

Proceedings | *Resumos*

1^ª Conferência Conjunta sobre Investigação em Produtos Naturais e Avícolas

4^ª reunião de coordenação da rede Iberoavícola



Iniciativa conjunta CBIOS-CYTED

Lisboa

8 e 9 de Novembro de 2018



cbios
UNIVERSIDADE LUSÓFONA

CYTED

**UNIVERSIDADE
LUSÓFONA**

IBEROAVICOLA
RED CYTED

1st Joint Conference on Poultry and Natural Products Research
CBIOS-CYTED
1^a Conferência Conjunta sobre investigação em Produtos Naturais e Avícolas
CBIOS-CYTED
8-9 November | 8-9 Outubro
Lisboa - Universidade Lusófona

Scientific Committee /Comissão Científica

Andrea Gómez-Zavaglia – Coordenadora (CIDCA, Argentina)
Graciela De Antoni – (UNLP, Argentina)
Marina Golowczyc – (CIDCA, Argentina)
Dante Javier Bueno – (INTA, Argentina)
Anderson de Souza Sant'Ana – (UNICAMP, Brasil)
Teresa Aymerich (IRTA, Espanha)
Anabella F. Pérez Consuegra (NOJ, Guatemala)
Cuahtémoc Araujo-Andrade (UAZ, México)
Maria do Céu Costa (CBIOS, Portugal)
Patrícia Rijo (CBIOS, Portugal)
Gonçalo Almeida (INIAV, Portugal)
Paula Teixeira (ESB-UCP, Portugal)
Silvana Vero (UDELAR, Uruguai)
Daniela Silva (ControlVet, Portugal)
Ana Martins (ControlVet, Portugal)
Ángela León Peláez (UNLP, Argentina)
Caterina Rufo (UDELAR, Uruguai)

Local Organizing Committee/Comissão Organizadora Local

Luis Monteiro Rodrigues
Patrícia Rijo
Ana Sofia Fernandes
Marisa Nicolai
Paula Pereira
Catarina Rosado
Maria do Céu Costa
Vera Isca
Joana M. Andrade
Epole Ntungwe
João Menezes
Filipe Fernandes

Programa

8 November | 8 de Novembro

Open Session | Sessão de abertura

Luis Monteiro Rodrigues - Director do CBIOS
Patrícia Rijo - Organizadora Local - CBIOS
Andrea Gómez-Zavaglia - Coordenadora CYTED

1st Session | Sessão 1

Charmain | Moderador

Ana Ana Sofia Fernandes, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers / Prelectores

Graciela De Antoni (UNLP, Argentina)
Anderson de Souza Sant'Ana – (UNICAMP, Brasil)
Dante Javier Bueno (INTA, Argentina)

Programa (Cont.)

2st Session | Sessão 2

Charmain | Moderador

Catarina Rosado, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers / Prelectores

M Céu Costa (LEM/FCL, Lisboa, Portugal)
Silvana Vero (UDELAR, Uruguai)
Emília Alves (CBIOS, Portugal)

3st Session | Sessão 3

Charmain | Moderador

Luis Monteiro Rodrigues, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers / Prelectores

Caterina Rufo (UDELAR, Uruguai)
Joyce Costa (UFVJM, Brasil)
Norberto Malo (DobleM, Argentina)

4st Session | Sessão 4

Charmain | Moderador

Andrea Gómez-Zavaglia (Coordenadora CYTED, CIDCA, Argentina)

Speakers / Prelectores

Ángela León Peláez (UNLP, Argentina)
Anabella Pérez-Consuegra (Grupo Noj / Vivamos Mejor, Guatemala)

9 November | 9 de Novembro

1st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 1

Monitor

Joana M. Andrade (CBIOS)

Speaker / Prelector

Dante Javier Bueno (INTA, Argentina)

2st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 2

Monitor

Epole Ntungwe (CBIOS)

Speaker / Prelector

Anderson de Souza Sant'Ana – (UNICAMP, Brasil)

3st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 3

Monitor

Vera Isca (CBIOS)

Speakers / Prelectores

Daniela Silva e Ana Martins (ALS Controlvet, Portugal)

4st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 4

Monitor

Joana Andrade (CBIOS)

Speaker / Prelector

Gonçalo Nieto Almeida (INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal)

Open Session

Luís Monteiro Rodrigues - Director do CBIOS
Patrícia Rijo - Organizadora Local - CBIOS
Andrea Gómez-Zavaglia - Coordenadora CYTED

1st Session | Sessão 1

Charmain | *Moderador*

Ana Sofia Fernandes, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers | *Prelectores*

Graciela De Antoni (UNLP, Argentina)
Anderson de Souza Sant'Ana – (UNICAMP, Brasil)
Dante Javier Bueno (INTA, Argentina)

C.01 - Estudio del efecto de una mezcla de cepas probióticas y de la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 en la crianza de pollos parrilleros

Ana Moretti, Carolina Valiente, Roberto Zapata, Ángela León Peláez, Marina Golowcyc y Graciela De Antoni

CIDCA y Catedra de Microbiología, UNLP, La Plata, Argentina

Abstract / *Resumo da Comunicação*

Los sistemas de producción animal se caracterizan por una alta intensidad productiva, en los que frecuentemente se adicionaban en la dieta antibióticos en dosis sub-terapéuticas como aditivos promotores del crecimiento. Sin embargo, su uso continuo provocó el desarrollo de cepas patógenas resistentes y efectos residuales en los alimentos (carne, leche, huevo), lo que afecta a su consumo por el hombre. Además, su empleo provoca daños en el equilibrio ecológico de la microbiota gastrointestinal, por lo que predispone a los animales a contraer enfermedades. Como una alternativa posible, numerosos trabajos han demostrado que los probióticos tienen una influencia positiva en el incremento de los parámetros productivos y el mejoramiento de las condiciones sanitarias. Existen microorganismos con propiedades probióticas aislados a partir de sustratos tales como kefir, productos de quesería, tracto gastrointestinal, ensilados y cuya aplicación ha generado resultados positivos en la producción animal. En este contexto se propuso investigar el efecto de una mezcla de cepas probióticas y de la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 en la crianza de pollos parrilleros. Se estudiaron bacterias lácticas, cedidas por una empresa, en cuanto a su potencial probiótico mediante estudios de crecimiento en medios de cultivo tradicionales y alternativos, tolerancia a ácido y a sales biliares, adhesión a células en cultivo, inhibición de *Salmonella* in vitro mediante ensayos de inhibición de la adhesión/invasión de *Salmonella* a líneas celulares in vitro y actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células. Se estudió la efectividad del probiótico en pollos de la línea COBB. Se evaluaron parámetros bioquímicos en sangre, histomorfometría del duodeno, traslocación a hígado, variaciones de la microbiota intestinal y ganancia de peso.

C.02 - Incidência, caracterização e sobrevivência de *Salmonella* spp. em amostras de soja e derivados

Monyca Dias Rocha Chaves, Anderson S. Sant'Ana

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
Contacto: and@unicamp.br

Abstract / *Resumo da Comunicação*

Salmonella ainda figura como um dos patógenos mais envolvidos em caso de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo. Os sintomas causados, variando de leves a moderados, são responsáveis por milhares de hospitalizações anualmente, causando prejuízos de ordem econômica e de saúde pública. Devido à sua capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes e resistência a condições de estresse, *Salmonella* pode ser encontrada nos mais variados substratos, como carnes, vegetais e grãos. O Brasil é um dos principais exportadores de produtos agropecuários do mundo, tendo como um dos seus pilares econômicos a soja. As chamadas "indústrias de beneficiamento de soja" exportam grande parte de sua produção na forma grãos e farelo, e a presença de patógenos na linha de processamento pode acarretar na perda de safras inteiras. Tendo em vista este cenário, esta pesquisa buscou avaliar a presença de *Salmonella* desde a matéria-prima (grão de soja) até o produto final (farelo) de 5 indústrias beneficiadoras de soja brasileiras. Amostras oriundas do ambiente interno e externo das fábricas também foram analisadas. Além disso, análises de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) foram conduzidas a fim de se determinar se a presença de populações ao longo da linha de processamento era persistente ou advinda de contaminação cruzada. Por fim, a análise da curva de sobreviventes de *Salmonella* em grãos de soja foi realizada a partir de experimentos conduzidos em diferentes temperaturas. Foram identificados 29 sorotipos de *Salmonella* a partir de 713 amostras analisadas. O sorotipo Mbandaka foi prevalente, e mostrou ser oriundo de um mesmo clone em uma das indústrias analisadas, indicando persistência ao longo do processamento. Os experimentos de microbiologia preditiva indicam que a temperatura de 20°C seria capaz de manter células viáveis por mais de 60 dias. Os resultados obtidos neste estudo mostram que os parâmetros de higienização, além do controle de pragas adotados pelas indústrias analisadas, não são satisfatórios, sendo necessária a aplicação mais rígida dos padrões

