresas terem recebido o Selo Verde, certificado que atesta a não-utilização de agrotóxicos e pesticidas no processo produtivo, de acordo com as normas biodinâmicas. Essas empresas optaram pela produção natural, visando a adaptar-se a uma tendência internacional e para atender em mercado específico.

Há grande expectativa de a palma

O FDA não permite o uso da frase "não contém óleo de palma" nas embalagens de produtos comercializados nos EUA

ser também uma cultura que traz grandes benefícios ao meio ambiente.

No plantio, a cultura da palma é associada à do Kudzu tropical ou puerária, leguminosa capaz de fixar nitrogênio e evitar erosão, melhorando as propriedades do solo. No parque fabril das indústrias, é usada apenas tecnologia não-poluidora, trabalhando com decantadores especiais, que separam materiais sólidos, água e óleo por centrifugação, permitindo sua reutilização.

Além de todos esses cuidados, o emprego de adubos orgânicos e métodos defensivos biológicos para o controle de pragas e doenças, reduzindo ao máximo a aplicação de elementos químicos, foi fundamental para a conquista do Selo Verde. (RODRÍGUEZ, 1995).

Finalmente, como exemplo de aproveitamento de resíduos do dendzeiro, a torta de palmiste pode ser utilizada como ração animal e até os cachos vazios e as cascas dos frutos podem ser usados como adubo ou como combustível nas caldeiras, gerando energia para a própria indústria (PFAU, 1995).

c) Qualidade

O óleo de palma da Malásia tem ótima reputação pelo fato de ser um produto de excelente qualidade. Há controle rígido em todos os estágios de produção: no plantio, processamento, estocagem, manuseio e transporte. Os procedimentos de controle de qualidade impostos pelo governo são cumpridos com rigor. Quatro órgãos governamentais são responsabilizados pelo controle das exportações: PORLA (Palm Oil Registration and Licensing Authority), Departamento de Química, autoridades portuárias e alfândega. Estes são responsáveis pela qualidade do óleo a ser exportado, através de um trabalho rigoroso efetuado por seus fiscais (NORDIN).

O grupo Real, no Brasil, investiu em tecnologia e está produzindo óleo de excelente qualidade com grau de acidez entre 1,2 e 1,8%. Consideran-

do que a principal característica de um bom óleo é o teor de acidez inferior a 5%, os produtos da CRAI e Agropalma estão entre os melhores do mundo.

Outra característica do óleo de palma é sua composição. Esse óleo contém 40% de estearina e 60% de oleína, um óleo com ótimas características para frituras, na cozinha doméstica e industrial. Resiste muito bem às altas temperaturas por períodos prolongados sem provocar oxidação, responsável pela formação de peróxidos e odores desagradáveis (PFAU, 1995).

d) Aspectos Sociais

Estes aspectos, embora não atinjam diretamente o consumidor, relacionam-se, entre outras coisas, com a qualidade de vida das pessoas envolvidas nos processos produtivos, e vêm sendo cada vez mais percebidos e admirados pelos consumidores.

No Brasil, algumas empresas têm demonstrado grande preocupação com a qualidade de vida de seus funcionários. O grupo Agropalma conta com 800 trabalhadores que trabalham 12 meses por ano devido à produção ininterrupta da palma. Esses funcionários e suas famílias moram em agrovilas com 200 casas, que comportam cerca de 2.500 pessoas. Todas as unidades têm luz, água e esgoto. Outro benefício é uma comissão de produtividade concedida aos cortadores de cachos de palma, além

A perspectiva de plantios em regiões devastadas da Amazônia pode ser um atrativo importante para estimular o crescimento da cultura da palma nessa região

O óleo de palma tem ótimas características para frituras; resiste muito bem às altas temperaturas por períodos prolongados sem provocar oxidação e odores desagradáveis

do salário fixo. Esse benefício pode multiplicar por seis o valor do salário fixo em meses de pico de produção palmar. Os funcionários também contam com escola gratuita, refeição subsidiada e assistência médica (MARIA, 1997).

Globalização

A primeira fase iniciou-se no final dos anos 80, quando as refinarias de óleo da Malásia estabeleceram-se em mercados mais estratégicos. O objetivo era fortalecer os mercados já conquistados, captar novos e, finalmente, controlar o abastecimento e o preço dos derivados da palma. Por volta de 1995, a Malásia contava com 14 refinarias em outros países, como China, Egito e Vietnã (NORDIN). Atualmente, a indústria da palma na Malásia tem como objetivo a exportação. Portanto, seu produto está preparado para ser confiável e competitivo no mercado mundial.

No Brasil, muitas empresas estão investindo pesado no setor. Nos últimos anos, a Agropalma e a CRAI implantaram uma moderna usina de processamento de óleo na cidade de Belém. A primeira etapa da construção da refinaria consumiu US\$ 6 milhões do total de US\$ 20 milhões previsto pela empresa (PARRA, 1995).

Mix de Marketing

(a) Produto

O óleo de palma é utilizado de diversas maneiras, para uso tanto comestível quanto para uso não-comestível. Como se trata de óleo menos sujeito à oxidação e à formação de oxipolímeros, é bastante usado em frituras. Na preparação de margarinas e gordura vegetal, o óleo de palma apresenta uma vantagem sobre os demais. Enquanto os outros óleos têm de passar por um caro processo de hidrogenização para obter o ponto de fusão desejado, o de palma requer mínima hidrogenização, pelo fato de cristalizar em sua forma natural, reduzindo custos necessários nesse processo. Essa propriedade pode tornar-se muito favorável, à medida que as pesquisas recentes estão afirmando as implicações indesejáveis à saúde provocadas pelos ácidos graxos trans (provenientes da hidrogenização de óleos). Isto representa diminuição nos custos para os fabricantes de gorduras sólidas. Uma forte razão pela qual a popularidade da fração sólida do óleo de palma aumentou em alguns produtos nos últimos anos é o crescimento da percepção, pelas indústrias, dos benefícios socioeconômicos gerados por essa fonte (BASIRON, IBRAHIM, 1995; NORDIN).

A fração sólida do óleo pode ser utilizada diretamente na fabricação de gorduras industriais para a con-

O óleo de palma pode ser utilizado em motores no lugar do óleo diesel desde que passe pelo processo de transesterificação, ou retirada da glicerina, que suja o motor

fecção de bolos, biscoitos, como matéria-prima de margarinas e gordura para sorvete. Substitui com vantagem o sebo na fabricação de sabões e sabonetes porque é uniforme e desodorizado, enquanto o sebo é variável em impurezas, odores e qualidades, além de seu preço oscilar durante a safra (PFAU, 1995).

Obtêm-se também do óleo de palma ácidos graxos, gliceras emulsificantes e umidificantes, lubrificantes, cosméticos e explosivos. A indústria farmacêutica utiliza o dendê na produção da vitamina A, a partir dos seus carotenóides (PFAU, 1995).

Devido à grande versatilidade do uso de óleo de palma, o Instituto de Pesquisa do Óleo de Palma da Malásia (PORIM, 1995) mantém a maior coleção de germoplasma de palma do mundo. São 60.000 palmas colecionadas durante mais de 20 anos. Essa coleção obtém material para a manipulação genética, de forma a alterar a composição de ácidos graxos, níveis de produção, resistência a doenças e pragas e outros fatores de qualidade, de acordo com sua futura aplicação (BASIRON, ABDULLAH, 1995).

A pesquisa de óleos vegetais modificados avança no mundo e aponta esse óleo como futuro substituto do diesel em motores de



Plantio de palma com leguminosas nas entrelinhas, Pará

combustão interna. O dendê já pode ser utilizado em motores no lugar do óleo diesel desde que passe pelo processo de transesterificação, ou retirada da glicerina, que suja o motor. Esses motores chegam a fazer 40 km por litro de óleo vegetal (PFAU, 1995).

O óleo de palma também tem aplicação na laminação de chapas de aço, particularmente de folhas-de-flandres. É um dos poucos óleos vegetais não-incandescentes a cerca de 400°C, temperatura de processamento das chapas (PFAU, 1995). As indústrias siderúrgicas e de lubrificantes absorvem cerca de 7% da produção nacional, o que corresponde a cinco mil toneladas por ano. Mais denso e saturado, o palmiste é substituto perfeito do óleo de mamona como lubrificante para metalurgia e aviação (PFAU, 1995).

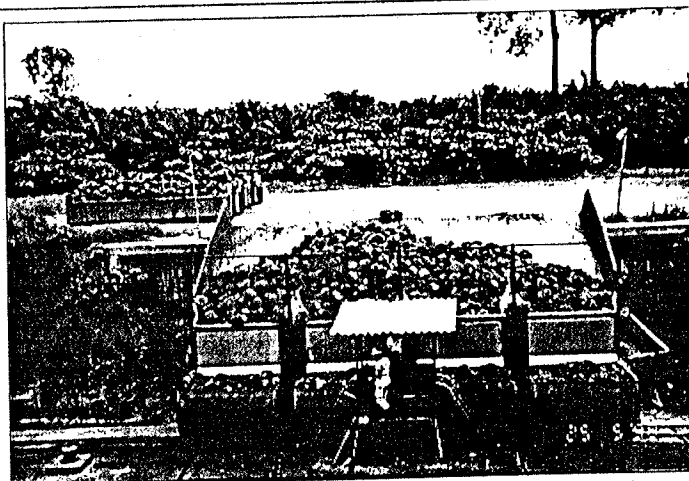
A Malásia é o único país que exporta óleo de palma com um pacote de vantagens, distinguindo sua oferta, desta forma da de óleo de soja, como estratégia de diferenciação de produto. Este pacote de vantagens inclui, além da qualidade, uma prestação de serviços que abrange do período anterior à negociação até sua conclusão.

(b) Distribuição

A segurança no abastecimento é um fator importante para os fabricantes, pois permite que eles mantenham seus prazos de produção, maximizem sua capacidade de utilização e ainda mantenham a formulação do produto de forma a padronizar a qualidade do produto final.

(c) Comunicação

A publicidade é o meio de divulgação mais evidente utilizado pela Malásia, sendo esta mais vantajosa principalmente pela maior credibilidade oferecida em relação à propaganda. O Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento do Óleo de Palma da Malásia (PORIM, 1993) é o principal responsável por esse



Cachos de palma à caminho da extração do óleo, Pará

tipo de divulgação.

A Malásia conta também com o MPOPC (Malaysian Palm Oil Promotion Council - Conselho de Divulgação e Promoção do Óleo de Palma), um programa que oferece a várias revistas a oportunidade de visitar diversas fábricas, laboratórios e plantações de palma na Malásia. Todas as passagens aéreas e despesas são subsidiadas pelo MPOPC.

(d) Preço

O preço do óleo de palma é bastante convidativo aos compradores, tendo ainda a vantagem de competir com os preços do óleo de soja, o segundo óleo mais comercializado no mundo.

DISCUSSÃO

Primeiramente, a Malásia, como monopolizadora da produção do óleo, deve ser caracterizada por seu objetivo de atender ao mercado externo, uma vez

Um ponto a ser analisado com cuidado é a possibilidade de eventualidades comuns nos grandes plantios em monocultura, tais como pragas e doenças

que exporta mais que 80% da produção do óleo. Sendo assim, vem conseguindo suprir eficientemente a demanda mundial, embora o mercado consumidor desse produto venha crescendo. O crescimento da demanda, por sua vez, pode justificar os interesses também crescentes da Malásia em incentivar outros países a plantar e adotar suas tecnologias, uma vez que dificilmente poderá aumentar sua produção e rendimento por área. No

Brasil, por exemplo, a Malásia realiza anualmente seminários que visam a estreitar sua relação com o país e propor parcerias no plantio e produção.

Usando a Malásia como termo de comparação para a produção brasileira hoje, enquanto a primeira supre o mercado mundial no nível industrial, o Brasil não consegue suprir nem a demanda de sua indústria interna. Por isso, hoje, o Brasil importa óleo de palma da Malásia e não existe, com exceção do azeite de dendê, óleo disponível para mesa. Um fator que pode mudar esse quadro é o fato de hoje o Brasil já ter uma indústria de refinamento do azeite de dendê, o que agrega valor ao produto e pode estimular a ampliação da produção nacional.

Supondo que, no longo prazo, o óleo de palma fosse ofertado também ao segmento do consumidor de óleo para cozinha, uma série de pesquisas mercadológicas deveriam ser previamente realizadas para confirmação de seu êxito e aceitação.

O óleo de soja, por exemplo, é amplamente aceito pelo mercado por suas características qualitativas e de preço, além de outros fatores. É, portanto, um mercado estável, bastante competitivo e agressivo, no qual não é simples conseguir uma fatia. Se por um lado o óleo de palma tem a vantagem de praticamente não necessitar de hidrogenização, processo de alto custo pelo qual passa o óleo de soja destinado à indústria que o utiliza hidro-

O marketing do óleo de palma é direcionado às Indústrias, não sendo percebido pelos consumidores que suprem sua demanda com outros óleos vegetais

genado, necessita, por outro, passar por um fracionamento para ser aceito como óleo de cozinha, sendo também um processamento oneroso.

Outro ponto a ser analisado seria o fato de a palma caracterizar-se por uma cultura perene, com produção contínua, mas que requer investimento inicial maior por começar a produzir somente por volta dos cinco anos. Outro fator, ainda relativo à cultura, é que, no caso do Brasil, há a possibilidade de aparecerem eventualidades não-previsíveis nos grandes plantios de monocultura, tais como pragas e doenças.

CONCLUSÃO

O óleo de palma pode vir a ser cada vez mais um produto utilizado na indústria e mesmo na mesa. Enquanto cresce sua demanda na indústria e a produção não supera a demanda, o marketing existente hoje é direcionado, e atinge apenas as indústrias, não podendo ser percebido pelos consumidores, que suprem satisfatoriamente sua demanda com outros óleos.

Há, porém, tendências tais como a substituição das gorduras hidrogenadas por naturais, o que pode ser utilizado como forma de promoção do óleo de palma.

Para finalizar, muitos estudos devem ser realizados com relação ao dendê, não só na parte de marketing, mas em todas as áreas que envolvem essa cultura. Ao que tudo indica, existe alta probabilidade de que estudos nesta área serão muito úteis em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 1998.

BASIRON, Y. *The palm oil industry, export trade and future trends*. PORIM Information Series, abr.1992. 8 p.

BASIRON, Y.; ABDULLAH, R. *Palm Oil Update*. INFORM (International News on Fats, Oils and Related Materials), v. 6, n. 8, p. 884-898, ago. 1995.

BASIRON, Y.; IBRAHIM, A. *Óleo de palma: velhos mitos, novos fatos*. Óleos & Grãos, v. 5, n. 24, p.21-26, mai./jun. 1995.

Consejo de Promoción del Aceite de Palma de Malasia. *Información y antecedentes básicos sobre el aceite de palma*. p.1-22., 1991.

KOTLER, P.; ARMSTRONG, G. *Princípios de Marketing*. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1993. 478p.