Agradecimentos:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

C.03 - Experiencias no controlo de Salmonelas regionais presentes em aves da Argentina

Dante J. Bueno

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.
Contacto: bueno.dante@inta.gob.ar

Abstract / Resumo da Comunicação

Salmonella comprende un grupo de bacterias de importancia significativa, siendo la causa de la salmonelosis, una de las enfermedades transmitidas por alimentos mas frecuentes a nivel mundial. Esta bacteria puede estar adaptada al aves (Salmonella ser. Gallinarum biovars Gallinarum –SG- y Pullorum –SP-) y producir enfermedad sólo en esos animales o bien producir enfermedad en una amplia gama de especies incluido el hombre (por ej. Salmonella ser. Typhimurium – ST- y Salmonella ser. Enteritidis –SE-). Muchas de estas últimas generan un estado de portador asintomático (animales sin síntomas, pero con Salmonella) en las aves, y bajo esta forma se pueden producir problemas digestivos en los seres humanos (Salmonelas paratíficas). Por todo ello, el control de la presencia de Salmonella en granjas avícolas redundo en un beneficio tanto para las aves como para los alimentos derivados de las mismas. El control es la disminución de la morbilidad y la mortalidad originadas por la enfermedad. Esto puede conseguirse mediante el tratamiento de los animales enfermos, con lo que se reduce la prevalencia de la enfermedad, y mediante la prevención de la enfermedad, que disminuye tanto la incidencia como la prevalencia. Dicho control sólo puede abordarse con éxito si puede reconocerse la enfermedad. Por ello, el Plan Nacional de Sanidad Avícola en Argentina tiene incorporado el monitoreo de las aves reproductoras a través del aislamiento de SE, ST, Salmonella ser. Heidelberg (SH), SG y SP y la búsqueda de SE, ST y SH en la cama de los galpones de pollos parrilleros y cama/guano y polvo de los galpones de gallinas de postura. Existen diversas estrategias llevadas a cabo en el control de la Salmonelosis, entre la que se destaca el uso de productos antimicrobianos. En la presentación me enfocaré en productos estudiados por mi grupo de trabajo. Los antibióticos (ATB) se utilizan en el tratamiento de las enfermedades y también de manera profiláctica en momentos de alto riesgo para evitar la enfermedad y de este modo aumentar la productividad. Estos agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada: pared bacteriana, membrana bacteriana, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En general, las Salmonelas spp. aisladas de aves y ambientes avícolas de Argentina presentan un bajo índice de resistencia múltiple, aunque siempre resultan resistentes a la eritromicina. Por otro lado, los aceites esenciales (AE) han adquirido gran importancia en los últimos años debido a sus propiedades antimicrobianas. La actividad bactericida de estas sustancias se relaciona con los fenoles y monoterpenos que poseen, ya que son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno o bien pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana en donde se da lugar a una fuga de iones y otros compuestos de la bacteria. Trabajos de mi equipo observó que el 19%, 97% y 100% de 169 cepas de Salmonella aisladas de aves y ambientes avícolas estudiadas fueron sensibles al AE de romero, espartillo y orégano, respectivamente. El uso de virus, llamados bacteriófagos, como terapéutico está siendo de gran interés debido a los problemas emergentes de la resistencia antibiótica en diferentes partes del mundo y la apreciación del rol del microbioma en la salud humana y animal. Trabajos de mi equipo observaron que un cóctel de bacteriófagos, pertenecientes a la familia Siphoviridae y al morfotipo B1, fue capaz de bajar la carga de ST inoculada artificialmente en guano de gallina.

2st Session | Sessão 2

Charmain | *Moderador*

Catarina Rosado, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers | *Prelectores*

M Céu Costa (LEM/FCL, Lisboa, Portugal)

Silvana Vero (UDELAR, Uruguay)

Emília Alves (CBIOS, Portugal)

2st Session (Cont.) | Sessão 2 (Cont.)

C.04 - SEfeitos fisiológicos exploratórios in vitro e in vivo do Kefir sobre a modulação da microbiota aplicada ao cuidado da pele: atividades metabólicas em enzimas relacionadas com o envelhecimento da pele

Yarabin De Icaza¹, Joana M. Andrade², Luis M. Rodrigues², António Pedro Louro Martins³, Catarina Rosado², Patrícia Rijo², Maria do Céu Costa²

¹ Internship student CBIOS, Faculty of Bioscience Engineering, University of Gent. Coupure Links, 653 (9000), BELGIUM.

² CBIOS, the University Lusofona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376 Lisboa (1749 024), PORTUGAL.

³ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV I.P.), Av. Da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras, PORTUGAL.
Contacto: ydicaza@gmail.com

Abstract / Resumo da Comunicação

O microbioma é definido como sendo constituído por todos os microorganismos do corpo humano e respectivos materiais genéticos. A microbiota é definida por todos os microrganismos num determinado local, como o Trato Gastrointestinal (GI) ou a pele (1). A nossa microbiota cutânea e intestinal tem uma relação estreita com a saúde da pele, pelo que a manipulação desta microbiota pode trazer benefícios para a saúde da pele. O stress, mudanças na dieta, infecções intestinais e o uso de antibióticos são condições que afetam o equilíbrio natural da microbiota intestinal, para o qual a aplicação de probióticos pode ser benéfica (2,3). Existem dados promissores que sugerem que os probióticos administrados por qualquer uma das vias, tópica ou oral, podem ter efeitos benéficos significativos para a pele.

Numerosos critérios foram definidos para a seleção de estirpes probióticas. Obviamente, o critério mais importante é que as estirpes selecionadas devem ser seguras para uso no hospedeiro e no ambiente. Além disso, as diferenças de género, e as comorbidades, como obesidade, estilo de vida, tabagismo e uso de álcool, podem afetar o benefício geral dos probióticos. O Kefir CIDCA e seus derivados mostraram ter um grande potencial como agentes bioativos na indústria farmacêutica, podendo apresentar segurança e eficácia para serem utilizados em formulações tópicas e administradas por via oral para combater distúrbios dermatológicos, contrariando a deterioração e o envelhecimento precoce da pele. É também importante mencionar que a pegada ecológica dos laticínios pode ser minimizada com o seu uso na produção de Kefir.

O objetivo deste estudo foi explorar o potencial do leite probiótico processado por Kefir na homeostase da pele. Nesse sentido, foram investigados os efeitos sobre a hidratação da pele e a perda de água trans-epidérmica (4), em complementaridade da avaliação in vitro das atividades da colagenase e tirosinase como importantes marcadores para a saúde da pele.

Agradecimento

À Prof Doutora Andrea Gómez Zavaglia, Coordenadora da Rede Científica Cyted Iberoavícola, pelo apoio no patrocínio de uma estadia em Portugal da Dra Yarabin de Icaza.

Referências:

- [1] Turnbaugh PJ, Ley RE et al., The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world, *Nature*, 449:804-810, 2007.
- [3] H. Guéniche A, Bastien P et al., Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin, *Exp. Dermatol.*, 19(8):e1-8, 2010.
- [4] Rodrigues LM, Rosado C., Human Epidermal Barrier May Be Quantitatively Described by Compartmental Analysis of Water Dynamics. In: Humbert P, Fanian F, Maibach H., Agache P. (eds) *Agache's Measuring the Skin*, Second edition, Switzerland: Springer, Cham. Pag 1-14: 1651, 2015.

C.05 - Uso de microorganismos del kefir de agua para inhibir el crecimiento de *A. flavus* en silos de sorgo

Mariana Gonda¹, Angie Álvarez¹, Angela León², Graciela De Antoni², Gabriela Garmendia¹, Michael Wisniewski³, Caterina Rufo⁴, Silvana Vero¹.

¹Área Microbiología, departamento de biociencias, Facultad de Química UdelaR, Montevideo, Uruguay

²Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

³USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, Kearneysville, WV, USA.

⁴Área Inocuidad, Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay

Contacto: svero@fq.edu.uy

Abstract / Resumo da Comunicação

Los silos pueden presentar el problema de contaminación fúngica, lo cual es un potencial riesgo para la salud animal ya que los hongos contaminantes pueden ser productores de micotoxinas. Uno de los contaminantes más frecuentes en silos de sorgo en Uruguay se identificó como *Aspergillus flavus*, especie conocida como productora de aflatoxinas. Para inhibir el crecimiento de hongos en los silos se utilizan diversas estrategias, una de las cuales es el uso de control biológico. En este contexto es interesante estudiar como controladores biológicos a los microorganismos presentes en gránulos de kéfir, los cuales están formados por bacterias ácido lácticas y levaduras embebidas en una matriz de polisacáridos. El kefir de agua (KA) es una bebida producida por fermentación de soluciones azucaradas utilizando estos gránulos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad del kefir de agua de controlar *Aspergillus flavus* en la fase aerobia en mini silos de sorgo. A su vez, se buscó conocer el comportamiento de la comunidad microbiana presente en el KA al utilizarlo como inoculante de silos de sorgo.

El sorgo para ensilar se trató con KA y KA libre de células, se secó a 60°C hasta obtener una humedad entre 23% y 40% y se inoculó con una suspensión de *A. flavus*. El ensilado se realizó en tubos de 15mL con un filtro esterilizante en la tapa para permitir la entrada de aire. Los mini silos se incubaron por 7 días a 25°C. El crecimiento de *A. flavus* se cuantificó por PCR en tiempo real y el análisis de la comunidad del KA se realizó mediante secuenciación masiva.

Los resultados mostraron que los microorganismos presentes en el KA fueron capaces de controlar el crecimiento de *A. flavus* en el mini silo, mientras que la solución libre de células no fue efectiva. La identificación por secuenciación masiva mostró que en todos los casos los géneros mayoritarios de bacterias y levaduras fueron *Lactobacillus* y *Saccharomyces* y *Pichia*, respectivamente.

Agradecimientos:

Los autores agradecen a CSIC Grupos y PEDECIBA

Referências:

- [1] Máximo 2 Autores Autor1 e Autor2. No caso de mais de 2 autores então usar Autor1 et al., *Jornal*, Vol, 1^a_pag_ultima_pag., Ano.
- [2] Kaszowska, Z. et al., *Vibrational Spectroscopy*, (2013), 65, 1– 11.
- [3] Crockett S.L. and Robson N.B., *Medicinal Aromatic Plant Sci. Biotech.*, 5:1-13, 2011.

2st Session (Cont.) | Sessão 2 (Cont.)

C.06 - Contribuição para o estudo dos efeitos do kefir e seus subprodutos sobre a saúde da pele

Emília Alves¹, Maria do Céu Costa¹, Luís Monteiro Rodrigues^{1,2}, Patrícia Rijo¹, Catarina Rosado¹

¹ CBIOS-Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-028 Lisboa, PORTUGAL

² Departamento de Farmacologia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, PORTUGAL

Contacto: emilia.alves@ulusofona.pt

Abstract / Resumo da Comunicação

O Kefir é um leite fermentado obtido a partir de grãos constituídos por uma matriz de polissacáridos e proteínas densamente povoada por bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas e leveduras que vivem em associação simbiótica, o que o torna diferente de outros produtos fermentados. A composição do kefir não é uniforme e varia em função da origem e do método de cultura dos grãos, bem como dos substratos utilizados (1). O consumo do kefir tem sido associado a uma variedade de benefícios para a saúde humana (2).

A capacidade que a microbiota intestinal tem de afetar outros órgãos, entre eles a pele, demonstra a existência de uma relação intestino-pele (3). No entanto, na literatura ainda não se encontram evidências do efeito cutâneo de uma dieta contendo kefir e/ou subprodutos. O objetivo desta investigação é avaliar o impacto na saúde cutânea do probiótico kefir, incluído na dieta regular de indivíduos normais e de indivíduos com historial de atopia.

O estudo será conduzido em voluntários humanos atópicos e com pele normal. As bebidas serão produzidas a partir da fermentação de leite com grãos de kefir, provenientes do Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), do CONICET e da Universidade de La Plata, Argentina. Serão caracterizadas bebidas de kefir contendo, nomeadamente variações quanto ao conteúdo proteico, de hidratos de carbono, polissacáridos e lípidos. A intervenção consistirá na distribuição diária de uma bebida de kefir a cada um dos participantes, durante 8 semanas. Serão avaliadas alterações na resposta cutânea, no índice SCORAD e nos sintomas gastrointestinais autoreportados.

Espera-se com este trabalho contribuir para ampliar o conhecimento sobre o consumo do probiótico kefir na saúde cutânea e, consequentemente, na relação intestino-pele.

Agradecimentos:

Este trabalho é financiado através do apoio da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., através do projecto UID / DTP / 04567/2016 e do Programa CYTED, rede 115RT0488.

Referências:

1. Garrote GL, Abraham A, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J Dairy Res.* 2001;68:639–52.
2. Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: Functional properties of kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(3):261–8.
3. Mori N, Kano M, Masuoka N, Konno T, Suzuki Y, Miyazaki K, et al. Effect of probiotic and prebiotic fermented milk on skin and intestinal conditions in healthy young female students. *Biosci Microbiota, Food Heal.* 2016;35(3):105–12.

3st Session | Sessão 3

Charmain | *Moderador*

Luís Monteiro Rodrigues, CBIOS, Lisboa, Portugal

Speakers | *Prelectores*

Caterina Rufo (UDELAR, Uruguai)

Joyce Costa (UFVJM, Brasil)

Norberto Malo (DobleM, Argentina)

3st Session (Cont.) | Sessão 3 (Cont.)

C.07 - Optimización y caracterización de nanopartículas de alginato-quitosano conteniendo nisina con actividad antilistericida en carne vacuna

Patricia Zimet¹, Álvaro W. Mombrú¹, Ricardo Faccio¹, Giannina Brugnini², Iris Miraballes³, Caterina Rufo² y Helena Pardo¹

¹Centro NanoMat, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química-DETEMA, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

²Área Inocuidad, Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

³Laboratorio de Biotecnología, Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: cruflo@fq.edu.uy

Abstract / Resumo da Comunicação

La nisina es un péptido bioactivo ampliamente estudiado por su actividad contra *Listeria monocytogenes*. Dado que la actividad antilistericida de la nisina disminuye cuando es aplicada directamente sobre los alimentos [1], su nanoencapsulación puede constituir una alternativa para evitar reacciones indeseadas con la matriz alimentaria y otorgar una actividad antibacteriana sostenida en el tiempo [2]. El objetivo de este trabajo fue preparar nanopartículas de alginato/quitosano conteniendo nisina y estudiar su actividad antilistericida en ensayos in vitro y en carne vacuna magra envasada al vacío. Se utilizó un diseño experimental de Box-Behnken de 3 factores con 3 niveles y metodología de superficie de respuesta para optimizar la formulación. La formulación óptima resultante fue: concentración de alginato de 0.3 mg/ml, relación alginato/quitosano (p/p) de 7 y 3.2 mg/ml de Nisaplin[®], la presentación comercial de nisina. Las nanopartículas tuvieron una eficiencia de encapsulación de 36.1±0.6 %, tamaño de partícula promedio de 66.4±8.9 nm y potencial zeta de -31.7±2.6 mV. Los ensayos por TEM y AFM confirmaron el tamaño de partícula encontrado por DLS. Asimismo, se observaron interacciones entre nisina y alginato mediante análisis de espectroscopía Raman. En los estudios de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida a 37 °C no se encontraron diferencias significativas entre la nisina libre y encapsulada. Sin embargo, cuando se evaluó la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* a 4 °C, se observó una actividad antilistericida sostenida durante 27 días otorgada por las nanopartículas de nisina en comparación a la nisina libre. Además, la nisina encapsulada fue capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de *L. monocytogenes* en los ensayos en carne vacuna envasada al vacío. Esta investigación presenta la utilización de diseño experimental para preparar y optimizar nanopartículas de alginato/quitosano conteniendo nisina, como bioconservantes contra *L. monocytogenes* en carne vacuna envasada al vacío y refrigerada.

Agradecimientos:

Los autores agradecen a CSIC, ANII, PEDECIBA y a Álvaro Olivera del Laboratorio de Alta Resolución (CURE, Rocha, Uruguay).

Referências:

[1] Prombutara, P. et al. Food Control. (2012), 24(1–2), 184–90.

[2] Weiss, J. et al. J Food Sci. (2006), 71(9), R107–16.

C.08 - Microencapsulação de compostos bioativos para fins alimentícios

Joyce Costa¹, Lourena Souza¹, Jocilane Oliveira¹, Keyla Pereira¹, Álvaro Junior², Pedro Fonte^{3,4}

¹PPGCTA, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia, Minas Gerais, Diamantina, BRASIL.

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia, Minas Gerais, Diamantina, BRASIL.

³CBIOS, Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, Lusófona Universidade de Lusófona, Lisboa, PORTUGAL.

⁴LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas – Laboratório de Química Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, PORTUGAL.