KUNTON A.; KIFLI, H. *Propriedades dos sabões fabricados com ácidos graxos destilados de estearina de palma e palmiste*. Espuma, v. 11, n. 28, p. 66-69, jan./mar. 1995.

Malaysian Palm oil Promollon Council. *Palm oil: A guide for Users*.

MARIA, E. *Belém ganha refinaria para palma*. Folha de São Paulo. São Paulo, 5º caderno, p. 1, 29/abr. 1997.

MPOPC. *Información y antecedentes básicos sobre el aceite de palma*, 22 p. 1991.

MPOPC. *Palm Oil: A Guide for Users*. Palm Oil Information Series. 47 p.

NORDIN, J. B. *O Desenvolvimento da Indústria de Óleo de Palma da Malásia no Mercado Global de Óleos e Gorduras* (não-publicado).

Oil World Annual 1998. Hamburg.

PARRA, C. D. *Projeto moderno e arrojado Impulsiona o setor de palma no Brasil*. Óleos & Grãos v. 5, n. 25, p.16-21, jul./ago. 1995.

PFAU, M. C. *Oportunidade em óleo de palma e seus derivados*. Espuma, v. 10, n. 26, p.14-18, jul./set. 1994.

PORIM, *Palm oil update*. INFORM (International News on Fats, Oils and Related Materials), v.6, n.8, p. 884-894, ago. 1995.

PORIM, *Supply and Desappearance - A Review*. Palm oil developments, v.18, p. 19-22, abr. 1993.

RODRÍGUEZ, P. *Malásia, Novo Tigre Asiático*. Espuma, v.11, n.29, p.32-36, abr./jun. 1995.

SILVA, G. *Semente Promissora*. Revista Globo Rural, v.10, n.117, p.27-30, jul. 1995.

SUNDRAM, K.; BASIRON, Y.; IBRAHIM, A. *Market Acceptance of Palm Oil: The Nutritional Angle*. Palm Oil Developments, v. 21, p.28-30, set. 1994.

VEIGA, A.S. *A cultura do Dendê como Opção de Investimento*. In: PALESTRA DURANTE LANÇAMENTO DO PÓLO AGROINDUSTRIAL DO NORDESTE PARAENSE, 1994. Palestra apresentada.

YAIK, L.K. *Discurso de Orientação*. In: SEMINÁRIO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PARCERIA ENTRE O BRASIL E A MALÁSIA ATRAVÉS DO INVESTIMENTO NA INDÚSTRIA DO ÓLEO DE PALMA, 1996. Abertura. São Paulo, 1996.



ANDREIA DA SILVA FERRAZ

Graduanda em Engenharia Agrônoma - ESALQ/USP e bolsista do grupo PET Gerenciamento e Administração da Empresa Agrícola (CAPES).



ELAINE CRISTINA CASTELHADRO

Graduanda em Engenharia Agrônoma - ESALQ/USP e bolsista do grupo PET Biotecnologia Agrícola (CAPES).



SÍLVIA SICOLI SEOANE

Graduanda em Engenharia Agrônoma - ESALQ/USP e bolsista do grupo PET Gerenciamento e Administração da Empresa Agrícola (CAPES).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "Luiz de Queiroz"

PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

Síntese de cDNA a partir de mRNA de
Gallus gallus.

Dezembro de 1998

Bolsista: Elaine Cristina Castelhana

Orientador: Prof. Dr. Luiz L. Coutinho

SUMÁRIO

1. RESUMO	2
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Origem Embrionária do Tecido Muscular Esquelético:	5
3.2. Função e Classificação do GDF-8:	6
3.3. Relação entre GDF-8 e Animais de Musculatura Dupla:	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Obtenção da Sonda	11
4.1.1. Extração do RNA total	12
4.1.2. Obtenção do cDNA do Gene do GDF-8:	12
4.1.3. Amplificação do cDNA com " primers" específicos ao Gene do GDF-8:	13
4.1.4. Purificação e Quantificação do Produto Amplificado em Géis de Agarose	15
4.1.5. Reação de Ligação do cDNA do GDF-8 em Vetor de Expressão:	16
4.1.6. Preparação de Bactérias Competentes	17
4.1.7. Transformação de Bactérias com o Plasmídeo pGEM-4Z [®] Contendo o Fragmento de DNA do Gene do GDF-8	18
4.1.8. Minipreparação do DNA Plasmidial das Bactérias	20
4.1.9. Confirmação da Identidade do Produto Amplificado	22
4.1.10. Sequenciamento do Fragmento Clonado	22
4.1.11. Reações de Transcrição <i>in vitro</i> para Obtenção do RNA "antisense" do GDF-8 Marcado com Digoxigenina	23
4.1.12. Quantificação e Hidrólise da Sonda	25
4.2. Hibridização <i>in situ</i>	28
4.2.1. Incubação dos Ovos e Coleta dos Embriões	28
4.2.2. Pré-Hibridização e Hibridização	29
4.2.3. Lavagens e Imunodeteção	30
5. RESULTADOS:	32
5.1. Síntese da Sonda de RNA "antisense" marcado com digoxigenina para o GDF-8	32
5.2. Análises de Hibridização <i>in situ</i>	37
6. DISCUSSÃO:	40
7. CONCLUSÕES:	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	44

1. RESUMO

Com a finalidade de investigar o padrão local e temporal da expressão do mRNA do fator de crescimento GDF-8 (growth and differentiation factor-8) em galinha (*Gallus gallus*), vários experimentos de hibridização *in situ* foram realizados. Para a viabilização destes experimentos, uma sonda de RNA “antisense” foi sintetizada através da técnica de RT-PCR (transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase) que foi utilizada para a síntese de cDNA a partir do mRNA dos embriões de galinha. Para a obtenção de um fragmento específico à região do GDF-8 a ser utilizada como molde para a síntese da sonda, foram realizadas reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) com “primers” específicos a este gene, em seguida procedeu-se a clonagem deste fragmento em um vetor de expressão para a viabilização das reações de transcrição reversa, responsáveis pela síntese do RNA “antisense” marcado com digoxigenina correspondente ao GDF-8 que foi empregado como sonda nas análises de hibridização *in situ*. Os resultados obtidos por RT-PCR revelaram expressão do GDF-8 em embriões nos estágios 12, 18, 20 e 24 da embriogênese, segundo classificação morfológica descrita por Hamburger & Hamilton (1951), e também no músculo peitoral de uma ave adulta. As análises de hibridização *in situ* detectaram expressão apenas nos embriões nos estágios 20 e 24, entretanto, permitiu a visualização dos tecidos responsáveis por esta expressão, que são os somitos e regiões próximas ao coração.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil produz cerca de 4.600.000 toneladas de carne de frango pronta para consumo, o que o coloca como terceiro maior produtor mundial deste item, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e pela China. Com relação às exportações, o Brasil ocupa também a terceira posição, apesar de 87,9% da quantidade total produzida ser destinada ao consumo interno, sendo ele também o terceiro maior consumidor (Anualpec 1998).

Os dados acima justificam o fato da carne de frango ser a proteína animal de menor custo no país, possibilitando o acesso das faixas mais pobres da população, o que é importante já que a proteína animal apresenta um maior valor biológico do que a vegetal.

Em maio de 1997, McPherron *et. al.* (1997) caracterizaram um novo gene que foi chamado GDF-8 (growth and differentiation factor-8) ou miostatina. Este gene é um dos fatores de regulação do desenvolvimento muscular, e atua de forma negativa no crescimento da musculatura esquelética. Neste mesmo trabalho foi mostrado que uma desrupção na sequência deste gene inibindo sua expressão causa uma resposta expressiva na deposição muscular esquelética de camundongos.

Tendo em vista a importância da manipulação deste gene nos animais produtores de carne para se obter uma maior eficiência produtiva, este trabalho visou estudar a expressão local e temporal da miostatina em embriões de galinha (*Gallus gallus*) através de técnicas de hibridização "*in situ*" e RT-PCR.

Os resultados deste trabalho servem também como subsídio para a realização de futuros estudos direcionados, por exemplo, para o desenvolvimento de moléculas inibidoras dos sinais ativadores da expressão do GDF-8. Estes estudos, além de contribuírem no setor agropecuário, poderão ser úteis também no tratamento de doenças musculodegenerativas tais como distrofia muscular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ORIGEM EMBRIONÁRIA DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO:

A musculatura esquelética é originada na fase embrionária, a partir de células precursoras de mioblastos localizadas nos somitos (Slack, 1997). Estes mioblastos, após sua proliferação, fundem-se formando as fibras multinucleadas características do tecido muscular esquelético, que não possuem mais a capacidade de se dividir.

Ao longo do desenvolvimento pós-natal, ainda pode haver um aumento no número de núcleos por fibra, este é causado pela fusão das fibras já existentes com uma população de células mononucleadas chamadas de “células satélite”, possivelmente derivadas de mioblastos embriônicos que persistem na vida adulta.

Após o uso destes mioblastos remanescentes, não é mais possível o aumento no número de células, ocorrendo apenas um aumento no tamanho, que pode ser desencadeado por exercícios físicos.

3.2. FUNÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO GDF-8:

O mecanismo de formação do tecido muscular esquelético é coordenado por vários fatores de crescimento e diferenciação celular. Estes fatores pertencem a diferentes famílias e são classificados de acordo com suas características bioquímicas e funções.

O GDF-8 (“growth and differentiation factor-8”) ou miostatina é um dos fatores de crescimento e diferenciação muscular pertencentes à superfamília TGF- β (“Transforming growth factor- β ”). Os membros desta família desempenham funções importantes na regulação do desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase em tecidos de animais adultos (McPherron et. al.,1997).

Segundo McPherron et al (1997), análises bioquímicas têm possibilitado a classificação do GDF-8 como um novo membro desta superfamília devido à presença de sequências sinais para secreção; um sítio de processamento proteolítico e uma região carboxi-terminal contendo padrões conservados de resíduos de cisteína.

Como a maioria dos outros membros da família TGF- β , o GDF-8 parece ser altamente conservado entre as espécies (McPherron et al, 1997), sugerindo que a função biológica deste gene é promover um controle negativo do desenvolvimento muscular esquelético. A partir das informações acima, Slack (1997) sugere que a miostatina ou GDF-8 atue como uma espécie de inibidor do número de divisões dos mioblastos e do grau de alargamento das fibras.

O GDF-8 foi descrito pela primeira vez por McPherron et al (1997), em um trabalho empregando camundongos transgênicos em que o gene GDF-8 foi inativado por recombinação homóloga. Os animais mutantes, nulos quanto à expressão do GDF-8, eram significativamente maiores que os selvagens, apresentando 2 a 3 vezes mais massa em alguns músculos esqueléticos.

Em adição, no mesmo trabalho, experimentos de hibridização *in situ* realizados em camundongos nos estágios iniciais da embriogênese, revelaram que a expressão do GDF-8 é restrita ao miótomo dos somitos em desenvolvimento. Em animais adultos, através da técnica de “Northern Blotting”, foi observado que a expressão do GDF-8 ocorreu especificamente no tecido muscular. Entretanto, Losinski et al (1998) detectou expressão deste gene na glândula mamária de suínos, o que indica que ele possa estar envolvido no seu desenvolvimento e/ou na lactação.

A partir das informações obtidas por McPherron *et. al.* (1997a) em seu trabalho pioneiro, McPherron & Lee (1997) desenvolveram um novo estudo envolvendo algumas raças bovinas que apresentam o fenótipo de musculatura dupla (raças “Belgian Blue” e “Piedmontese”).

Nos animais da raça “Belgian Blue”, foi detectada uma deleção de 11 nucleotídeos no terceiro exon da sequência do gene da miostatina, provocando a eliminação da região ativa da molécula. A sequência da miostatina dos animais da raça “Piedmontese” apresentou uma mutação na região madura da proteína, decorrente da substituição de uma tirosina por uma cisteína. A similaridade entre os fenótipos dos bovinos de musculatura dupla e dos camundongos nulos para a

expressão da miostatina sugere, novamente, que ela desempenha a mesma função biológica em diferentes animais.

3.3. RELAÇÃO ENTRE GDF-8 E ANIMAIS DE MUSCULATURA DUPLA:

Diferente do que ocorre com camundongos, uma mutação que anule a atividade da miostatina em bovinos causa uma redução no tamanho dos órgãos internos e um modesto aumento na massa muscular (20-25% nos animais da raça “Belgian Blue” comparado com 200-300% em camundongos deficientes em miostatina). Isto pode ocorrer pois os bovinos, tendo sofrido maior seleção para massa muscular, estariam próximos do limite máximo de deposição de tecido muscular, ao passo que os camundongos não passaram por este processo seletivo (Mc Pherron & Lee, 1997).

O mesmo trabalho aponta fortes indícios de que o GDF-8 seja análogo ao *locus* da hipertrofia muscular (*mh*), que está localizado no cromossomo 2 dos bovinos, idêntica a uma região do cromossomo 2 de humanos determinada através de hibridização *in situ* como o gene da miostatina humana. No caso de suínos, Sonstegard (1998) localizou o gene da miostatina no cromossomo 15, que também está relacionado com o gene da miostatina em humanos e em bovinos.

Grobet et al (1997), estudando a segregação do gene da miostatina em bovinos “Belgian Blue”, sugere que ela apresenta-se na forma autossômica recessiva. Para reforçar esta hipótese, McPherron & Lee (1997) apontam o fato da

ocorrência de mutações no gene da hipertrofia muscular e da miostatina apresentarem as mesmas consequências, que são caracterizadas por uma diminuição no tamanho dos órgãos, na quantidade de gordura intramuscular e de tecido conectivo, acompanhada de um aumento de 20-25% na massa muscular esquelética.

É importante observar que, mesmo com uma maior massa muscular, os animais de musculatura dupla podem trazer algumas consequências indesejáveis, tais como uma diminuição na fertilidade das fêmeas com este fenótipo, menor viabilidade da prole e atraso na maturação sexual, embora na raça "Belgian Blue", o aumento na massa muscular acompanhado de uma melhor conversão alimentar tenha se mostrado suficiente na compensação destas falhas (McPherron & Lee, 1997 e Grobet et al., 1998).

Tentativas no sentido de aumentar a eficiência alimentar e o crescimento dos animais do rebanho pela inserção de genes únicos codificando proteínas como o hormônio do crescimento vêm falhando por pelo menos três motivos. Primeiro, hormônio do crescimento é apenas um dos muitos outros fatores envolvidos no crescimento, como fatores de crescimento e suas respectivas proteínas de ligação, insulina, somatostatina e outras. Segundo motivo, o crescimento é um processo biológico complexo que requer um controle preciso do alvo, quantidade e especificidade do tecido ao gene expresso. Terceiro, possíveis progressos em camundongos nem sempre poderão ser aplicados em rebanhos de animais domésticos." (Westhusin, 1997).