Contacto: joyce.costa@ict.ufvjm.edu.br

Abstract / Resumo da Comunicação

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência e características físicas e morfológicas de compostos bioativos microencapsulados com diferentes materiais encapsulantes produzidos através da secagem por atomização na aplicação em formulações alimentares. A eficiência da encapsulação, atividade de água (Aw), humidade, solubilidade, distribuição de tamanho bem como estrutura morfológica (MEV e Confocal) de um composto bioativo atomizado é um passo fundamental na compreensão dos efeitos do processo de microencapsulação através da secagem por atomização e contribuem na interpretação dos resultados de retenção e encapsulamento do composto bioativo para futuras aplicações em formulações alimentares. Para todos os tratamentos a eficiência da microencapsulação alcançou valores médios maiores que 80,41%, atividade de água, humidade, solubilidade e distribuição de tamanho próximos a 0,13; 2,20%; 69,55% e 15,75 µm, respectivamente. As microfotografias obtidas por MEV mostraram micropartículas esféricas, ocas e de superfície côncava e rugosa, com tamanhos variados que são características inerentes ao processo de spray dryer; a microscopia confocal permitiu avaliar a estrutura interna das partículas sem fragmentação do material e confirmaram os resultados obtidos via MEV. Em todas as imagens campo claro, fluorescência e sobreposição observou-se a distribuição do composto bioativo na estrutura da partícula e confirmou o encapsulamento eficaz de acordo com os biopolímeros e método aplicado.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UFVJM, Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, Brasil e ao CBIOS, Universidade Lusófona, Portugal.

Referências:

[1] Pereira, K.C. et al., Brazilian Journal of Food Technology, (2018), Vol 21, 1-9.

[2] Costa, J. M. G. et al. Powder Technology, (2015), Vol 274, p. 296- 304.

[3] Silva, E. K. et al. International Journal of Dairy Technology (Print), v. 69, p. 3-. 2016.

3st Session (Cont.) | Sessão 3 (Cont.)

C.09 - Produtos Avícolas e Naturais: uma experiência de frangos

Norberto J. Malo

Establecimiento Doble M

Contacto: norbertomalo@yahoo.com.ar

Abstract / Resumo da Comunicação

El resumen es breve, implica contar la experiencia de haber utilizado LB Plantarum en la ración de frangos de engorde, logrando reducir la tasa de mortalidad causada por acción de diversos patógenos, de un 5 a 10%, a menos de 1,5%.

De un lote de 150 pintos que ingresaron, sólo 2 murieron a los 50 días, por muerte súbita, cuando tenían 4,200 kg de peso vivo.

No hubo infecciones de ningún tipo, ni virósica ni bacteriana, no hubo parasitosis y, a la faena a los 60 días, pesaron en promedio 3,200 kg sin menudos, sin cogote y sin grasa.

La consistencia de la carne fue excelente y el sabor muy superior y delicado.

En cargas anteriores sin el uso de Plantarum tuvimos problemas con coccidios y algún otro patógeno, con muertes que alcanzaron el 10%.

Cabe señalar que siempre realizo una crianza ecológica, sin utilizar antibióticos ni químicos de síntesis. Actualmente agregamos también Sacharomices, lo cual produce una sinergia positiva en la asimilación de nutrientes.

Utilizo además un suplemento antiparasitario de origen natural y otro secuestrante de micotoxinas y protector hepático también de origen natural.

En el agua de bebida y en aspersión en las camas se utiliza un biocida inócuo a los animales y al humano, que tiene poco poder residual y no requiere periodo de carencia para la faena: ClO₂ al 9% en solución carbonatada diluido 1:1000.

La cama utilizada, de 20 cm de profundidad, es de cáscara de arroz, que luego se utiliza como abono orgánico una vez compostada.

Los suplementos adsorben los gases de amoníaco y metano (si lo hubiera) y en las excretas evitan la proliferación de moscas.

El alimento balanceado no es comercial, se prepara en el establecimiento a base de cereales (maíz, sorgo, afrecho de arroz, germen de maíz, expeller de soja, harina de carne), ceniza de huesos, macro y micro minerales y los suplementos ya mencionados.

Referências:

[1] Máximo 2 Autores Autor1 e Autor2. No caso de mais de 2 autores então usar Autor1 et al., Jornal, Vol, 1ª_pag.-ultima_pag., Ano.

[2] Kaszowska, Z. et al., Vibrational Spectroscopy, (2013), 65, 1– 11.

[3] Crockett S.L. and Robson N.B., Medicinal Aromatic Plant Sci. Biotech., 5:1-13, 2011.

4st Session | Sessão 4

Charmain | *Moderador*

Andrea Gómez-Zavaglia (Coordinadora CYTED, CIDCA, Argentina)

Speakers | *Prelectores*

Ángela León Peláez (UNLP, Argentina)

Anabella Pérez-Consuegra (Grupo Noj / Vivamos Mejor, Guatemala)

4th Session (Cont.) | Sessão 4 (Cont.)

C.10 - Experiencia de la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos (CLSDDDH) UNLP en la Red CYTED IBEROAVICOLA

Ángela León, Graciela De Antoni

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos, La Plata, Argentina
Contacto: anleon@biol.unlp.edu.ar

Abstract / Resumo da Comunicação

La CLSDDDH es un programa de extensión adscripto a la FCE de la UNLP, que funciona desde 2009. Su objetivo es integrar proyectos y programas de extensión de la FCE hacia la resolución de las demandas de las organizaciones sociales del gran La Plata. Metodológicamente nos basamos en las herramientas de campo que brindan las ciencias sociales y los conocimientos tecnológicos de las ciencias exactas. Al interior de la red CYTED, integramos la actividad docente-extensionista e investigativa en diferentes momentos cuales fueron: - La construcción de un galpón para producción aviar con la Cooperativa Barrios Productores, en el cual nos disponemos a incluir probióticos del kefir de agua en la crianza de pollos doble pechuga. - Desarrollamos talleres sobre inocuidad alimentaria, en el cual participaron diferentes organizaciones de base territorial de La Plata. Fue central el tratamiento de la ordenanza 11284 de 2015, en el marco de la cual se inscriben las Pequeñas Unidades Productoras Alimentarias (PUPAS), con las cuales trabajamos. - Mejoramos la infraestructura de la organización productor "Guardería y Comedor El Refugio", a fin de alcanzar su registro como PUPAS. Seguimos a nivel microbiológico su producción de alimentos al paso, incluyendo productos con derivados de carne aviar (empanadas, milanesas y otros). - Dictamos capacitaciones en manipulación higiénica de alimentos con el certificado oficial del Ministerio de Salud, a un total de alrededor de 500 personas que venden entre otros productos al paso, derivados de carne aviar. - En noviembre de 2017, en colaboración con la Médica Anabella Pérez Consuegra, de la ONG Noj/Vivamos Mejor/Guatemala, realizamos un Taller de Medicina Ancestral Maya, en el cual se desarrolló el concepto de salud-enfermedad en la medicina maya, el cultivo, significado y manejo de las plantas medicinales y surgió la propuesta de realizar otro en junio de 2018, que se tituló Valorización de los conocimientos ancestrales en alimentación, autocuidado y huertas caseras. A partir de este taller se implementaron huertas en algunas instituciones como Laura Vicuña y el barrio Ma Claudia Falcone, y se potenciaron las huertas de otras organizaciones de La Plata. - Elaboramos (junto a integrantes de Argentina, Uruguay y Guatemala), el "Manual de elaboración de Conservas de Vegetales y Escabeche-Carne Aviar", que empleamos actualmente en los talleres de conservas para las organizaciones que lo demandan.

Este resumen de actividades busca constatar y poner en valor la posibilidad de integración de la actividad extensionista con la actividad docente y científica en el marco de una red CYTED, lo cual puede servir como modelo de trabajo en futuras experiencias. Agradecemos a la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación Argentino, a la Red CYTED, a la agrupación Ma. Claudia Falcone, Casita Laura Vicuña y asociación civil "El Refugio".

Referencias:

1. Dirección de Educación Agraria. Prov Bs As. Manual de Avicultura 2o año ciclo básico agrario. 105 p.
2. Goites, E. Manual de cultivos para la huerta orgánica familiar Buenos Aires. INTA. 136 p. (2008).
3. Guber, Rosana. La Etnografía. Norma. 146 p. (2005).
4. León et al. Manual de Conservas de Vegetales y Escabeches de carne Aviar. Red CYTED IBEROAVICOLA. (2018).
5. Min.Agricultura y Ganadería de Paraguay- Unión Europea. Manual de Pollos Parrilleros. 107 p. (2012).
6. Ordenanza 11284 de 2015 de la Municipalidad de La Plata. Consejo deliberante de La Plata.

C.11 - LA INVESTIGACION Y LO SOCIAL. Devolución, métodos y momentos

Anabella Pérez-Consuegra

Grupo Noj. Panajachel, Sololá. Guatemala.

Asociación VIVAMOS MEJOR. Panajachel, Sololá. Guatemala

Contacto: tzolojap@yahoo.com

Abstract / Resumo da Comunicação

Introducción

Investigar significa llevar a cabo diferentes acciones o estrategias con el fin de descubrir algo. Así, dichos actos se dirigen a explicar una realidad o a obtener maneras de resolver situaciones de interés, pero sobretodo obtener nuevos conocimientos y aplicarlos.

Materia

Lo que entendemos por investigación, en general conlleva el reto de no quedar alejado del ámbito de aplicación en espacio o tiempo, en especial en lo referente a la devolución de lo que en materia o en cuestión fué el objeto y objetivo (s) de investigación. Por lo dicho, surge la reflexión de lo imperante de relacionar o incluir al proceso de toda investigación sea cual la materia u objeto a investigar como del método a aplicar el aspecto de la devolución a los participantes, para que se vea reflejado en beneficio de las personas, familias o colectivos meneimplicados de manera directa o indirecta.

Metodos.

Investigación aplicada, exploratoria, cualitativa, no experimental, transversal. Presentación dialogada.

Discusión.

Se pretende compartir y provocar el análisis y la reflexión de la experiencia de vincular el desarrollo de la Red CYTED Iberoavícola (115RTO488), con colectivos participantes a través de Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos (CLSDDDH), Programa de Extensión en Alimentos y Salud (PEAS) ambos dentro del marco de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina) y la participación del Grupo Noj/VIVAMOS MEJOR (Guatemala).

AGRADECIMIENTOS A:

Iberoavícola, Red del Programa CYTED (115RTO488) por el trabajo permanente en la búsqueda de la comunicación, relacionamiento e integración de equipos entre los países iberoamericanos, para la investigación o propuestas de acción dentro del marco de sus objetivos, en favor de sus poblaciones.

Colectivos y sus líderes – lideresas que han participado en las actividades aportando e intercambiando saberes en las actividades paralelas de extensión apoyadas y promovidas por la Red CYTED Iberoavícola, siendo: El Cooperativa La Falcone de Puente de Fierro, Hogar de día – comedor infantil de Congregación Laura Vicuña en La Ensenada, y Asilo Marin de Congregación María y Marta, todos ubicados en La Plata, Argentina.

Referências

- [1] Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M.P. (2010) Metodología de la Investigación (5ª Ed.). México: McGraw Hill Educación.
- [2] Dür, Jochen. (2008) Cadenas productivas, cuentas sociales de base agraria y el desarrollo económico local: El caso de Sololá. IDEAR, CONGCOOP, DED.

1st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 1

Monitor

Joana M. Andrade (CBIOS)

Speaker | Prelector

Dante Javier Bueno (INTA, Argentina)

COL.01 - Isolamento e identificação de salmonelas: técnicas microbiológicas

Dante J. Bueno

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina
Contacto: bueno.dante@inta.gob.ar

Abstract / Resumo da Comunicação

La contaminación de los alimentos animales por Salmonella juega un rol importante en la salud pública y particularmente en la inocuidad alimentaria, dado que los productos alimenticios de origen animal son considerados la mayor fuente de infecciones de Salmonella en humanos. El principal reservorio es el tracto intestinal de los animales y la colonización es favorecida por la producción animal intensiva. Los productos avícolas son los vehículos más frecuentes de transmisión de Salmonella. La información necesaria para llevar a cabo una decisión correcta debe ser obtenida a partir de una determinación de riesgo exacta, basada en la sensibilidad de técnicas de aislamientos utilizadas para identificar Salmonella. Los alimentos son matrices complejas formadas por grasa, hidratos de carbono, proteínas, conservantes, y otros químicos. Aunque se superan los obstáculos asociados con el procesamiento de una muestra, los patógenos transmitidos por los alimentos, como Salmonella, a menudo están presentes en niveles extremadamente bajos, lo que complica el proceso de detección. Otra consideración es si el examen es para monitoreo de rutina o con fines epidemiológicos. El analista puede optar por mejorar el método con fines epidemiológicos a través de procedimientos adicionales de enriquecimiento y medios de cultivo, dos temperaturas de incubación, selección intensificada de colonias de placas y/o métodos de detección rápida. Los métodos basados en cultivos siguen siendo los más utilizados como técnicas de detección y son considerados el estándar de oro para la detección de Salmonella, debido a su selectividad y sensibilidad. Por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), el Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos (FSIS) del Departamento de Agricultura de los EE. UU. (USDA) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) requieren de cepas de Salmonella aisladas como prueba inequívoca de contaminación. Sin embargo, estos métodos no van encaminados al conteo de esta bacteria sino que los resultados se expresan cualitativamente, determinando su presencia o ausencia en diferentes matrices. En casos de monitoreo, el aislamiento e identificación de Salmonella en una muestra requieren 5 etapas. Dependiendo del enfoque, los métodos de cultivo estándares típicamente requieren 5-7 días para obtener un resultado, ya que dependen de la capacidad de crecimiento de Salmonella y de las colonias visibles, que luego pueden caracterizarse por la realización de pruebas bioquímicas o serológicas adicionales. Debido a su uso generalizado, se aplican numerosos y variados medios bacteriológicos (caldos de enriquecimiento selectivos y placas de agar selectivas) para aislar Salmonella de los alimentos y de los ingredientes de los mismos. Los medios y métodos que son mejores para un tipo de muestra particular pueden no ser necesariamente óptimos para otras muestras. Por lo tanto, se deben evaluar procedimientos particulares para diferentes tipos de muestras. Con la cepa aislada y compatible con Salmonella sp., se realiza la tipificación serológica o fenotípica (quinta etapa, pruebas de aglutinación). Esta permite determinar la fórmula antigénica completa de aislamientos de Salmonella spp., tiene un alto poder discriminatorio, y provee información con significado epidemiológico, desde el punto de vista de la vigilancia basada en el laboratorio. La disponibilidad y el costo de antiseros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones. Esta presentación proporcionará una descripción general de los diversos métodos basados en cultivos actualmente disponibles para la detección de Salmonella en diferentes muestras de productos avícolas y las recomendaciones de las agencias para estas muestras.

2st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 2

Monitor

Epole Ntungwe (CBIOS)

Speaker | *Prelector*

Anderson de Souza Sant'Ana – (UNICAMP, Brasil)

COL.02 - Salmonella - foco na cadeia produtiva de rações para animais e seus impactos na saúde pública

Anderson S. Sant'Ana, Monyca Dias Rocha Chaves, Mayara Messias, Ana Paula Norberto

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

Contacto: and@unicamp.br

Abstract / *Resumo da Comunicação*

Salmonella causa diversos problemas ao longo da cadeia produtiva de alimentos de origem animal. Esta bactéria patogênica pode entrar na cadeia produtiva por diversas vias, porém sua entrada através das rações animais pode ser considerado o fator mais crítico. A partir das rações, a Salmonella pode se disseminar amplamente na produção primária e durante o processamento dos produtos derivados. Neste sentido, controles efetivos de Salmonella devem ser compostos de medidas que garantam a segurança microbiológica das rações animais. As medidas para controle de Salmonella ao longo da cadeia produtiva de rações são basicamente compostas por medidas que previnam a entrada deste patógeno nas linhas de processamento de rações, medidas que previnam o patógeno de se multiplicar e medidas que visem a inativação deste patógeno durante o processamento das rações. A efetividade destas medidas será, em grande parte, dependente do conhecimento de como este patógeno se comporta em condições de estresse tais como, em ambientes com baixa atividade de água, presentes no produto e ao longo do processamento de rações. Será vital conhecer-se sua resistência térmica em condições de baixa atividade de água. Além disso, é importante conhecer como diferentes sorotipos de Salmonella se comportam ao serem expostos a diferentes processos térmicos potencialmente usados na indústria de produção de rações, especialmente para aves. Para elucidar o papel do ambiente de processamento na prevalência deste patógeno torna-se vital conhecer-se a capacidade de adesão/formação de biofilmes por Salmonella nas condições encontradas no ambiente de processamento de rações e se este micro-organismo entra em estado viável, mas não cultivável. A elucidação destes mecanismos será altamente relevante para um melhor conhecimento da problemática envolvendo a contaminação de rações por Salmonella e para melhorar o seu controle, o que por sua vez, terá impactos diretos na criação de animais e saúde pública.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

3st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 3

Monitor

Vera Isca (CBIOS)

Speaker | *Prelector*

Daniela Silva e Ana Martins (ALS Controlvet, Portugal)

COL.03 - Bacteriófagos: Potencial e limitações de seu uso como agente antimicrobiano na indústria avícola

Daniela Silva, Ana Martins

ALS Controlvet

Abstract / *Resumo da Comunicação*

Os antibióticos têm sido rotineiramente utilizados na indústria avícola para promover o crescimento animal ou prevenir surtos de doenças. No entanto, seu uso excessivo está associado ao aparecimento de estirpes resistentes, limitando sua eficácia terapêutica e aumentando as resistências antimicrobianas, sendo então um grande problema, tanto na medicina humana e animal.