Apesar dos possíveis efeitos indesejáveis provenientes da manipulação da expressão gênica, o gene da miostatina apresenta-se como uma

grande arma na produção da massa muscular animal, principalmente pelo fato de disrupções neste gene já ocorrerem naturalmente, o que indica que sua manipulação pode não interferir em outros sistemas de crescimento ou resultar em patologias anormais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Animal - ESALQ/USP, em Piracicaba e compreendeu duas etapas distintas: a) obtenção da sonda de RNA "antisense" específica ao GDF-8 e marcada com digoxigenina e b) detecção do padrão de expressão do mRNA por análises de hibridização *in situ* e RT-PCR em embriões de galinha em diferentes estágios do desenvolvimento.

4.1. OBTENÇÃO DA SONDA

A obtenção da sonda de RNA "antisense" específica para o gene do GDF-8 e marcada com digoxigenina envolveu três etapas: transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase para a obtenção do fragmento do cDNA a ser utilizado como molde para a sonda, clonagem e reação de transcrição "*in vitro*", onde foi realizada a síntese do RNA "antisense" e a marcação através da incorporação de nucleotídeos ligados à digoxigenina.

4.1.1. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi extraído a partir de embriões de galinha com idades de 48, 72, 96 horas e também do músculo peitoral de animais adultos pelo método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987).

Para isso, o tecido muscular e os embriões foram coletados e colocados em tubos estéreis de 1,5ml onde foram adicionados 750 µl de Trizol e 250 µl de água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) para a inativação de RNAses. Logo após este procedimento, os tubos foram agitados no vortex para a desintegração dos tecidos e então foram incubados a 25 °C por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio e houve um novo período de incubação por 10 min. a 25 °C. Em seguida o material foi centrifugado por 10 min. a 4 °C, 10000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 ml de etanol 75% e novamente centrifugado por 15 min., 4 °C a 9000 rpm. Após secagem, o pellet foi ressuspendido em 100 µl de água DEPC.

4.1.2. OBTENÇÃO DO cDNA DO GENE DO GDF-8:

Para a síntese do cDNA, foram adicionados em 1 µg de RNA total, 0,5µg de oligo dT e água DEPC em um volume final de 12µl. O oligo dT é uma sequência de timinas que têm função de anelar-se com cauda poli A característica dos mRNA para seleção deste entre os outros tipos de RNA (RNA ribossômico e

RNA transportador). Esta mistura permaneceu a 70 °C por 10 minutos para a ruptura das regiões de estrutura secundária que podem envolver a cauda poliA. Após este período, houve uma incubação em gelo por 1 minuto para o anelamento do oligo dT utilizado como "primer" nesta reação. A cada tubo foram adicionados 7µl de uma solução contendo 2µl PCR buffer 10x, 2µl de MgCl₂ 25mM, 1µl dNTP mix e 2µl DTT 0,1M, os tubos foram mantidos a 42 °C por 5 minutos, e em cada tubo foram adicionadas 200 unidades da enzima Superscript II RT (Gibco/BRL). Após adição da enzima, seguiu-se um novo período de incubação a 42 °C por 50 minutos, durante o qual procedeu-se a síntese das fitas de cDNA, finalmente a enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 1µl de RNase H por tubo e estes foram mantidos a 37 °C por 20 minutos.

4.1.3. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA COM " PRIMERS" ESPECÍFICOS AO GENE DO GDF-8:

"Primers" específicos ao gene do GDF-8 de galinha foram desenhados a partir da sequência de seu RNA mensageiro (mRNA) de 1128 pares de bases (bp), disponível em bancos de sequências gênicas (AF019621).

As sequências dos "primers" direto e reverso utilizados foram: 5'AGTAGCGATGGCTCTTTGGA³ e 5'CTGGGAATGTGACAGCAAGA³, respectivamente. Estes "primers" flanqueiam uma região do gene do GDF-8 situada entre os nucleotídeos 301 e 727, resultando em um produto com 427 bp.

A reação de amplificação foi otimizada a partir de 2 μ l de cDNA de músculo de animais adultos nas seguintes condições: 2 μ l de cDNA, 5 μ l 10x PCR buffer, 1,5mM de MgCl₂, 0,5 μ M do primer direto para GDF-8, 0,5 μ M do primer reverso para GDF-8, 0,2 mM de dNTP e 1,25 unidades de Taq DNA polimerase em um volume final de 50 μ l.

O programa utilizado teve vários ciclos distintos conforme indicado pela metodologia denominada “touch down”, utilizada para diminuir a presença de bandas inespecíficas nas reações de PCR. Esta metodologia baseia-se no princípio de que, ao iniciarmos os ciclos com temperaturas de anelamento mais elevadas, aumentaremos a especificidade da ligação dos “primers” na fita molde gerando mais produtos específicos para serem transcritos.

Sendo assim, após a abertura inicial das fitas a 92 °C por 2 minutos os ciclos foram utilizados: um ciclo a 92 °C por 1 minuto 72°C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, um ciclo a 92 °C por 1 minuto 71°C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, um ciclo a 92 °C por 1 minuto 70°C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, um ciclo a 92 °C por 1 minuto 69°C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, 30 ciclos a 92 °C por 1 minuto 68°C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto e finalmente uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Visando ainda uma otimização com relação à presença de bandas inespecíficas geradas na reação de PCR, foi utilizado, simultaneamente ao “touch down” o método do “hot start”, no qual a *Taq* DNA polimerase só é adicionada após os dois primeiros minutos de desnaturação das fitas, durante a desnaturação de um minuto presente no primeiro ciclo. Este procedimento evita que a enzima

comece a agir a temperaturas menores que a de anelamento, o que pode ocasionar a ligação dos “primers” em locais inespecíficos da fita molde.

4.1.4. PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO EM GÉIS DE AGAROSE

O fragmento amplificado com 427 bp foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% e a banda correspondente ao fragmento de interesse foi excisada do gel. Procedeu-se a purificação do fragmento segundo o protocolo do Sephaglas™ Band Prep Kit® (Pharmacia Biotech), com a única diferença de que após a secagem do pellet, o DNA foi ressuspenso em 30 µl de tampão de eluição e não em 20 µl como recomendado.

Após purificação, o DNA eluído foi quantificado em gel de agarose 1,2%, a partir das concentrações conhecidas das bandas do padrão de peso molecular λDNA/Hind III (Gibco/BRL). A quantidade de DNA obtida após purificação do fragmento foi estimada em 10 ng/µl.

4.1.5. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO cDNA DO GDF-8 EM VETOR DE

EXPRESSÃO:

O fragmento de cDNA do gene da miostatina com 427 bp. foi ligado ao vetor de expressão pGEM[®]4-Z (Promega), um plasmídeo com 2746 bp, que apresenta as seguintes características: sequências dos promotores para as enzimas SP6 e T7 RNA polimerase flanqueando a região do polilinker, situado no gene do Lac Z, além de um sítio de resistência à ampicilina. Inicialmente, esse plasmídeo foi linearizado e defosforilado, para isso, 10 µg do plasmídeo circular foram digeridos com enzima *Sma*I em tampão one phor all plus[®] 10x concentrado (Pharmacia Biotech) em um volume final de digestão de 50 µl. A esta reação foram adicionadas fosfatase alcalina 20x concentrada e 0,1 unidade da enzima A fosfatase alcalina remove o fosfato 5' dos fragmentos de DNA para impedir que haja ligação do vetor nele próprio. Em seguida, procedeu-se a incubação por 30 minutos a 37 °C e aquecimento por 15 minutos a 85°C para a inativação da fosfatase alcalina. A reação de ligação foi realizada conforme protocolo do Sure Clone Kit[®] (Pharmacia Biotech), onde foram adicionadas enzima klenow, tampão blunting/kinase 10x concentrado e polinucleotídeo kinase a 100 ng da reação do cDNA do GDF-8 amplificado segundo os volumes indicados pelo fabricante. Esta mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, recebeu 20 µl da solução 50:48:2 fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e foi purificada em uma coluna MicroSpin[®]. O produto purificado foi ligado no vetor, entretanto, ao invés de utilizar o plasmídeo

do kit, foram utilizados 50 ng do plasmídeo pGEM-4Z[®] (Promega) previamente linearizado e defosforilado numa reação contendo o efluente da coluna, 2x tampão de ligação, DTT, e enzima T4 DNA ligase que cataliza as ligações fosfodiéster entre a hidroxila 3' e o terminal fosfato 5' do DNA. Seguiu-se um período de incubação de 2 horas a 16°C.

4.1.6. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Bactérias *E. coli* da linhagem JM 109 foram tornadas competentes para transformação, segundo o protocolo descrito por Hanahan (1985). Inicialmente as células foram plaqueadas em meio LB contendo 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl; 4% ágar; 10 mM de MgCl₂. As células permaneceram na estufa a 37°C por 15 horas para crescimento das colônias.

Após obtidas as colônias, uma delas foi escolhida, coletada da placa e inoculada em 3 ml de meio SOB (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; pH 6,7-7,0). Este inóculo foi mantido a 37°C sob forte agitação em por aproximadamente 15 horas. Posteriormente, 50 µl desta cultura foram transferidos para 50 ml de meio SOB e permaneceram a 37°C sob forte agitação até atingirem um valor de densidade ótica (D.O.) entre 0,5 e 0,6. Após 4 horas de incubação, foram adicionados 500 µl de MgCl₂ 1M a esta cultura e estas células foram transferidas para tubos estéreis gelados de 30 ml. Os tubos foram mantidos a no gelo por 15 minutos e procedeu-

se a centrifugação por 10 minutos a 4°C, 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspendido em 10 ml de meio RF I (100 mM KCl; 10 mM MnCl₂; 30mM acetato de potássio; 10 mM CuCl₂.2H₂O; 15% glicerol;). A cultura foi mantida no gelo por 15 minutos e em seguida, foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, o pellet foi ressuspendido em 2 ml de meio RF II (10 mM Na MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CuCl₂.2H₂O e 15% de glicerol;). Este volume foi separado em alíquotas de 100 µl, sendo imediatamente congelada em N₂ e estocada a -70°C.

4.1.7. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COM O PLASMÍDEO pGEM-4Z®

CONTENDO O FRAGMENTO DE DNA DO GENE DO GDF-8

Um volume de 100 µl de bactérias *E. coli* JM 109 competentes foi descongelado no gelo por 5 minutos e em seguida foram adicionados 2 µl da reação de ligação, obtida como descrito no ítem 4.1.5. Esta mistura permaneceu no gelo por 20 minutos. Foi promovido um choque térmico pela incubação a 42°C por 40-50 segundos procedendo-se nova incubação no gelo por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados 950 µl de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO₄) ao tubo contendo as bactérias e o plasmídeo contendo o inserto de cDNA do GDF-8 foi mantido a 37°C, com agitação por 1 hora e meia e procedeu-se o plaqueamento.

Durante o plaqueamento, foram realizados três tipos de controle: o primeiro constituiu-se de uma placa contendo apenas meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl; 4% ágar) e *E. coli* sem o inserto, neste teste obteve-se, após incubação das placas a 37 °C por 15 horas, uma cobertura completa da superfície do meio de cultura com células bacterianas, o que era esperado para a certificação de que estas células estavam viáveis. O segundo controle foi realizado utilizando-se uma placa com meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl; 4% ágar) e contendo 0,1 mg de ampicilina por ml de meio, plaqueada com *E. coli* não transformada, nenhuma colônia cresceu neste meio, já que sem o plasmídeo pGEM-4Z[®] esta bactéria não tem resistência a este antibiótico, permitindo que este antibiótico possa ser utilizado como um fator de seleção, e garantindo o crescimento de colônias originadas de bactérias transformadas.

O terceiro e último teste foi realizado em uma placa contendo LB e ampicilina na concentração mencionada acima, 0,1 mM IPTG (isopropiltio β-D galactosidase) e 50 µg/ml X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida). Esta placa recebeu *E. coli* transformada com o plasmídeo pGEM-4Z[®] sem o inserto de DNA, apenas colônias azuis foram obtidas neste controle, conforme o esperado pois como o inserto de DNA estava ausente, o gene do Lac-Z permaneceu intacto, exercendo sua função de produzir β-galactosidase para a degradação da lactose e da X-gal, uma lactose sintética que ao ser degradada forma um precipitado azul, dando esta cor às colônias.

As demais placas continham 0,1 mg de ampicilina/ml de meio, 0,1 mM IPTG e 50 µl/ml X-gal, elas receberam o produto da transformação e após incubação a 37°C por pelo menos 13 horas, permitiram a seleção das colônias transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento de DNA de interesse.

4.1.8. MINIPREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DAS BACTÉRIAS

Para a extração do DNA plasmidial das bactérias, uma das colônias brancas resultantes da clonagem, contendo o plasmídeo ligado ao fragmento de DNA do GDF-8, foi isolada da placa e inoculada em 5 ml de meio LB líquido a 37°C por 15 horas, com agitação.

Após este período, 1,5 ml da cultura foram coletados e centrifugados a 13000 rpm por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 200 µl de GET (50 mM glicose; 2,5 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Neste instante uma solução SDS 1%, NaOH 0,2 N foi preparada e 300 µl foram adicionados ao tubo, este foi misturado por inversão e incubado em gelo por 5 minutos.

Terminado o período de incubação, 300 µl de acetato de potássio 3 M (3M acetato de potássio; 11,5% ácido acético glacial) foram adicionados a esta mistura e os tubos foram agitados e novamente mantidos em gelo por 5 minutos, quando então foram centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. 10 µl de RNase 1 mg/ml foram

adicionadas a esta solução e seguiu-se um período de incubação por 30 minutos a 37°C para a remoção do RNA total das amostras.

Após ação da RNase, 400 µl de clorofórmio foram adicionados ao tubo e este foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto. Após centrifugação a fase superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, onde foram adicionados igual volume de iso-propanol absoluto, seguido por nova centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O "pellet" de DNA foi lavado em 500 µl de etanol 70% e seguiu-se nova centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O "pellet" de DNA secou à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e foi ressuscitado em 32 µl de água milli-Q.

Ao DNA ressuscitado foram adicionados 8 µl de NaCl 4 N e 40 µl de PEG 13% e após homogeneização, esta mistura permaneceu em gelo por 20 minutos quando então foi centrifugada a 13000 rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao "pellet" foram adicionados 500 µl de etanol 70%, seguiu-se uma nova centrifugação a 13000 rpm, por 5 minutos e o "pellet" foi mantido à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos, sendo ressuscitado em 20 µl de água milli-Q.

4.1.9. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DO PRODUTO AMPLIFICADO

A identidade do produto amplificado com 427 bp foi realizada por clivagem com a enzima de restrição *EcoRI*. Para isso, 6 µl do cDNA amplificado foram digeridos com 8,5 unidades desta enzima em solução contendo buffer one phor all 1x (Pharmacia Biotech). A digestão ocorreu a 37 °C por 2 horas e a separação do produto digerido foi realizada em gel de agarose 3%.