Os bacteriófagos são vírus bacterianos e são utilizados há quase um século como agentes antimicrobianos e podem ser usados para reduzir a prevalência de bactérias patogênicas. Nesse contexto, os bacteriófagos apresentam-se como uma valiosa alternativa ao uso de antibióticos. Os bacteriófagos são capazes apenas de infectar células bacterianas, sendo, portanto, inofensivos para seres eucariotas. O modo de acção mais comum dos fagos contra bactérias é a bacteriólise, que ocorre naturalmente no final do ciclo lítico do fago. Os fagos líticos codificam produtos genéticos que destroem ou destroem a parede celular bacteriana. Dentro das bactérias infectadas, os fagos sequestram a maquinaria de replicação das bactérias hospedeiras, produzindo novas partículas virais. A produção e a libertação das novas partículas fágicas permite infecção de bactérias adicionais em um padrão exponencial, mostrando um efeito de morte mais rápido do que outras alternativas terapêuticas

A eficácia destes vírus como agentes antibacterianos tem sido amplamente demonstrada na literatura, tanto in vivo como in vitro. O uso de bacteriófagos tem vindo a ser testado amplamente em carnes e produtos cárneos, bem como em instalações de produção de alimentos, com o objectivo principal de reduzir selectivamente populações-alvo de bactérias patogênicas ou deterioradoras. Os produtos de aves de capoeira foram indubitavelmente as carnes mais utilizadas para estudar a eficácia do bacteriófago, nomeadamente no biocontrolo de Salmonella em alimentos. Além disso, vários relatos de estudos de caso investigaram o uso de bacteriófagos virulentos para controlar infecções por Salmonella e E. coli em aves. Em todos esses estudos, resultados promissores foram obtidos e o uso de fagos foi capaz não apenas de controlar a infecção, reduzindo a carga bacteriana em animais infectados, mas também de prevenir a transmissão horizontal da bactéria através da redução do nível de contaminação ambiental em aviários. Embora a via de administração varie (spray aerossol, oral, ração, gavagem oral, água potável), uma característica comum entre todos os estudos é a importância do uso de coquetéis de fagos e administração de doses altas e múltiplas de fagos. Esses estudos mostraram que o uso rotineiro de coquetéis de fagos pode fornecer uma solução eficaz e sustentável para o controle de populações bacterianas em várias etapas da cadeia alimentar: de casas de animais a alimentos em instalações de processamento de alimentos.

Mesmo assim, o uso de bacteriófagos no controle de infecções bacterianas como alternativa aos antibióticos ou outros agentes antimicrobianos ainda é limitado. As restrições são principalmente devidas a inexistência de legislação adequada aos critérios e especificidades do uso dos bacteriófagos como agentes antimicrobianos, dificultando assim o registo e comercialização destes produtos.

4st Laboratorial Session | Sessão Laboratorial 4

Monitor

Joana M. Andrade (CBIOS)

Speaker | *Prefector*

Gonçalo Nieto Almeida (INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal)

COL.04 - Segurança alimentar: *Escherichia coli* STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*)

Gonçalo Almeida

INIAV, IP- National Institute for Agrarian and Veterinary Research, Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena, 4485-655 Vairão, Vila do Conde, Portugal.
Contacto: goncalo.almeida@iniav.pt

Abstract / *Resumo da Comunicação*

A *Escherichia coli* é um microrganismo que faz parte da flora intestinal do homem e dos animais. No entanto, algumas estirpes têm uma capacidade de provocar infeções. Com base no mecanismo de virulência as *E. coli* agrupam-se em: enteropatogénicas, enterotoxigénicas, enteroinvasivas, enteroagregativas e enterohemorrágicas.

O membro da *E. coli* enterohemorrágica mais importante é a *E. coli* O157:H7. Em 1993 ficou conhecida como o agente que causou um surto numa cadeia de fast-food - Jack in the box - nos EUA (em vários estados) devido ao consumo de hambúrgueres malcozinhados. Foram afetadas mais de 700 pessoas, 171 foram hospitalizadas e quatro pacientes faleceram com diarreia sanguinolenta ou síndrome hemolítico urémico (SHU).

Em 2011 um surto ocorreu na Alemanha e França no qual se identificou a *E. coli* O104:H4 como o responsável pela infeção de mais de 4000 pessoas, 900 pessoas desenvolveram o SHU e 54 pessoas faleceram.

Estas *E. coli* produzem toxinas – toxinas Shiga - que são as responsáveis pela infeção.

Apesar de nem todas as infeções por *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) serem de origem alimentar, a monitorização dos produtos alimentares para a presença de STEC é uma ferramenta útil na prevenção destas infeções.

A metodologia utilizada baseia-se na deteção dos genes *stx* responsáveis pela produção das toxinas, por PCR em tempo real – ISO TS 13136:2012, FDA BAM.

A sessão laboratorial explorará a metodologia descrita na ISO TS 13136 para a deteção das chamadas “TOP 5” STEC (O26, O103, O111, O145, O157) e do O104 seguindo a recomendação do Laboratório Europeu de Referência para a *E. coli*. Serão abordados os diferentes passos da norma, os meios de cultura para o enriquecimento e isolamento das diferentes STEC. A confirmação do isolado e a apresentação dos resultados. Por último, será apresentada a metodologia para a sub-tipagem dos genes *stx*. Uma vez que as STEC são consideradas microrganismos de segurança de nível 3, a sessão laboratorial decorrerá com recursos a pequenos filmes e fotografias.

Referências:

[1] Rangel, J. et al., *Emerging Infectious Diseases*, (2005). 11(4):603-609

[2] O'Brien, A. et al., *Journal of Clinical Microbiology*, (1993). 31(10) 2799-2801

[3] Karch, H. et al., *EMBO Molecular Medicine*, (2012). 4.

[4] Feng, P. et al., FDA's Bacteriological Analytical Manual, update 10/2018, available at <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>.

Panel Communications | Comunicações em Posters

Abstract List | Lista de Resumos Submetidos

- P.01 **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BIOMASSA DA MICROALGA ANKISTRODESMUS BRAUNII.** Ana Jácome, Marcello Bresola, João Carvalho, Patrícia Rijo, Catarina Rosado, André Baby
- P.02 **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LÍQUIDO IÓNICO-NANOPARTÍCULAS PARA ADMINISTRAÇÃO DE RUTINA.** Ana Júlio, Rita Caparica, Sofia Costa Lima, Salette Reis, Pedro Fonte, Tânia Santos de Almeida
- P.03 **ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO DESIDROABIÉTICO EM NANOPARTÍCULAS DE PLGA.** Ana S. Macedo, Patrícia Rijo, Pedro Fonte
- P.04 **BIO-GUIDED FRACTIONATION AND ISOLATION STUDY OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM PLECTRANTHUS MUTABILIS CODD.** Epole Ntungwe N, Vera Isca, Patrícia Rijo
- P.05 **BACTERÍÓFAGOS COMO HERRAMIENTA DE BIOCONTROL DE SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM EN GUANO DE GALLINAS DE POSTURA.** Francisco I, Rodríguez, Dante J. Bueno, y Patricio J. De Urraza
- P.06 **PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS POR PARTE DE CEPAS DE SALMONELLA AISLADAS DE AVES Y AMBIENTES AVÍCOLAS.** Francisco Procura, Marina A. Golowczyc, Dante Javier Bueno
- P.07 **AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS DE GRAU IV INDUZIDA POR DITERPENOS NATURAIS COM ESQUELETO DE HALIMANO E DE LABDANO.** Joana M. Andrade, Przemysław Sitarek, Ewa Skala, Ewelina Synowiec, Tomasz Kowalczyk, Ana Díaz-Lanza, Patrícia Rijo
- P.08 **KINETICS OF BACTERIAL DESTRUCTION BY MICROWAVE/ULTRASOUND COUPLING: CASE STUDY ENTEROCOCCUS FAECALIS.** Kernou Ourdia dite Nouara, Belbahi Amine, Kerdouche Kamelia, Amir Akila, Rijo Patricia
- P.09 **PRESENCIA DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN MUESTRAS DE CONTENIDO DE HUEVO Y ÓRGANOS DE GALLINAS DE POSTURA CON ANTECEDENTES DE TIFOSIS AVIAR.** Mario A. Soria y Dante J. Bueno
- P.10 **CITOTOXICIDADE DE ANTIOXIDANTES ALIMENTARES DE ORIGEM VEGETAL EM CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA HUMANO U2OS.** Marisa Nicolai, Nuno Almeida, Patrícia Rijo, João Costa, Nuno Saraiva, Ana Sofia Fernandes
- P.11 **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DO BAGAÇO DE VITIS VINERA L.** Nicolai, M., Pereira, P., Rijo, P., Palma L.
- P.12 **APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÓNICOS DERIVADOS DA COLINA COMO EXCIPIENTES FUNCIONAIS EM FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO COMPOSTOS POUCO SOLÚVEIS.** Rita Caparica, Ana Júlio, André Rolim Baby, Maria Eduarda Araújo, João Guilherme Costa, Tânia Santos de Almeida
- P.13 **HEMI-SÍNTESE DE CARBAMATOS A PARTIR DO DITERPENO NATURAL 6,7-DEHIDROROILEANONA.** Vera M. S. Isca, Catarina Garcia, Carlos M. Monteiro, Noélia Duarte, Carlos A.M. Afonso, Patrícia Rijo

P1 - Avaliação da atividade antioxidante de extratos de biomassa da microalga *Ankistrodesmus braunii*

Ana Jácome,¹ Marcelo Bresaola,² João Carvalho,² Patricia Rijo,³ Catarina Rosado,³ André Baby¹

¹Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, B-15, 05508-900, São Paulo, Brazil.

²Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, B-16, 05508-000 São Paulo, Brazil.

³CBIOS-Centro de Pesquisa para Biociências e Tecnologias de Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1740-024, Lisboa, Portugal.

Microalgas são organismos eucariontes, unicelulares e fotossintetizantes que apresentam potencial singular para produção de ácidos graxos, pigmentos, como os carotenóides e clorofila, bem como outros metabólitos de interesse na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. As microalgas são consideradas como recursos naturais de muito valor devido a sua aplicação para produção de novos compostos biotecnológicos. Particularmente, os extratos ou metabólitos secundários derivados da biomassa das microalgas tem sido avaliados pelos seus benefícios cosméticos. [1] O cultivo de microalgas tem evoluído nas última décadas, oferecendo diferentes fotobiorreatores que permitem um aumento na produtividade do processo.[2] Porém, poucas espécies são atualmente comercializadas. Neste trabalho, avaliou-se a atividade antioxidante de extratos de biomassa de microalga *Ankistrodesmus braunii* UTEX 245 cultivada sob diferentes condições de cultivo, visando a sua aplicação na indústria de produtos cosméticos. A microalga foi cultivada em batelada, em fotobiorreatores fechados de 3,5 L tipo "air-lift", e sob diferentes quantidades de nitrato de sódio (10 e 20 mM NaNO₃) e métodos de secagem (liofilização e estufa), visando à produção de máxima concentração de biomassa (X_m, mg L⁻¹) bem como da sua produtividade (P_x, mg L⁻¹ d⁻¹). Foram selecionados três solventes para o preparo dos extratos: metanol, acetona e água. A metodologia de extração com solventes assistida com ultrassom durante 60 min, temperatura de 28 ± 1 °C, usando banho de gelo, foi usada para garantir a ruptura da parede celular das microalgas. O processo de extração foi repetido duas vezes. Ao final do processo, os solventes metanol e acetona foram evaporados. Os extratos aquosos foram liofilizados para a realização das etapas posteriores. A metodologia de DPPH• foi usada para a avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos (SA, %)[3] e está descrita a seguir: alíquotas de 10 µL de cada extrato foram adicionadas a 990 µL da solução de DPPH• (0.002 % em metanol). A solução foi incubada durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 517 nm, usando branco. Butil hidroxitolueno (BHT) foi usado como padrão de referência. Após os cultivos, conclui-se que o uso de 20 mM NaNO₃ em cultivo em batelada, permitiu maior X_m e P_x do que 10 mM NaNO₃. Além disso, foi demonstrado que a liofilização seria a melhor opção para a conservação da atividade antioxidante dos biocompostos presentes na biomassa das microalgas após seu cultivo. Finalmente, os extratos aquosos de *A. braunii* tiveram maior atividade antioxidante do que os outros extratos. Dessa forma, os resultados deste trabalho permitem concluir que compostos antioxidantes nos extratos de *A. braunii* cultivado em fotobiorreatores tubulares poderiam ser utilizados em formulações cosméticas, principalmente com propriedade anti-aging. Estudos complementares estão sendo realizados para demonstrar a aplicação desses extratos de biomassa de *A. braunii* em cosméticos.

Agradecemos à FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brasil, pelo suporte econômico para o desenvolvimento deste trabalho (Processos No. 2016/22000-0 e 2015/11194-6).

Referências:

[1] Ariede, M.B. et al. *Algal Res.* 25, 483-487 (2009).

[2] Carvalho, J.C.M. et al., In: Bajpai, R. et al. (eds) *Algal Biorefineries*. Springer, Dordrecht (2014).

[3] Falé, P.L.B. et al. *Food Chem.* 114, 798-805 (2009).

P2 - Desenvolvimento de sistemas líquido iônico-nanoparticulas para administração de rutina

Ana Júlio¹, Rita Caparica^{1,2}, Sofia Costa Lima³, Salette Reis³, Pedro Fonte^{1,3,a}, Tânia Santos de Almeida^{1,a}

¹CBIOS-Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL.

²Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, ESPANHA.

³LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas – Laboratório de Química Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, PORTUGAL

^aShared senior authorship

A rutina é um flavonoide proveniente do trigo mourisco com excelentes propriedades antioxidantes sendo frequentemente usado em suplementos alimentares e produtos nutracêuticos (1). No entanto a sua baixa solubilidade é uma desvantagem que pode influenciar decisivamente a sua ação no organismo. Neste âmbito, os líquidos iônicos (LI) poderão aumentar a solubilidade de compostos bioativos (2) e a nanoencapsulação é outra estratégia que permite a sua veiculação obtendo uma libertação controlada ou dirigida (3). A combinação destas estratégias pode potenciar a ação benéfica da rutina. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema combinado líquido iônico-nanoparticulas para a veiculação de rutina, para a sua possível aplicação em suplementos alimentares ou produtos nutracêuticos.

As nanoparticulas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 ou 75:25 foram preparadas pela técnica de dupla emulsão A/O/A por evaporação de solvente (3). Na fase interna foi usada uma solução aquosa de 0,2 % (v/v) de LI, (2-hidroxietil) trimetilamónio-L-fenilalaninato [Cho][Phe] ou (2-hidroxietil) trimetilamónio-L-glutamato [Cho][Glu] (2), com rutina na concentração máxima de solubilidade em cada solução. Os nanosistemas híbridos produzidos foram caracterizados fisico-quimicamente e a eficiência de associação (EA) e a capacidade de carga de rutina foram também avaliadas.

As nanoparticulas obtiveram um diâmetro entre 250-300 nm, com um índice de polidispersão inferior a 0,4 e com boa estabilidade coloidal (entre -35 mV e -45 mV). O [Cho][Phe] permitiu obter uma EA superior (75 %) do que o [Cho][Glu] (50 %), não existindo diferenças significativas entre os dois rácios de PLGA usados, o que é um excelente resultado considerando a baixa solubilidade da rutina. Relativamente à capacidade de carga, esta encontra-se entre 0,5 % e 1,0 % para [Cho][Glu] e [Cho][Phe], respetivamente. Os resultados obtidos demonstraram o potencial do sistema híbrido de LI-nanoparticulas PLGA para a veiculação de rutina, uma vez que através deste sistema estável e robusto é possível incorporar uma maior quantidade deste ativo, potenciando assim a sua utilidade na área alimentar e nutracêutica.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (FCT/MCTES (PIDDAC), UID/DTP/04567/2016) and COMPETE 2020 (PTDC/MEC-DER/32610/2017).

Referências:

[1] Sequeira, I.R. and Poppit, S.D., *Nutrients*, 9:788-809, 2017.

[2] Santos de Almeida, T. et al., *Drug Dev Ind Pharmacy*, 43:1858-65, 2017.

[3] Fonte, P. et al., *Biomacromolecules*, 15:3753-65, 2014.

P3 - Encapsulação de ácido desidroabiético em nanoparticulas de PLGA

Ana S. Macedo¹, Patricia Rijo^{1,2}, Pedro Fonte^{1,3}

¹CBIOS, Universidade Lusófona Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

²Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

³LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas – Laboratório de Química Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-113 Porto, Portugal.

O ácido desidroabiético (ADA) é um composto diterpénico com baixa solubilidade em água e várias atividades biológicas associadas, tais como, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de nanoparticulas de ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) para melhorar a biodisponibilidade do ADA. As nanoparticulas de PLGA carregadas com ADA foram preparadas por uma técnica de emulsificação por evaporação de solvente [1]. Resumidamente, o diclorometano foi utilizado para solubilizar o ADA e o PLGA. A mistura foi adicionada a uma solução de 2% de álcool polivinílico, sonicada durante 30 segundos e deixada à temperatura ambiente durante 4 h sob agitação magnética. A eficiência de associação foi determinada indiretamente por espectroscopia ultravioleta (UV-Vis) e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As nanoparticulas carregadas com ADA obtiveram um tamanho de 282 ± 26,4 nm e um PDI de 0,24 ± 0,03, sendo adequado para administração oral ou tópica [1,2]. Não foi detetado ADA no sobrenadante após avaliação por UV-Vis e HPLC, alcançando uma eficiência de associação de cerca de 100%. As nanoparticulas de PLGA apresentaram tamanho e características adequados para a administração oral e tópica e mostraram evidências de ser um veículo promissor para a administração de ADA, aumentando a sua biodisponibilidade com benefício para o paciente no tratamento de diversas patologias.

Referências

[1] Fonte, P. et al., *Biomacromolecules*, 15:3753-65, 2014.