4.1.10. SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO CLONADO

Foi realizado o sequenciamento do inserto de cDNA clonado no plasmídeo pGEM-4Z® seguindo as instruções do BigDye® kit (Perkin Elmer) para uma confirmação mais precisa de sua identidade e orientação no plasmídeo.

Para isso, 500 ng de DNA foram empregados em uma reação contendo 2 µl do Kit-MIX; 3,2 pmol do "primer" M13 universal ($5'$ GTAAAACGACGGCCAGT $3'$) e 6 µl de tampão (200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂) em um volume total de reação de 20 µl.

Para a amplificação das fitas foi utilizado um ciclo com as seguintes temperaturas: 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C por 5 segundos (anelamento) e 60°C por 4 minutos (extensão) em um total de 25 ciclos. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas pela adição de 80 µl de isopropanol

75% e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos o sobrenadante foi descartado e o "pellet" de DNA foi ressuscitado em 250 µl de isopropanol 75% e uma nova centrifugação foi realizada a 15000 rpm por 15 minutos. O "pellet" de DNA foi seco, ressuscitado em 4 µl de "loading buffer" (5:1 formamida: "loading buffer") e o DNA foi desnaturado a 98°C por 2 minutos. O gel de acrilamida 4,25% [Gel Mix® (Gibco)] foi carregado com 1 µl desta reação e o tempo de corrida foi de 7 horas no sequenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer).

4.1.11. REAÇÕES DE TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* PARA OBTENÇÃO DO RNA

"ANTISENSE" DO GDF-8 MARCADO COM DIGOXIGENINA

Para que a reação de transcrição *in vitro* resulte no produto esperado, foi necessário fazer uma linearização do plasmídeo e posterior extração com fenol/clorofórmio, para que o DNA plasmidial a ser utilizado como fita molde tivesse elevada pureza.

A linearização do plasmídeo contendo o inserto do GDF-8 ocorreu na presença da enzima *KpnI*, cujo sítio de restrição situa-se adjacente à extremidade 5' do inserto de cDNA clonado. Foram utilizados na reação buffer react 4 (Gibco/BRL) 10x; 30 unidades da enzima *KpnI* e 3,5 µg do DNA plasmidial contendo o inserto de cDNA em um volume final de reação de 50 µl.

Para a extração com fenol/clorofórmio, o volume da reação de digestão foi completado com água milli-Q para 100 μ l, foi adicionado igual volume da mistura fenol/clorofórmio na proporção 1:1 e houve uma centrifugação a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase superior foi recuperada e em seguida adicionou-se NaCl 5M para concentração final de 100 mM e o 2 vezes o volume de etanol absoluto. Esta mistura permaneceu a -20°C para precipitação.

Após a precipitação do DNA, houve uma nova centrifugação a 12000 rpm, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi lavado em 150 μ l de etanol 70%. Novamente os tubos sofreram uma centrifugação idêntica a anterior e o "pellet" foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μ l de água milli-Q.

A enzima *KpnI*, empregada na linearização do plasmídeo, deixa extremidades protuberantes nas fitas de DNA, o que atrapalha a reação de transcrição *in vitro* porque resulta na produção de produtos inespecíficos. Para solucionar este problema, as extremidades protuberantes foram eliminadas com a utilização da enzima klenow. Nesta reação, 1 μ g do DNA linearizado recebeu 1,5 μ l de tampão de transcrição 10x e 6,43 unidades da enzima klenow em um volume final de reação de 15 μ l. Esta mistura permaneceu a 22°C por 15 minutos e então os demais reagentes para a reação de transcrição *in vitro*, pertencentes ao DIG RNA Labelling Kit® (Boehringer Mannheim), foram adicionados. Segundo o protocolo deste kit, adicionou-se 2 μ l de mistura de NTP marcado com digoxigenina, 2 μ l da enzima T7 RNA polimerase, 1 μ l de inibidor de RNase e seguiu-se um período de incubação por 2 horas a 37°C.

Neste momento o que nos interessa é o RNA transcrito, então, para eliminar o DNA restante no tubo, foram adicionados 2 μl de DNase livre de RNase e seguiu-se um novo período de incubação por 15 minutos a 37°C. Esta reação foi interrompida com a adição de 2 μl de solução EDTA 0,2 M. O RNA "antisense" marcado foi precipitado a -20°C por 12 horas com 2,5 μl de LiCl 4M e 75 μl de etanol pré-resfriado.

Após precipitação, o RNA foi centrifugado a 12000 rpm, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi lavado em 50 μl de etanol 70% gelado e seguiu-se uma nova centrifugação nas condições mencionadas acima. O "pellet" de RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 100 μl de água DEPC, adicionou-se 1 μl de inibidor de RNase, incubando por 30 min. a 37°C.

4.1.12. QUANTIFICAÇÃO E HIDRÓLISE DA Sonda

A sonda foi quantificada em uma membrana de nylon contendo as seguintes diluições do RNA dig-marcado obtido na reação de transcrição *in vitro*: 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000. A membrana de nylon recebeu 1 μl de cada diluição das amostras experimentais e controle (presentes no kit), correspondendo a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$; 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$; 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$; e 10 $\text{pg}/\mu\text{l}$, respectivamente. Após colocadas as gotas na membrana, esta foi mantida em estufa a 80°C por 30 minutos, umedecida em tampão maleato (100 mM de ácido

maleico pH 7,5; 150 mM NaCl), incubada por 5 minutos em solução de "northern blocking" (1:5 solução de "northern blocking" 10%/tampão maleato) e posteriormente nova incubação por 5 minutos em solução de "northern blocking" contendo 0,20% anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina. Finalizadas as incubações, a membrana de nylon foi lavada em tampão maleato e incubada por 2 minutos em 2,5 ml de Genius buffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl e 50 mM MgCl₂). A revelação dos sinais foi efetuada por 1 hora em Genius buffer 3 contendo 9 µl de NBT (nitro blue tetrazolium chloride) e 7 µl de X- fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato).

Pela comparação com os padrões do kit, a quantidade de sonda obtida foi estimada em aproximadamente 30 ng/µl.

A hidrólise da sonda em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases serve para facilitar a entrada do RNA dig-marcado nos tecidos a serem hibridizados. Foram hidrolisados 0,2 µg de RNA "antisense" marcado com digoxigenina adicionando-se 20 µl de água DEPC e 40 µl de tampão carbonato (60 mM Na₂CO₃; 40 mM NaHCO₃ pH 10,2), seguido por um período de incubação por 10 minutos a 60°C. Após esta fase, foram adicionados 80 µl de tampão de neutralização (1 M Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl); 1µl de glicogênio 20 mg/ml e 480 µl de etanol absoluto para precipitar o RNA. A precipitação ocorreu a -70°C por 12 horas.

Após o período de precipitação, houve uma centrifugação a 12000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O "pellet" obtido foi lavado em 100 µl de etanol 70%, e

após nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, o "pellet" foi seco e ressuspendido em 20 µl de água DEPC.

Para verificar se a hidrólise ocorreu satisfatoriamente, foi preparado um gel de agarose 1,5% para RNA em condições desnaturantes com 3 ml de tampão de corrida 10x concentrado (0,2 M MOPS pH 7,0; 80 mM de acetato de sódio e 10 mM EDTA), 0,45 g de agarose e 5,4 ml de formaldeído. Foram aplicados no gel 1 µl do controle do kit (aproximadamente 760 bp), 3 µl da sonda hidrolisada e 3 µl da sonda não hidrolisada, entretanto, estas amostras foram desnaturadas por 7 minutos a 65°C antes da aplicação.

Após a corrida dos fragmentos no gel, este foi lavado 2 vezes em SSC 10x (1,5 M de NaCl; 150 mM de citrato de sódio pH 7,0) por 10 minutos cada lavagem e colocado em um sistema de transferência composto por uma ponte de papel Whattmann e papel de filtro embebidos em SSC 10x. O gel foi recoberto por uma membrana de nylon e papel de filtro também embebidos em SSC 2x, e finalmente várias camadas de papel toalha foram dispostas, um peso foi colocado sobre o sistema para aumentar o contato entre seus componentes. A transferência ocorreu por 16 horas e então a membrana de nylon foi retirada do sistema e colocada em estufa a 80°C por 30 minutos para que o RNA fosse fixado a ela, em seguida a membrana foi umedecida em tampão maleato (100 mM de ácido maleico pH 7,5; 150 mM NaCl; pH 7,5), incubada por 5 minutos em solução de "northern blocking" 10% e novamente por 5 minutos em solução de "northern blocking" contendo 0,2% anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina. A membrana foi então lavada 2 vezes em tampão maleato por 5 minutos cada uma, incubada em

Genius buffer 3 por 2 minutos e, finalmente, por 9 minutos em 2 ml de Genius buffer 3 contendo 9 μ l de NBT e 7 μ l de x-fosfato por 2 horas.

4.2. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU

As análises de hibridização *in situ* foram realizadas com embriões de galinha, segundo protocolo descrito por Coutinho *et al.* (1992).

4.2.1. INCUBAÇÃO DOS OVOS E COLETA DOS EMBRIÕES

Os ovos utilizados nestas análises foram provenientes da Granja “Ninho Verde”, situada no município de Tietê – SP. Antes de serem incubados, estes ovos foram mergulhados em uma solução 0,05% proxitane e expostos ao ambiente para secagem. Este tratamento foi utilizado visando uma desinfecção microbiana da casca dos ovos.

Após a desinfecção, os ovos foram incubados em uma incubadora automática a 37°C, com movimentação periódica, por 72 horas e 96 horas respectivamente. Apesar dos embriões terem a mesma procedência, em períodos de incubação idênticos foram detectadas diferenças no grau do desenvolvimento dos mesmos, o que fez com que eles fossem classificados de acordo com seu estágios de desenvolvimento, segundo trabalho publicado por Hamburger & Hamilton (1951).

Passado o período de incubação, os embriões foram coletados dos ovos com o auxílio de papel de filtro e material cirúrgico, foram lavados em PBS 1x (0,14M NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄; pH 7,4) e fixados em paraformaldeído 4% dissolvido em PBS 1x, por 12 horas a 4°C.

Após a fixação, os embriões passaram por uma lavagem em etanol 70% e, com o auxílio de uma lupa e pinças, foram separados de suas membranas envoltórias.

4.2.2. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO

Inicialmente os embriões foram colocados em tubos eppendorfs de 1,5 ml e sofreram seguidas desidratações de 2 minutos cada em 1 ml de etanol nas seguintes concentrações: 80%, 95% e duas vezes em etanol absoluto, a primeira por 2 minutos e a última por 5 minutos. Em seguida foram incubados por 5 minutos em 1ml de solução 1:1 etanol/xileno e por 30 minutos em xileno.

Antes da reidratação, os embriões foram lavados 5 vezes em etanol absoluto e então foram reidratados com lavagens consecutivas de 2 minutos cada em etanol 95%, 80% e 70% respectivamente. Em seguida os embriões foram lavados 3 vezes em PBT-3 (PBS 1x contendo 0,3% de TRITON X-100) por 2 minutos cada lavagem.

Os embriões foram digeridos em tampão proteinase K (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 30 µg/ml de proteinase K) a 37°C, sendo os embriões

de 72 horas digeridos por 10 minutos, enquanto os de 96 horas foram digeridos por 15 minutos. Após digestão com proteinase K, foram realizadas 3 lavagens de 2 minutos cada com PBT-3 e os embriões foram incubados por 10 minutos em 200 μ l de uma solução 1:1 de solução de hibridização [50% formamida; 4x SSC; 1x solução Denhardt's (5 g Ficoll, 5 g polivinilpirolidona, 5 g albumina de soro bovino em um volume final de 500 ml); 0, 5 μ g/ml DNA de esperma de salmão desnaturado, 0,25 μ g/ μ l tRNA de levedura e 10% dextran sulfato] / PBT-3.

Em seguida, foi realizada a etapa chamada de pré-hibridização, na qual os embriões foram incubados em 100 μ l de solução de hibridização por 3 horas a 57°C.

A hibridização inicia-se ao colocarmos a sonda em contato com o embrião. Primeiramente, a sonda foi diluída em solução de hibridização até atingir a concentração final de 1 ng/ μ l. Em seguida, esta solução contendo a sonda foi desnaturada a 65°C por 15 minutos e foi então adicionada aos embriões, que foram incubados por aproximadamente 45 horas a 57°C.

4.2.3. LAVAGENS E IMUNODETECÇÃO

Uma série de lavagens foram realizadas após a hibridização, inicialmente com 100 μ l de solução de hibridização por 5 minutos a 57°C e em seguida a solução de hibridização foi substituída e prodedeu-se um novo período de incubação na mesma temperatura por 2,5 horas. Finalmente ocorreu a última

troca da solução de hibridização onde os embriões foram incubados a 57°C por mais 16 horas.

Novas lavagens foram realizadas alterando as proporções de solução de hibridização/PBT-3. Estas lavagens ocorreram por 30 minutos cada e as proporções foram de 80%/20%; 60%/40%; 40%/60%; 20%/80% solução de hibridização/PBT-3 respectivamente. Finalmente os embriões foram lavados duas vezes em 500 µl de PBT-3 por 1 hora cada lavagem.

A imunodeteccção iniciou-se no momento em que foram adicionados aos embriões 500 µl de PBT-3 contendo 5% de soro de galinha, estes passaram por um período de incubação de 1 hora. Em seguida a mesma solução foi trocada e foram adicionados 0,25 µl de anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina ficando este diluído 2000 vezes). Após um período de incubação de 2 horas, os embriões sofreram duas lavagens rápidas em 500 µl de PBT-3 e uma série de 5 lavagens de 20 minutos cada em 500 µl de PBT-5 (PBS 1x contendo 0,5% de Triton X-100). Os embriões finalmente foram lavados duas vezes em CT-3 (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂ pH 9,5; 0,3% Triton X-100) por 15 min. cada lavagem.

A reação de desenvolvimento da cor ocorreu em 500 µl de CT (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; pH 9,5) contendo 4,5 µl de NBT (nitro blue tetrazolium chloride) e 3,5 µl de X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). Os embriões incubados nesta solução foram mantidos no escuro e a reação de desenvolvimento da cor demorou 12 horas para ser concluída. Esta reação é interrompida adicionando-se TE (100 mM Tris-HCl, ph 7,5 e 10 mM EDTA) aos embriões.

5. RESULTADOS:

Para a detecção do mRNA do gene do GDF-8 em embriões de galinha, foram necessárias duas etapas.

A primeira foi a síntese da sonda de RNA “antisense” dig-marcada. Esta etapa exigiu a extração de RNA total dos embriões, síntese de cDNA, ampliações com “primers” específicos ao GDF-8, clonagem, sequenciamento para confirmar identidade do fragmento a ser utilizado como molde para a sonda, minipreparação do DNA plasmidial e finalmente os ensaios de transcrição *in vitro*, quantificação e hidrólise da sonda.

A segunda etapa envolveu as análises de hibridização *in situ* propriamente ditas com o emprego da sonda sintetizada na etapa anterior e também as análises de RT-PCR.

5.1. SÍNTESE DA SONDA DE RNA “ANTISENSE” MARCADO COM DIGOXIGENINA PARA O GDF-8

Após a extração do RNA total e síntese de cDNA, primers específicos ao GDF-8 foram empregados em reações de amplificação em cadeia da polimerase.

A visualização de um fragmento de 427 bp permitiu identificar a expressão do GDF-8 em embriões de galinha nos estágios: 12 (correspondente a embriões com 48 horas de incubação), 20 (correspondente a 72 horas de

incubação), 24 (correspondente a 96 horas de incubação) e também em tecido muscular de animais adultos (Figura 1).

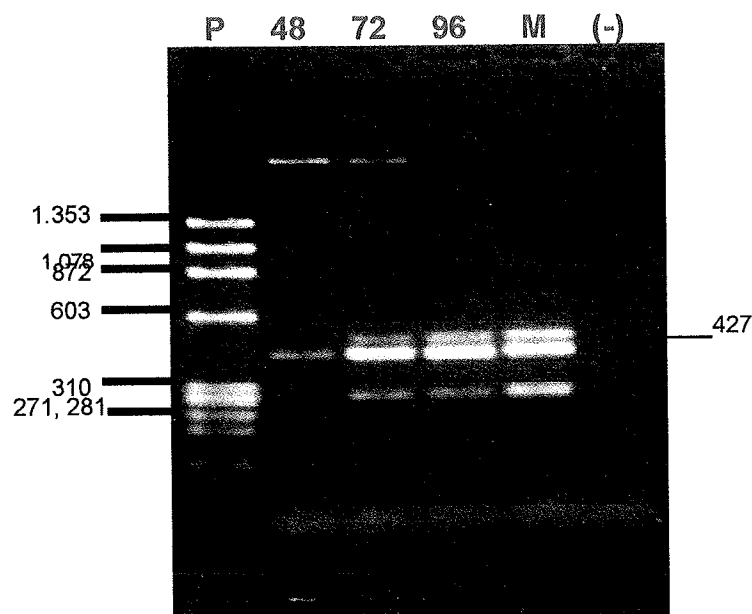


Figura 1: Análise da expressão do GDF-8 através da técnica de RT-PCR: **P)** Padrão ϕ X/*Hae*III de peso molecular, o tamanho das bandas está em bp.; **48, 72, 96)** cDNA de embriões com 48, 72 e 96 horas de incubação respectivamente, amplificado com "primers" específicos do GDF-8; **M)** cDNA do músculo peitoral de uma ave adulta amplificado com "primers" específicos ao GDF-8; **(-)** controle negativo (sem cDNA)

Este fragmento de 427 bp do gene do GDF-8 teve sua identidade confirmada por digestão com enzima de restrição e sequenciamento e foi utilizado como fita molde para a síntese da sonda de RNA "antisense" ao gene do GDF-8. Para isso foi recuperado do gel de agarose, purificado e quantificado também neste tipo de gel por comparação com a intensidade das bandas do padrão λ /*Hind*III, cuja concentração das bandas é conhecida. O padrão ϕ X 174/*Hae*III também foi utilizado para a confirmação do tamanho do fragmento

obtido e a quantificação resultante deste método foi uma concentração de DNA de 10 ng/ μ l.

Após a clonagem do inserto purificado no vetor de expressão pGEM[®]-4Z as colônias foram selecionadas através da utilização de X-Gal e ampicilina e foi realizada a minipreparação do DNA plasmidial contendo o inserto e também do DNA plasmidial sem inserto para confirmar se houve realmente a ligação do fragmento no vetor, o que realmente ocorreu com sucesso, como pode ser visualizado na Figura 2 pela diferença de tamanho entre as bandas.

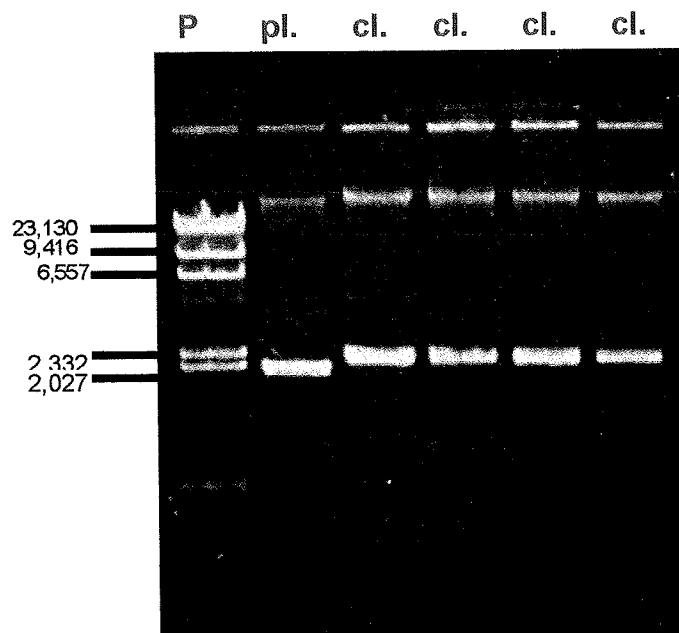


Figura 2: Gel de minipreparação do DNA plasmidial: **P)** padrão de peso molecular λ /HindIII O tamanho das bandas está em bp.; **pl.)** plasmídeo pGEM-4Z[®]; **cl.)** clones do plasmídeo pGEM-4Z[®] contendo cDNA do fragmento do GDF-8.

Após confirmação do tamanho do inserto com enzima de restrição foi realizado o sequenciamento dos clones para confirmar a identidade do fragmento

de 427 bp amplificado da região compreendida entre os nucleotídeos 301 a 727 do gene do GDF-8. Embora o sequenciamento não tenha ocorrido de maneira a permitir a obtenção de todos os nucleotídeos deste fragmento, os resultados obtidos foram suficientes para a confirmação de sua identidade e orientação(Figura 3).

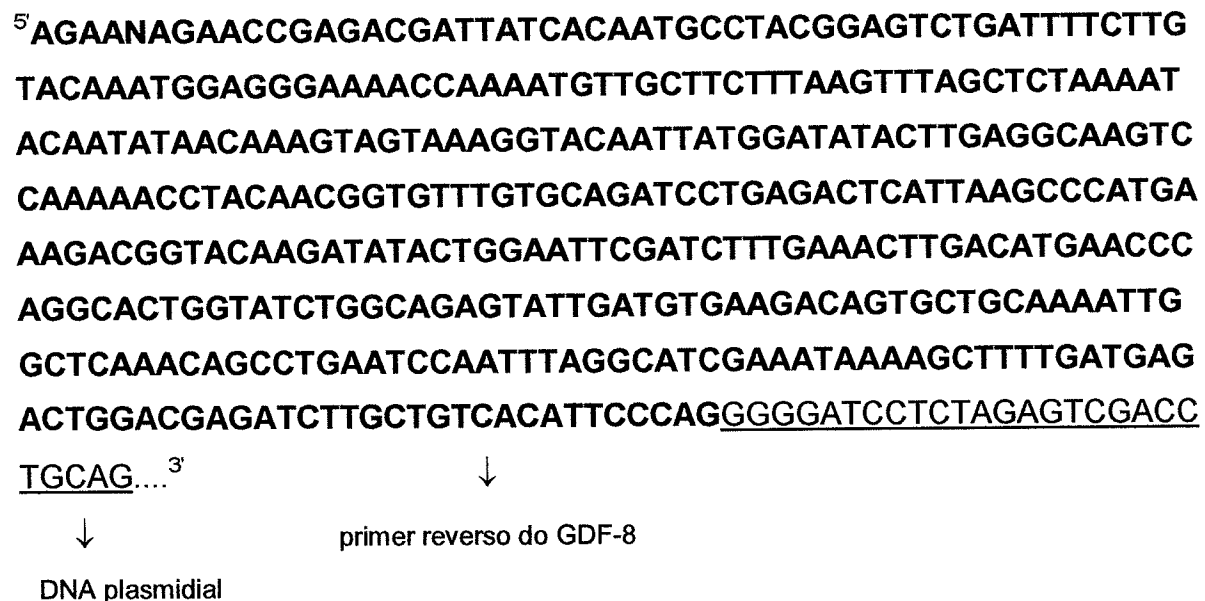


Figura 3: Sequência direta do fragmento de 427 bp do gene do GDF-8.

O plasmídeo contendo o inserto foi linearizado com a enzima *KpnI* (Figura 4) e utilizado na síntese da sonda de RNA "antisense" marcada com digoxigenina.

Após a síntese da sonda com o DIG RNA Labelling Kit[®] (Boehringer Mannheim), esta foi quantificada por "Dot Blot" com base em amostras controle presentes no mesmo kit. Esta quantificação resultou em uma concentração de 30 ng de sonda/μl (Figura 5a). A hidrólise foi verificada pela técnica de "Northern Blot"

(Figura 5b) e após diluição da sonda na concentração desejada iniciaram-se as análises de hibridização *in situ*.

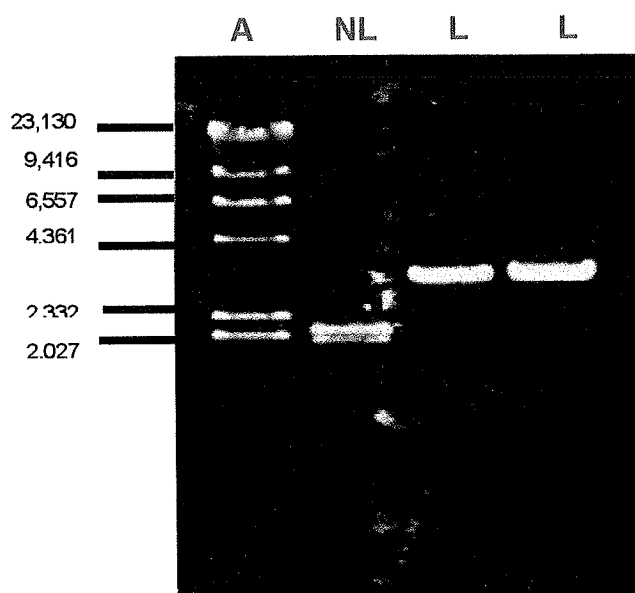


Figura 4: Confirmação da digestão do plasmídeo com a enzima *KpnI*: A) Padrão de peso molecular λ *HindIII*, o tamanho das bandas está em bp.; NL) plasmídeo pGEM-4Z® não linearizado contendo o inserto de cDNA do GDF-8; L) plasmídeo linearizado contendo o inserto de cDNA do GDF-8.

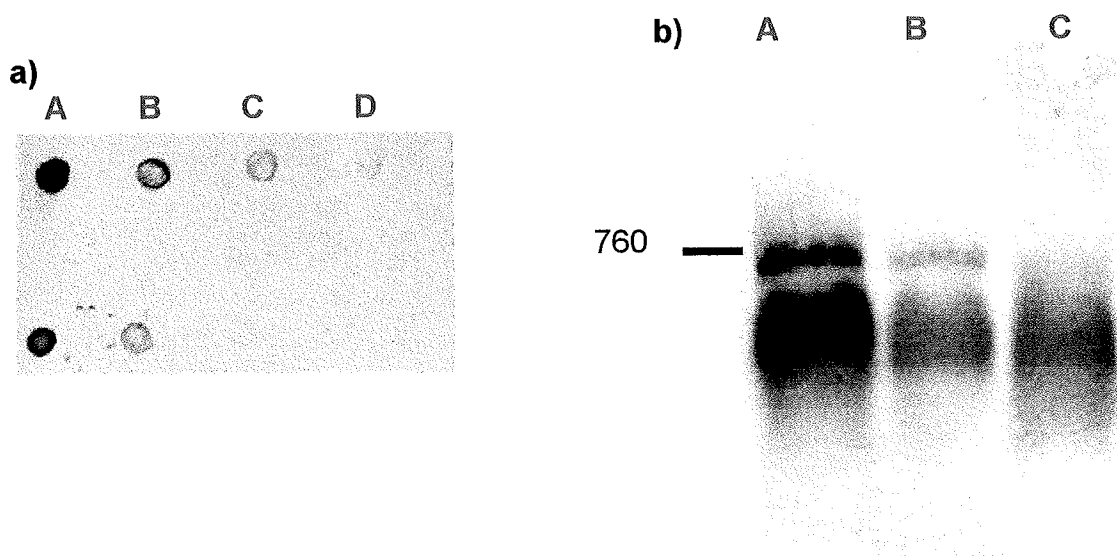


Figura 5: Quantificação e hidrólise da sonda. a) "Dot Blot" para estimativa da quantidade de sonda obtida: A=1 μ g/ μ l, B=10ng/ μ l, C=1ng/ μ l, D=0,1ng/ μ l; b) "Northern Blot" indicando hidrólise da sonda: A=controle do kit com 760 bp., B=sonda não hidrolizada, C= sonda hidrolizada.

5.2. ANÁLISES DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Através da técnica de hibridização *in situ* pudemos identificar os locais dos embriões que expressam GDF-8 nas diferentes fases de seu desenvolvimento.

Como pode ser observado na Figura 6a, embriões no estágio 18 do desenvolvimento ainda não apresentam sinais da expressão deste gene por hibridização *in situ*. Embriões um pouco mais desenvolvidos, no estágio 20 da embriogênese, apresentaram sinais nos somitos mais posteriores que são os mais novos (Figura 6b). Houve uma heterogeneidade com relação ao sinal nos somitos ao longo do corpo do embrião, sendo que os somitos localizados na porção mediana apresentam sinal pouco intenso ou inexistente. Os embriões no estágio 24 apresentaram uma marcação bem mais intensa em relação aos embriões no estágio 20, entretanto, nem todos os somitos apresentam sinais com a mesma intensidade. Na região mediano-caudal o sinal de expressão é bem mais forte (Figura 6c e 6d).

Outra observação importante é com relação ao domínio dos somitos a expressar o GDF-8. Inicialmente (embriões no estágio 20), a expressão se localiza na porção distal do somito com relação ao complexo tubo neural/notocorda (Figura 7a), entretanto, nos embriões mais desenvolvidos (estágio 24), este sinal se espalha pelo domínio dos somitos tornando-se mais intenso (Figura 7b).

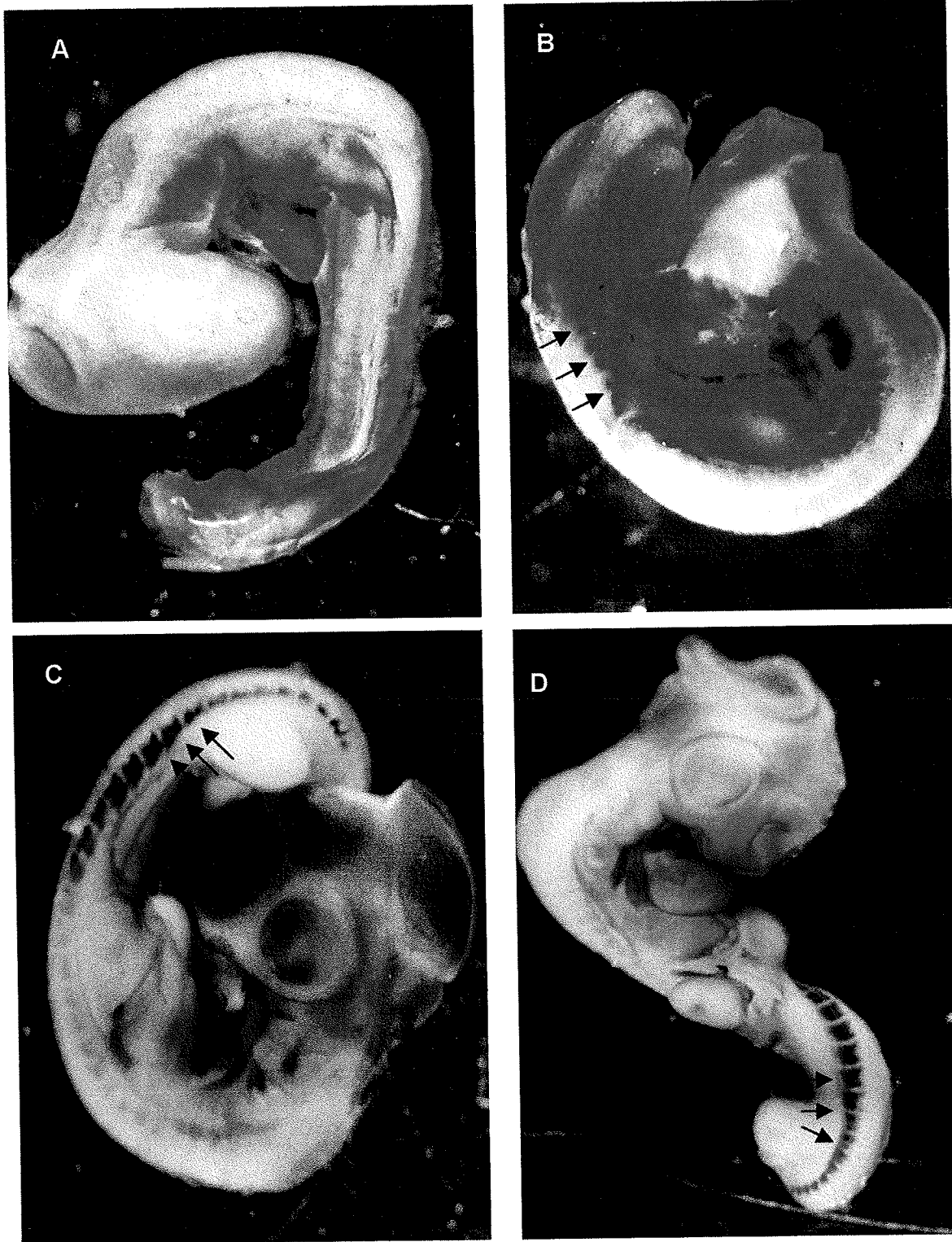


Figura 6: Embriões de galinha hibridizados com a sonda de RNA "antisense" para o GDF-8. **A)** embrião no estágio 18 (aum. 18x); **B)** embrião no estágio 20 (aum. 12x); **C)** e **D)** embriões no estágio 24 (aum. 10x). As setas indicam alguns locais onde há marcação gerada pela sonda.

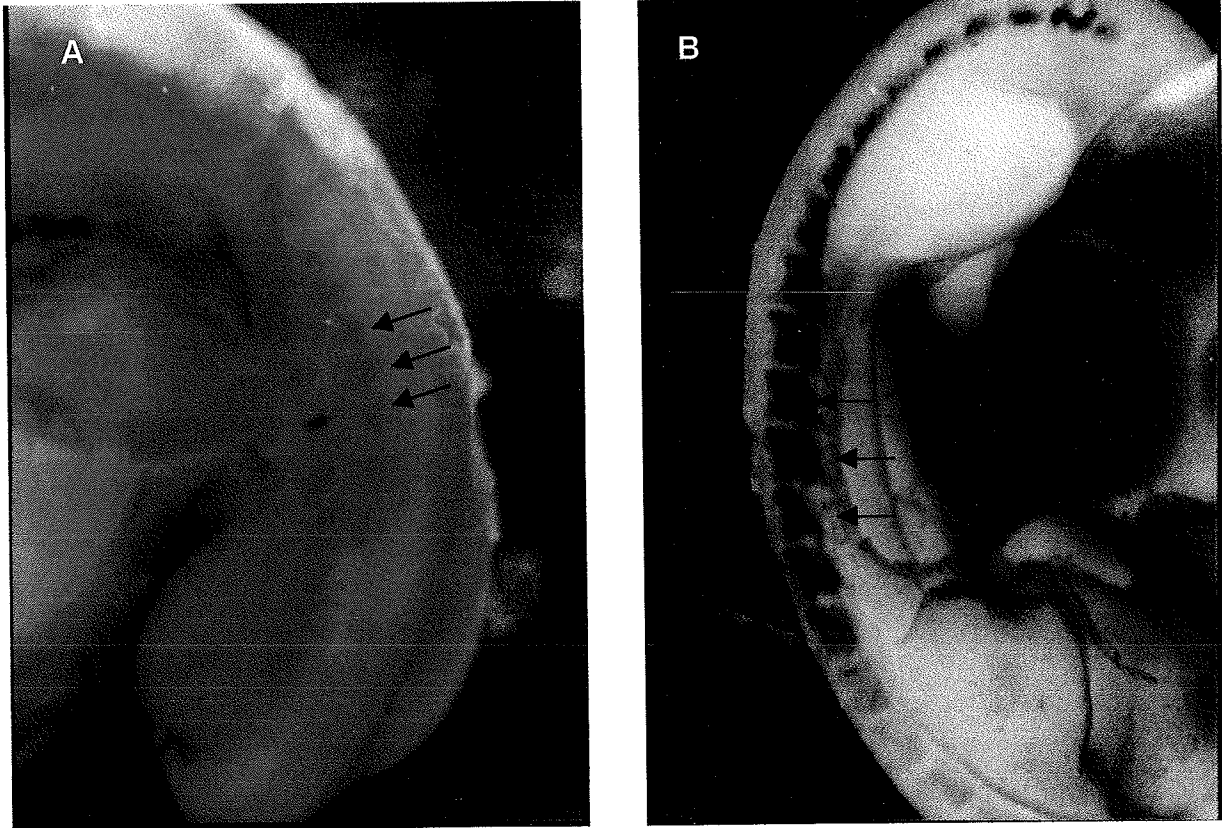


Figura 7: Região caudal de embriões hibridizados com a sonda de RNA “antisense” específica ao gene GDF-8. **A)** embrião no estágio 20 (aum. 35x); **B)** embrião no estágio 24 (aum. 21x). As setas indicam algumas regiões marcadas pelo sinal da sonda.

6. DISCUSSÃO:

De acordo com o conhecimento prévio das características inerentes aos membros da superfamília TGF- β e também da caracterização bioquímica e molecular do GDF-8 através de estudos realizados em camundongos (McPherron *et. al.* 1997a), podemos dizer que os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa estão coerentes com a literatura, embora nenhum estudo anterior tenha sido realizado em aves.

Os resultados mostram que em embriões de galinha o GDF-8 está sendo expresso em tecidos que originarão a musculatura esquelética, confirmando seu caráter músculo específico. Alguns embriões apresentam uma marcação na região da cabeça, entretanto esta não está presente em todas as repetições como ocorre com os somitos, o que levanta a hipótese de esta ser uma marcação inespecífica.

A intensidade das bandas referentes ao gene do GDF-8 obtidas pela técnica de RT-PCR, varia entre embriões em diferentes estágios do desenvolvimento. Observamos que embriões no estágio 12 (48 horas de incubação) apresentam uma banda com menor intensidade do que embriões nos estágios 20 e 24, o que sugere que a expressão deste gene em embriões neste estágio seja menor. Quando a expressão foi analisada por hibridização *in situ*, este sinal só foi detectado visualmente em embriões a partir do estágio 20.

O fato de embriões no estágio 20 apresentarem marcação restrita à região distal do domínio somítico com relação ao tubo neural/notocorda e esta

marcação se espalhar por todo o somito em embriões mais desenvolvidos (estágio 24) levanta a hipótese da interação de outros fatores miogênicos na expressão do GDF-8. Estes fatores podem estar sendo liberados através do complexo tubo neural/notocorda, já que este desempenha importante papel no controle da miogênese (Maroto *et al.* 1997; Stern *et al.* 1997 e Pownall *et al.* 1996).

Os somitos da região mediana superior dos embriões de galinha no estágio 24 podem também ter a expressão do GDF-8 inibida por outros fatores presentes nesta região ou, ainda apresentar condições de maior dificuldade ao acesso da sonda.

O estudo aprofundado do modo de ação do GDF-8 nos animais fornecedores de carne para consumo humano é muito importante, uma vez que alterações na expressão deste único gene já são suficientes para a obtenção de respostas significativas no desempenho dos animais (McPherron *et al.* 1997a).

Após obtido o conhecimento necessário sobre a ação deste gene no organismo, este poderá ser manipulado de modo a favorecer uma maior eficiência na produção de proteína animal através, por exemplo, da síntese de moléculas bloqueadoras de sua expressão.

Estudos mais avançados seriam necessários, entretanto, para que a expressão do GDF-8 pudesse ser regulada, tanto em sua intensidade como em seu momento de ação, uma vez que, em fêmeas a obtenção de um desenvolvimento muscular muito elevado poderia acarretar problemas no momento da parição e também menor fertilidade reprodutiva, como já foi observado nos bovinos com esta característica (McPherron & Lee, 1997).

7. CONCLUSÕES:

As técnicas de RT-PCR e hibridização *in situ* mostraram-se adequadas no estudo da expressão do fator de crescimento GDF-8.

Os ensaios de RT-PCR são mais rápidos e apresentaram maior sensibilidade na detecção da expressão do GDF-8 quando comparados com a técnica de hibridização *in situ*, desta maneira, permitiram que fosse traçado um perfil temporal da expressão deste gene.

Os experimentos de hibridização *in situ*, embora menos sensíveis na detecção da expressão do GDF-8, possibilitaram a visualização dos tecidos embrionários que expressam este fator nos embriões a partir do estágio 20 do desenvolvimento.

Através destes estudos foi possível identificar que nos embriões de galinha a expressão do GDF-8 apresenta um perfil muito semelhante àquele citado na literatura em estudos envolvendo camundongos.

A expressão do GDF-8 em galinhas já está presente em embriões no estágio 12 do desenvolvimento e continua presente no tecido muscular de animais adultos.

Os somitos de embriões de galinha no estágio 20 apresentam sinais da expressão deste gene inicialmente numa região específica, localizada na porção distal com relação ao complexo tubo neural/notocorda e em embriões no estágio 24 este sinal já atinge todo o domínio somítico.

Há heterogeneidade na intensidade de expressão do GDF-8 com relação à localização dos somitos nos embriões.

Muitas pesquisas precisam ser realizadas para identificar os fatores que interagem na expressão do GDF-8 de modo que ele possa ser manipulado a favor de uma maior eficiência na produção de proteína animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANUALPEC. Avicultura, p. 283-295, 1998.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

COUTINHO L. L. *et al.* Whole mount *in situ* detection of low abundance transcripts of the myogenic factor qmf1 and myosin heavy chain protein in quail embryos. **Biotechniques**, v. 13, n. 5, p. 722-724, 1992.

GROBET, L. *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71-74, September, 1997.

GROBET, L. *et al.* Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 210-213, 1998.

HAMBURGER V. & HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. **Journal of Molecular Biology**, v. 116, p. 557-580, 1983.

- LOSINSKI, J. S. *et al.* Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **American Journal of Physiology**, v. 275 (4 Pt 2), p. 1265-1273, Oct. 1998.
- MAROTO, M. *et al.* Ectopic *Pax-3* activates *MyoD* and *Myf-5* expression in embryonic mesoderm and neural tissue. **Cell**, v. 89, p. 139-148, april 4, 1997.
- McPHERRON, A. C.; LAWLER, A. & LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v. 387, p. 83-90, May, 1997.
- McPHERRON, A. C. & LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 94, p. 12457-12461, November, 1997
- POWNALL, M. E.; STRUNK, K. E. & EMERSON, C. P. Jr. Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quail embryos. **Development**, v. 122, p. 1475-1488, 1996.
- SLACK, J. M. W. Growth control: Action mouse. **Current Biology**, v. 7, n. 8, p. 467-469, 1997.
- SONSTEGARD, T. S.; ROHRER, G. A. & SMITH, T. P. L. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analysis. **Animal Genetics**, v.29, p. 19-22, 1998.
- STERN, H. M.; LIN-JONES, J. & HAUSCHKA, S. D. Synergistic interactions between bFGF and TGF- β family member may mediate myogenic signals from the neural tube. **Development**. v. 124, p. 3511-3523, 1997.

WESTHUSIN, M. From might mice to might cows. **Nature Genetics**, v. 17, p.4-5, September, 1997

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA *Xanthomonas albilineans*

Departamento de Genética

Orientador: Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares

Co-orientadores:

- Ms. Keila Maria Roncato Duarte
- Ms. Luiz Humberto Gomes

Aluno: Fábio Henrique Bicudo da Silva

1998

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	20

1. INTRODUÇÃO

O uso de anticorpos monoclonais tem possibilitado conhecer vários processos biológicos de importância para a Agricultura. Existem vários exemplos de aplicações práticas, principalmente no diagnóstico de doenças e de marcas genéticas relacionadas a alguma proteína. Muitos anticorpos são comercializados atualmente na forma de “kits” para determinações rápidas e precisas. Apesar das vantagens desta tecnologia, sua aplicação ainda é bastante pequena na área vegetal quando comparada à área animal.

Tem-se recorrido à métodos baseados em sorologia no estudo das moléstias, inclusive como método quantitativo, principalmente envolvendo fitopatógenos de difícil identificação, seja porque a sintomatologia não oferece a precisão desejada ou porque não há evidência de sintomas nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura. Neste sentido, é inquestionável o valor de metodologias que permitam o diagnóstico precoce o que representa uma grande aplicação na agricultura, desde a certificação de mudas ou a exportação de produtos *in natura*. Este diagnóstico pode portanto significar tanto a garantia de lucros como evitar perdas decorrentes da infestação assintomática de culturas ou dos produtos agrícolas.

Devido a sua alta especificidade, anticorpos tem sido utilizados para purificar, classificar, identificar e quantificar substâncias de interesse biológico (Trione, 1988). A sorologia baseada em anticorpos policlonais oferece anticorpos que variam na quantidade e qualidade, dependendo do animal que os produziu.

A utilização de anticorpos monoclonais (Kohler & Milstein, 1975), por outro lado, embora envolva maiores custos e mão-de-obra especializada, apresenta vantagens em relação aos anticorpos policlonais, como a obtenção de grandes quantidades de anticorpos altamente específicas em relação ao antígeno. A tecnologia atualmente torna possível produzir tais anticorpos em escala industrial, com recursos de preservação adequados para viabilizar seu uso econômico. Desde que células produtoras destes anticorpos podem ser mantidas como clones idênticos, passam a constituir em fonte inesgotável de reagentes altamente sensíveis e específicos.

Como consequência de que a presença de fitopatógenos obedece a particularidades regionais e da cultura em questão, a produção de anticorpos monoclonais para fins

agronômicos, precisa ser feita para atender a tais condições específicas. Isto pode representar notável avanço tecnológico, oferecendo por exemplo, altíssima confiabilidade, redução do tempo necessário ao diagnóstico ou à certificação, e certamente menores custos, quando comparado aos demais recursos empregados como as quarentenas e testes biológicos.

As inúmeras possibilidades de aplicação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais no setor agrícola, em várias fases do processo produtivo, de estocagem e comercialização de produtos, vem também auxiliando na solução de alguns problemas e contribuindo para melhorar a eficiência de outras tecnologias.

Devido ao fato de que tanto comercialmente como academicamente mais se evidenciam aplicações fitopatológicas da sorologia com anticorpos monoclonais, pretende-se nesta revisão concentrar a atenção no importante aspecto do diagnóstico de fitopatógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A escaldadura da cana-de-açúcar é uma importante bacteriose, causada pela *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson e é encontrada em mais de 57 países, onde a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente (Rott et al., 1995).

Por ter seus sintomas confundidos com os do Raquitismo da Soqueira, as perdas ocasionadas por este patógeno não são representativas, estando muito abaixo da realidade. No caso de variedades de cana-de-açúcar suscetíveis, as perdas podem chegar até 100% da produção, pois todo o limbo foliar pode ser queimado e os colmos apodrecidos.

A grande maioria das plantações de cana-de-açúcar estão contaminadas pela bactéria. Isto ocorre porque quase todas as variedades comerciais são resistentes ou tolerantes, sendo então portadoras assintomáticas da doença.

A sintomatologia da escaldadura pode ser dividida em três grandes grupos: sintoma latente; sintoma crônico e sintoma agudo, sendo que os sintomas latentes predominam nos canaviais.

Ocasionalmente em colmos maduros observa-se a descoloração vascular na região nodal (sintoma latente), assemelhando-se à "vírgula" do raquitismo da soqueira,

provocando então o erro na determinação do patógeno ali presente. Para evitar este erro, a identificação deve ser feita através da sorologia ou isolamento do patógeno em meios seletivos.

Algumas variedades apresentam, além dos sintomas latentes, sintomas crônicos, tais como o aparecimento de estrias brancas em grandes áreas do limbo foliar, podendo chegar até à bainha em locais muito favoráveis ao patógeno. Além disso, ocorre um grande número de brotações das gemas laterais, havendo uma descoloração do xilema na região nodal, estendendo-se até o nó.

Nas variedades suscetíveis ou em condições muito favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, há o aparecimento de sintomas agudos, chegando a ocorrer a queima total das folhas, como se estas tivessem sido escaldadas.

O brotamento das gemas laterais pode não ocorrer conjuntamente à queima, dificultando assim o diagnóstico visual da doença. Quando as plantas já apresentam estes sintomas, a perda é total, não existindo assim produção. (Kimati et al., 1997).

A *X. albilineans* é uma bactéria da família *Pseudomonadaceae*, apresenta crescimento lento em meio de cultura específico (meio de Wilbrink, descrito mais adiante), é um bacilo de dimensões aproximadas de 0,25 ~ 0,3 x 0,6 ~ 1,0 mm, possui um único flagelo polar, é gram negativa, forma uma colônia amarela em meio de cultura, brilhante, convexa, de bordos lisos, viscosa, mas não mucóides. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 25 e 28 °C. Segundo Buchanan & Gibbons (1974), as bactérias do gênero *Xanthomonas* são quimiorganotróficas, nunca fermentativas.

A propagação deste patógeno pelos canaviais é feita por mudas contaminadas, facões de corte, colheitadeiras, roedores, etc. Nos viveiros de mudas, há também a forma de propagação por gutação.

Segundo Klett e Rott (1994), além destes meios de disseminação do patógeno, a água de irrigação, da chuva ou plantio de mudas contaminadas ao lado sadias também são importantes fontes de infecção.

Além da cana-de-açúcar, o milho doce também pode ser atacado pela *X. albilineans*, funcionando assim como hospedeiro alternativo para o patógeno. Segundo Hoy & Grisham (1994), a expressão da doença é determinada por uma complexa interação entre

o genótipo e fatores ambientais. O nível de resistência à escaldadura varia nos diversos clones de cana-de-açúcar.

Entre as variações ambientais que influenciam a severidade da doença estão a falta e o excesso d'água e a baixa temperatura. Isto evidencia que, em locais onde há variações de temperatura, a probabilidade da ocorrência da doença é maior que em locais onde não existe tal variação.

Os métodos de controle, contra a *X. albilineans*, estão mais voltados ao plantio de variedades resistentes ao patógeno. Mesmo assim, alguns métodos foram desenvolvidos para variedades susceptíveis, entre eles:

- tratamento térmico das mudas, visando eliminar possíveis bactérias ali existentes;
- preparo da área dos viveiros de mudas, afastando-o de canaviais doentes, ou de zonas contendo milho doce;
- obter matrizes sadias e manipulá-las em ambientes assépticos;
- tratamento de plantas contaminadas através de lavagem com água quente (Rott et al., 1996).

Segundo Zhang & Birch (1996), o controle biológico é uma excelente medida de controle para *X. albilineans*. Para tanto, deve-se utilizar uma suspensão bacteriana de *Pantoea dispersa* (syn. *Erwinia herbicola*) em plantas suspeitas de estarem contaminadas por *X. albilineans*. Segundo os autores, esta suspensão bacteriana é capaz de reduzir em até 98% a contaminação das plantas suscetíveis ao patógeno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento da bactéria

Foram colhidas partes do colmo e folhas de plantas de cana-de-açúcar exibindo sintomas típicos da doença (cedidas do campo experimental da ESALQ), seguindo o protocolo proposto por Akiba (1978). Pequenos pedaços de 0,50 cm² de folhas apresentando listras brancas e pequenos pedaços de feixes vasculares descoloridos do colmo, colhidos na região do nó, foram imersos em gotas de água esterilizadas na superfície de lâminas de vidro esterilizadas, para se constatar exsudação.

Com a pipeta Pasteur, coletou-se por capilaridade e o líquido foi depositado em placas de Petri com meio de cultura Wilbrink sendo espalhado com alça de Drigawski. As placas de culturas foram incubadas à 28 °C por 3 a 4 dias, quando apareceram colônias visíveis.

Ascolônias foram raspadas e passadas para 50 ml de meio Wilbrink líquido. Estes frascos foram crescidos sob agitação a 25 °C por 15 horas. Coletou-se 15 ml da suspensão que foi centrifugada e ressuspendida em 10 ml de PBS. Esta solução foi utilizada para imunização diluída 1:10 em PBS.

3.2. Imunização dos camundongos

Imunizou-se um lote de três camundongos fêmeas BALB/c a intervalos de 15 dias com suspensão celular contendo 10^7 células de *X. albilineans* em PBS.

A Primeira imunização foi feita na forma de injeções subcutâneas de 0,1 ml em quatro sítios diferentes, próximos às cadeias ganglionares (Hurn & Chantler, 1980) dos membros com Adjuvante Completo de Freund (F5881 - Sigma) e PBS na proporção de 1:3 (v/v).

A Segunda imunização foi, utilizando Adjuvante Incompleto de Freund (F5506 - Sigma) e PBS para incorporação do imunógeno, também por via subcutânea, na proporção de 1:3 (v/v).

As 4 imunizações seguintes foram feitas diluindo-se o antígeno em PBS, de forma a ter um volume final de 200 µl por camundongo, a ser injetado via intraperitoneal.

3.3. Coleta do soro e avaliação da titulação

Alíquotas de sangue foram coletadas antes de cada nova imunização, do plexo ocular dos camundongos e deixadas a 37 °C por 1 hora, para coagulação e centrifugadas a 200 g por 2 minutos para a separação do soro.

A titulação dos soros dos animais foi feita através de teste indireto de ELISA, para determinação da melhor concentração do antígeno necessário na sensibilização das placas e da concentração dos soros.

O melhor camundongo que respondeu ao esquema de imunizações, apresentando maior título em ELISA, foi usado para a realização da fusão, recebendo uma injeção intravenosa de 100 µl de uma suspensão 10^7 do antígeno em PBS, dois dias antes da fusão.

3.4. Ensaio imunoenzimático

A titulação dos soros de camundongo, bem como a análise dos sobrenadantes de cultura dos híbridos murinos obtidos, foram feitas numa primeira etapa, através de ensaio imunoenzimático. Resumidamente, as placas de polivinil de 96 orifícios são sensibilizadas com antígeno, colocando-se 50 µl por poço, sendo incubadas por 1 hora a 37 °C.

Após a sensibilização, os sítios ativos remanescentes do plástico foram bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (TB1) por poço, por mais uma hora a 37 °C, batendo-se a placa após este período para descarte do líquido em excesso. Em seguida diluições dos soros de camundongo a serem testados, foram adicionados às placas, nas diluições préestabelecidas, em duplicatas, e incubados por uma hora a 37 °C.

Os orifícios foram então lavados com 200µl de PBS-T-G por 3 vezes. A placa foi seca batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, fez-se a incubação, uma hora a 37°C, com conjugado anti-imunoglobulina IgG de camundongo marcado com peroxidase (leitura a 492 nm) ("blotting grade affinity purified goat anti-mouse IgG (H+L) human IgG conjugate" - Bio Rad). Na diluição de 1:000.

Após mais 3 lavagens com PBS-T-G, como descrito anteriormente, a reação foi revelada com peroxidase, utilizando-se orto-fenilenodiamina (OPD) contendo H_2O_2 , diluído em tampão de OPD, no escuro por 2 a 3 minutos e a reação foi bloqueada com solução de ácido sulfúrico 2,5M, procedendo-se a leitura em leitor de placa de ELISA, a 492 nm.

3.5. Células

Células da linhagem SP2/0Ag14 (SP2) de mieloma de camundongo, fornecidas pela UNIFESP, não secretoras de imunoglobulinas (Kearney et al.,1979) e resistentes à 8-azaguanina foram utilizadas para a realização da fusão (Shulman et al.,1985). As culturas

foram mantidas em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (R10), em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.6. Obtenção de "Feeder Layer" de macrófagos

O "feeder layer" de macrófagos (FDM) foi preparado 48 horas antes do uso, sendo utilizados camundongos singênicos da linhagem BALB/c. Cada camundongo foi sacrificado em éter etílico e lavado em seguida em água corrente, sendo mergulhado em solução de álcool a 70 % por 2 a 3 minutos. O camundongo é fixado com auxílio de agulhas, em placa de isopor recoberta por papel de alumínio, com a face ventral para cima.

Com uma pinça dente de rato, a pele do animal foi levantada com uma tesoura de ponta redonda, e realizado um pequeno corte. A partir deste corte, a tesoura vai descolando a pele do camundongo foi retirada, deixando exposta a cavidade peritoneal, tendo o cuidado de não rompê-la.

Com uma pinça de ponta lisa, a membrana que recobre a cavidade peritoneal foi levantada e furada com uma tesoura de ponta fina. Através desta abertura, uma pipeta plástica estéril contendo cerca de 2 a 3 ml de meio RPMI-1640, foi inserida no corte e a cavidade intraperitoneal lavada com esse meio, sendo recolhido logo em seguida, num tubo cônico esterilizado de 50 ml. Para as 10 placas de fusão foram utilizados 3 camundongos.

Os macrófagos foram mantidos a 37 °C em estufa incubadora de CO₂. Toda a operação foi realizada em fluxo de ar laminar.

3.7. Fusão celular

O camundongo que apresentou maior titulação através de teste de ELISA Indireto, teve seu baço retirado assepticamente sob fluxo laminar vertical e transferido para placa de Petri contendo 5 ml de meio RPMI. Com o auxílio de pinças, foi esmigalhado o órgão para a liberação das células. A suspensão celular foi então filtrada em tela de nylon para retirada dos fragmentos grosseiros. As células foram então transferidas para tubo cônico de 50 ml, que já continha de 2 a 5 x 10⁶ células SP2 obtidas de culturas semi-confluentes.

Adicionou-se à mistura de células, gota a gota, sob agitação leve e durante 30 segundos, 1 ml do agente fusionante preparado previamente, contendo polietilenoglicol

(PEG de PM 3000-3700, ATCC, Rockville, MD 20852, USA), mantendo agitação suave por um minuto. O passo seguinte compreendeu a diluição lenta da suspensão celular com meio de cultura RPMI, realizada adicionando-se, sob agitação suave, 1ml do meio em 30 segundos; 3 ml do meio em 30 segundos; 16 ml do meio por 60 segundos e finalmente, completando o volume para 50 ml. Após repouso de 5 minutos, seguiu-se centrifugação de 200 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 30 ml de meio R10 seguido de nova centrifugação.

Novamente o sedimento foi ressuscitado em meio HAT, em volume adequado para a distribuição nas placas de cultura de 96 poços (2 gotas por poço, equivalente a 100 ml de líquido), contendo "feeder layer" de macrófagos (FLM) também cultivadas em meio HAT.

3.8. Congelamento e descongelamento de células

O congelamento de hibridomas foi feito em alíquotas de 1 ml contendo 0,5 ml de meio de congelamento mais 0,5 ml da suspensão de células contendo 4×10^6 células, obtendo uma concentração final de 2×10^6 células por ml, estocadas à -70°C .

O descongelamento de células de mieloma foi efetuado em banho-maria a 37°C , transferindo-se imediatamente para tubos de centrífuga e diluindo-se gota a gota em 9 ml de meio R10. As células foram mantidas em repouso por 5 minutos e centrifugadas à 200 g por 6 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram novamente ressuscitadas em 1 ml de meio R10 e transferidas para garrafas de cultura de 25 cm^2 contendo 4 a 5 ml de meio R10 fresco.

As células foram então cultivadas em meio R10, a 37°C , em estufa automática mantenedora de atmosfera de 95% de umidade e 5 % de CO_2 .

3.9. Soluções utilizadas

PBS

- 8 g de NaCl

- 0,2 g de KCl

- 1,15 g de Na_2HPO_4

- 0,2 g de KH_2PO_4

O volume foi completado para 1 litro com água destilada, e o pH acertado para 7,36.

Tampão de Bloqueio - TB1

- PBS

- 1% de BSA (Soro Albumina Bovina)

Tampão PBS-T-G

- PBS

- 0,05 % de Tween 20

- 0,25 % de gelatina

Tampão de OPD

- 12,15 ml de ácido cítrico 0,4 M

- 25,7 ml de Na_2PO_4 0,4 M

- 300 ul de H_2O_2 30 vol.

O volume foi completado para 200 ml com água destilada e o pH foi acertado para 5,3, ficando armazenado no escuro a 5°C.

3.10. Meios de cultura utilizados

Meio de Wilbrink

-0,5% de Peptona

-0,05% de K_2HPO_4

-0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

-1,0% de Sacarose

-2,0% de Ágar

Meio Básico RPMI - 1640

O meio RPMI-1640 (sem bicarbonato, contendo L-glutamina) (1 pacote por litro) foi dissolvido em água mili-Q, acrescentando:

- 2,0 g de NaHCO₃
- 5,96 g de HEPES (p.m. 238,3)
- 40 mg de gentamicina
- β - mercaptanol na concentração final de $5 * 10^{-5}$ M.

O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4 com HCl ou NaOH e o volume foi completado para 1 litro. O meio foi filtrado em um sistema Millipore (filtro de 0,22 mm) para esterilização, utilizando vácuo de 5 psi.

Meio R10

- 10 ml de soro fetal bovino (SFB)
- 90 ml de RPMI-1640

O SFB foi previamente inativado por 30 minutos a 56^oC e fracionado em alíquotas de 50 ml, sendo conservado em freezer -20^oC. No caso de meio R20, adiciona-se 20 % de soro fetal bovino.

Preparo do PEG

O PEG (Polyethilenoglycol - p.m. 3000 - 3700) foi colocado em banho-maria a 56^oC, até que se tornasse totalmente liquefeito. Com uma seringa estéril foram adicionados 2 ml de RPMI-1640 e 200 ml de DMSO. Esta mistura foi deixada a 37^oC e antes de sua utilização, foi checado o pH da solução resultante (que deve estar entre 7,0 e 7,5) A solução de PEG foi então alíquotada em tubos de 1,5 ml contendo 1 ml da solução.

Meio HAT

- 20 ml de SFB
- 2 ml de HAT 50 X concentrado em 10 ml de meio RPMI-1640
- 78 ml de RPMI-1640

Meio de Congelamento

- 4 ml de SFB
- 4 ml de RPMI-1640
- 2 ml de DMSO

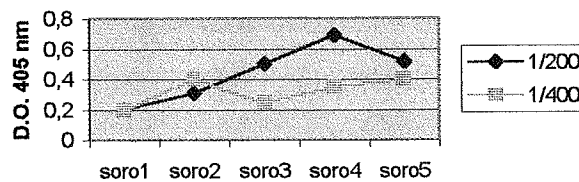
Meio HT 20%

- 2 ml de HT 50 X concentrado em 10 ml de RPMI-1640
- 20 ml de soro fetal bovino
- 178 ml de RPMI-1640

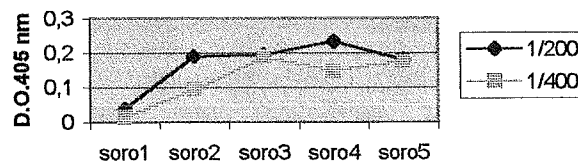
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seis imunizações, o soro dos três camundongos foram testados em ELISA, utilizando duas diluições diferentes, para estabelecer qual seria o camundongo da fusão. Com mostra a figura 1, o melhor camundongo foi o três.

Camundongo 3



Camundongo 2



Após este teste, as 81 colônias marcadas com "X" foram expandidas para placas de 24 orifícios com 1 ml de meio RPMI-1640 acrescido de 20 % de soro fetal bovino. Estas placas foram alimentadas a cada 3 dias e após 14 dias, foram novamente testadas em ELISA.

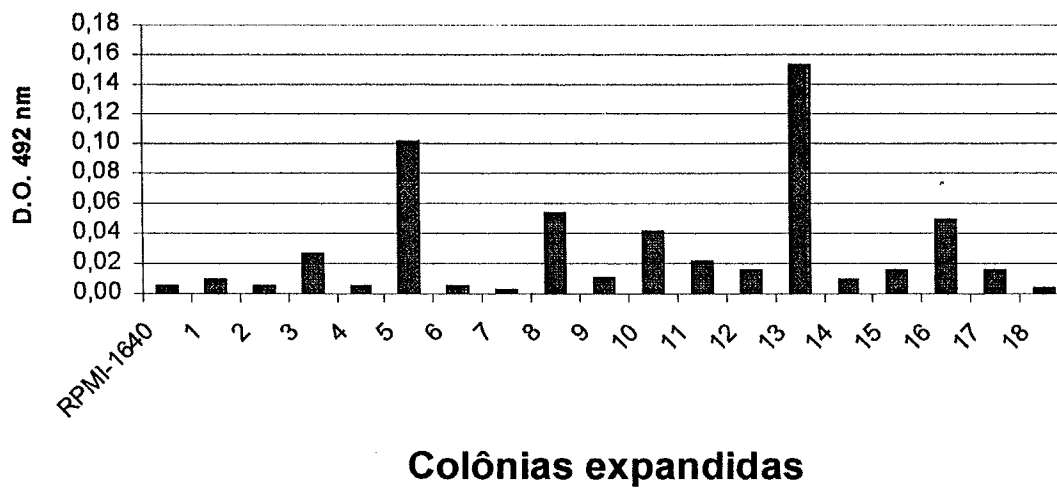
Das 81 colônias, 18 foram selecionadas por apresentarem alto título em D.O. a 405 nm e foram expandidas para garrafas de 25 cm². Estas garrafas estão agora sendo expandidas para garrafas maiores e congeladas, antes de se iniciar o processo de clonagem (listadas abaixo e nomeadas).

Quadro 2 – Colônias escolhidas no ELISA contra *Xanthomonas albilineans*, numeradas de 1 a 18.

1	X4C8	6	X5G3	11	X3F3	16	X6B5
2	X8E9	7	X3E9	12	X3D7	17	X6D7
3	X5E5	8	X5F5	13	X4B5	18	X5D8
4	X1G7	9	X2H9	14	X3G5		
5	X6G5	10	X5E4	15	X4C10		

Na Figura 2, pode-se ver a reação dos sobrenadantes de cultura das 18 colônias das quais, duas foram escolhidas para a clonagem: X6G5 e X4B5.

Figura 2 – Colônias escolhidas a partir da fusão de hibridomas, onde as colônia número 5 e 13 representadas por coloração avermelhada foram escolhidas para a clonagem.



Estando de acordo, abaixo assinam:

Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares

Orientador

Ms. Luiz Humberto Gomes

Co-orientador

Ms. Keila Maria Roncato Duarte

Co-orientadora

5 - BIBLIOGRAFIA CITADA:

- AKIBA, F. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à escaldadura das folhas em cana-de-açúcar. ESALQ/USP, Piracicaba. 95p. (Tese de Mestrado) 1978.
- BUCHANAN, R. E. ; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8^a Ed., 1974.
- HOY, J. W., GRISHAM, M.P.. Sugarcane Leaf Scald Distribution, Symptomatology, and Effect on in Lousiana. **Plant Disease**, v. 78, p. 1083-1087, 1994.
- HURN, B. A. L. & CHANTLER, S. M. Production of reagent antibodies. **Methods in Enzymology**, v. 70, p.104-42, 1980.
- KEARNEY, J.F.; RADBRUCH, A; LIESEGANG, B.; RAJENSKY, K. A new mouse myeloma cell line that lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines **Journal of Immunology**, v. 123, p. 1548-1550, 1979.
- KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN, A. F.; CAMARGO, L.F.A.; REZENDE, J.A.M.. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 208 - 211, 1997.
- KLETT, P., ROTT, P.. Inoculum Sources for the Spread of Leaf Scald Disease of Sugarcane Caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. **Journal of Phytopathology**, v. 142, p. 283 - 291, 1994.
- KOLLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-7, 1975.
- OI, V.T. & HERZENBERG, L.A. Antibody purification: protein A-sepharose column chromatography. In: MISHELL, B.B. & SHIIGI, S.M. **Selected methods in celular immunology**. San francisco, Freeman, 1980, p.368-70.
- ROTT, P.; ARNAUD, M.; BAUDIN, P.. Serological and Lysotypical Variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Journal of Phytopathology**, v. 116, p. 201-211, 1986.
- ROTT, P.; SOUPA, D.; BRUNET, Y.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P.. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yeld in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. **Plant Pathology**, v. 44, p. 1075 - 1084, 1995.

- SHULMAN, M.; WILDE, C. D.; KOHLER, G. A better line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v. 276, p.269-270, 1985.
- TRIONE, E. J. The use of monoclonal antibodies in plant pathology. In: HESS, W. M.; SINGH, R. S.; SINGH, U. S.; WEBER, D. J. **Experimental and conceptual plant pathology**. 1988. Gordon & Breach Science Publ., New York, cap. 2, 33-43.
- ZHANG, L.; BIRCH, R. G.. Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. **Letters in Applied Microbiology**, v 22, pg 132-136, 1996.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

RELATÓRIO DE SEMINÁRIO

UTILIZAÇÃO DE *E. coli* RECOMBINANTE
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Aluno: Fábio Henrique Bicudo da Silva

1998

ÍNDICE

Introdução.....	03
Importância.....	03
Microbiologia.....	04
Transformação genômica.....	04

INTRODUÇÃO

O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira e está estimado entre 5 e 12 milhões de toneladas todos os anos.

Considerando que este volume de bagaço corresponde a aproximadamente 30% da cana moída, estima-se que utilizando este resíduo na produção de etanol as usinas poderiam aumentar em até 15% na produtividade.

Isso só é possível hoje, por uma grande descoberta da engenharia genética: Bactérias *Escherichia coli* recombinadas geneticamente com genes de *Zymomonas mobilis*, são capazes de transformar em etanol açúcares que não se aproveitavam no método convencional.

Esta alternativa para utilização do bagaço da cana surge em meio a outras, muitas já adotadas, como a utilização do bagaço na substituição do óleo combustível, no aquecimento das caldeiras e para geração de energia elétrica.

Para se compreender como transformou-se as bactérias *E. coli*, necessita-se de algum conhecimento de genética molecular e microbiologia, o que nos exige uma pequena explanação sobre o assunto.

Pretende-se com o seguinte relatório, passar ao leitor a importância desta descoberta, bem como as noções básicas necessárias para o entendimento do processo envolvido.

IMPORTÂNCIA

Dentro de uma descoberta como esta, muitas coisas estão envolvidas, o que a torna importante.

A importância vem dê do fato de ser uma conquista no ramo das manipulações genéticas, até os fatores ecológicos, sociais e financeiros.

Sabe-se que a gasolina provem do petróleo que é uma fonte esgotável, o que a torna finita, ao contrário o álcool é um produto de fonte renovável. Assim a maior utilização de álcool como combustível é uma alternativa viável que se amplia com a descoberta em questão.

Também menos poluente, o álcool favorece a questão ambiental, o que o torna muito mais correto ecologicamente.

Outro ponto de importância do álcool é o social, pois para se produzir o etanol usa-se como matéria prima a cana-de-açúcar que por ser uma cultura que exige contratação de mão de obra, passa a ser também importante fonte de empregos.

Dentre todas as importâncias a maior, para os produtores, é o fato de que a nova descoberta permite uma eliminação dos vestígios agrícolas de forma rentável, podendo almentar a produção de uma usina em até 30%.

No entanto para os produtores adotarem este processo alternativo, tornam-se necessárias uma série de alterações na estrutura da usina, pois é preciso a ampliação das instalações e a construção de novos tanques de fermentação, uma vez que o bagaço de ser fermentado separado do caldo da cana.

MICROBIOLOGIA

Para a transformação genética foram escolhidos dois microrganismos:

A bactéria *Zymomonas mobilis*, encontrada no mel, capaz de produzir álcool com muita eficiência, a partir de derivados da celulose.

A bactéria *Echirichia coli*, encontrada no intestino humano, que não produz etanol, mas é capaz de utilizar diversos tipos de açúcares.

TRANSFORMAÇÃO GENÔMICA

Para se entender como é feita uma transformação genômica, deve se conhecer os seguintes conceitos básicos:

1. Enzima de Restrição: As enzimas (endonucleases) de restrição fazem parte do sistema de defesa de várias bactérias contra a invasão de um DNA "estrangeiro", reconhecendo sítios específicos do DNA e clivando este.

Table 1. Recognition sites and cleavage patterns of some commoly used restriction enzymes

<i>EcoRI</i>	↓ GAATTC CTTAAG ↑	<i>SalI</i>	↓ GTCGAC CAGCTG ↑
<i>HindIII</i>	↓ AAGCTT TTCGAA ↑	<i>PstI</i>	↓ CTGCAG GACGTC ↑
<i>BamI</i>	↓ GGATCC CCTAGG ↑	<i>SmaI</i>	↓ CCCGGG GGGCCC ↑

2. Plasmídeos: são fragmentos circulares de DNA extracromossômico de origem bacteriana, que são capazes de replicar-se de maneira independente do cromossomo bacteriano. A maior parte dos plasmídeos existem sob a forma de moléculas circulares de DNA de fita dupla.

Table 2. Properties of some plasmid vectors

Plasmid	Size (Mdaltons)	Copy no.	Selective Maker	Single sites for:	Insertional inactivation
Col El	4.2	16	colicin El immunity	<i>EcoRI</i> ; <i>SmaI</i> / <i>XmaI</i>	colicin production (<i>EcoRI</i> ; <i>SmaI</i> / <i>XmaI</i>)
pCR1	8.7	16	Km ^r , El imm	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i> ; <i>SalI</i>	Km ^r (<i>SalI</i>)
pMB9	3.5	60	Tc ^r , El imm	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i> ; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>	Tc ^r (<i>HindIII</i> *; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>)
pBR313	5.8	60	Tc ^r , Ap ^r	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i> ; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>	Tc ^r (<i>HindIII</i> *; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>)
pBR322	2.6	60	Tc ^r , Ap ^r	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i> ; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>	Tc ^r (<i>HindIII</i> *; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>)
pSC101	5.8	5	Tc ^r	<i>PstI</i> <i>EcoRI</i>	Ap ^r (<i>PstI</i>) None
pACYC184	2.8	16	Tc ^r , Cm ^r	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i> ; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>	Tc ^r (<i>HindIII</i> *; <i>BamHI</i> ; <i>SalI</i>) Cm ^r (<i>EcoRI</i>)

*Because the *HindIII* site lies within the promoter for the Tc^r gene only a proportion of insertions at this site give rise to the Tc^s phenotype.

Utilizando-se o material genético de bactérias *Z. mobilis*, recortandoos com enzimas de restrição, para separar o gene responsável pela produção de etanol, e posteriormente cortando-se plasmídeos com as mesmas enzimas de restrição, produziu-se um vetor de material genético que possibilitou a transferência do gene produtor de etanol para bactérias *E. coli*.

A criação da *Escherichia coli* recombinante