[2] Fonte, P., et al., *Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches*. *Biotechnol Adv*, 2015. 33: p. 1342-54.

P4 - Bio-guided fractionation and isolation study of bioactive components from *Plectranthus mutabilis* Codd

Epole Ntungwe N^{1,2}, Vera Isca¹, Patrícia Rijo^{1,3}

¹CBIOS – Center for Research in Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal.

²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Ctra. A2, Km 33.600 – Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Spain.

³Instituto de Investigação do Medicamento (iMed,ULisboa), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto 1649-003 Lisbon, Portugal

Plectranthus L' Her. genus belongs to the Lamiaceae family together with other commercially important plant genera, such as *Salvia*, *Ocimum* or *Mentha*, with a rich diversity of ethnobotanical uses in traditional medicine [1,2]. There has been an increasing interest on the *Plectranthus* genus for the investigation of its therapeutic values. This genus is known to be a good source of bioactive compounds; and produce the abietane-type diterpenoids as common secondary metabolites, with reported antibacterial, antitumoral, antifungal, insecticidal, and antiplasmodial activities [3, 4]. Regarding this, the herein described study aims to identify the bioactive compounds responsible for the biological activity of *P. mutabilis*. The stems and leaves extraction of *P. mutabilis* was obtained by sonication (10% (w/v) of the dry plant) the highest yield obtained was from *P. mutabilis* leaves (6.19 % w/v). A general toxicity screening assay, using *Artemia salina* model, was conducted on acetonic extracts prepared from *P. mutabilis*. Thus, using different chromatographic techniques, a bio-guided fractionations were conducted and led to the isolation of the responsible active compounds which were spectroscopically characterized. The fractions were purified by using flash column chromatography and preparative TLC (silica gel; n-hexane/AcOEt; 9.35:0.65) to afford the bioactive compounds. The compounds are under structural elucidation studies based on physicochemical data, spectroscopic data (1D-and 2D-NMR experiments) and comparison with bibliographic data. This plant was found to contain abietane diterpenoids which are known for their bioactive activities. The general toxicity, antioxidant and antimicrobial activities of the isolated compound are under study. More studies are ongoing to identify more bioactive compounds and unveil their biological activity.

References:

- [1] Lukhoba, C. et al., *Journal of Ethnopharmacology*, (2006), 103 1–24.
- [2] Rice, L. et al., *South African J Bot.* (2011), 77(4) 947–59
- [3] Negera, A. et al., *Molecules*, (2017), 22, 1919
- [4] Burmistrova, O. et al., *Journal of Natural Products*, (2013), 76: 1413-1423

P5 - Bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* enterica serovar Typhimurium en guano de gallinas de postura

Francisco I. Rodríguez^{1,2}, Dante J. Bueno¹, y Patricio J. De Urzua³

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Laboratorio de Sanidad Aviar, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

³Catedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Las aves de corral son uno de los reservorios de *Salmonella* entérica ser. Enteritidis (SE) y S. enterica ser. Typhimurium (ST) serotipos asociados con la enfermedad humana [1]. Una alternativa de control, es el uso de bacteriófagos para reducir la prevalencia de estos patógenos [2]. Por ello, el objetivo de este trabajo fue aislar, caracterizar y evaluar la eficacia de bacteriófagos contra ST contaminando guano de gallinas de postura. Para el aislamiento de bacteriófagos se tomaron muestras de guano positivas para SE y/o ST. Con los aislados purificados, se estudió el rango de huésped utilizando 247 cepas de las cuales 97 eran ST y 100 SE, y se seleccionaron los fagos con mayor rango de huésped para componer un coctel de fago. Se determinó la resistencia a la acidez y álcalis de los fagos. Luego, se evaluó el título de los fagos seleccionados a diferentes temperaturas de conservación (-80°C, -18°C, 4 °C y temperatura ambiente) con y sin agregado de crioprotectores. A su vez, se caracterizaron los fagos por ERIC PCR, gen *invA* y mediante microscopía electrónica de transmisión. Finalmente, se estudió la efectividad del coctel de fagos en guano estéril, mediante recuentos y aislamiento de una cepa de ST inoculada. Se aislaron 15 bacteriófagos, 11 aislados con cepa huésped de SE y 4 con huésped de ST. El título de los fagos fue elevado en relación a lo informado por Henriques et al. (2013). Los bacteriófagos fueron efectivos contra el 80% de las SE y el 20 % de las ST estudiadas. Se seleccionaron 6 fagos para una futura mezcla de biocontrol. En cuanto a la resistencia al pH, 11 fagos conservaron su título hasta pH 3, en cambio 4 conservaron su título en pH 1 y todos los fagos fueron estables a pH 9. En el almacenamiento a largo plazo (-20 y -80 °C) se observó que altas concentraciones de sacarosa disminuían el título de los fagos, coincidiendo con Dini (2011). Los fagos pertenecían a la familia Siphoviridae y al morfotipo B1. En la reacción de ERIC-PCR se pudo diferenciar los fagos, en cuanto a la presencia del gen *invA* en el ADN fágico fue negativo. En lo que respecta al estudio in vitro sobre guano, el coctel de fagos bajó la significativamente la carga de ST en el guano.

Los bacteriófagos aislados disminuyen la concentración de ST en el guano. Se podría aplicar un tratamiento diario que podría llevar a la eliminación total de la bacteria.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y al Programa CYTED (Red 115RT0488).

Referencias:

- [1] Loharikar, A.B.E et al., *Zoonoses Public Health*, 59 (5):347-354, 2012.
- [2] Kropinski, A.M., and Clokie M.R.J., *Bacteriophages, methods and protocols*, Vol. 1, 3-14, 2009.
- [3] Henriques A et al., *Foodborne Pathog Dis*, 10 (8): 718-722, 2013.
- [4] Dini C., Tesis doctoral, FCE-UNLP, 2011.

P6 - Producción de biopelículas por parte de cepas de *Salmonella* aisladas de aves y ambientes avícolas

Francisco Procura¹, Marina A. Golowczyc², Dante Javier Bueno³

¹Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Pte Perón 64, 2820, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CCT La Plata – CONICET-UNLP, 47 y 116, La Plata, Argentina.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Ruta Provincial 39 Km 143,5, 3260, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

Las infecciones con bacterias del género *Salmonella* son responsables de una variedad de enfermedades agudas y crónicas en las aves. Del mismo modo, los lotes de aves infectadas son uno de los más importantes reservorios de *Salmonella* que pueden ser transmitidas al ser humano a través de la cadena alimentaria. Bacterias como *Salmonella* crecen predominantemente como biopelículas en la mayoría de sus hábitats naturales, en lugar del modo planctónico. La formación de biopelículas es importante para la diseminación de esta bacteria debido a que esta capacidad le confiere mayor resistencia a las tensiones químicas, físicas y mecánicas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la producción de biopelículas por parte de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (SE), *Salmonella* ser. Typhimurium (ST) y *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) aisladas de aves y ambientes avícolas. Se evaluó la producción de biopelículas en 162 cepas de *Salmonella*, pertenecientes a SE, ST y SG, mediante dos técnicas. Por un lado, se realizó una observación visual diaria en la interfase líquido-aire de la bacteria crecida en caldo LB sin NaCl a 28°C por ocho días. Por otro lado, se evaluó la producción de biopelícula mediante la técnica de tinción con cristal violeta en microplacas usando caldo LB sin NaCl. Estas placas se incubaron estáticamente a 28°C por 48 hs. y las cepas se clasificaron de acuerdo a la absorbancia medida (OD) comparándolas con la absorbancia crítica (ODc) hallada para cada placa. Se definió la ODc como tres desviaciones estándares por encima de la absorbancia media del control negativo. En base a esto se clasificaron las cepas en no adherentes (OD ≤ ODc); débilmente adherentes (ODc < OD ≤ 2 ODc); moderadamente adherentes (2 ODc, < OD ≤ 4 ODc); fuertemente adherentes (4 ODc < OD). El 48 % de las cepas no produjeron biopelícula en la interfase líquido-aire, el 38% de las mismas correspondieron a SE y el resto a SG (62%). Por otro lado, el 49%, 3% y 48 % de las cepas resultaron fuertemente, moderadamente y débilmente adherentes, respectivamente. Estas últimas correspondieron a aquellas que no produjeron biopelícula en la interfase líquido-aire, mientras que las cepas consideradas moderadamente y fuertemente adherente produjeron biopelícula en la interfase líquido-aire. Las técnicas de detección de biopelículas utilizadas presentan iguales resultados, siendo que la mayoría de las cepas de *Salmonella* ensayadas producen biopelículas y un gran porcentaje de ellas son fuertemente adherentes.

Se agradece al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y al Programa CYTED (Red 115RT0488).

Referencias:

- [1] Vestby L.K. et al. *BMC Vet. Res*, 5, 20–26, 2009.
- [2] Karaca, B. et al. *Biología* 68 (1), 1–10, 2013.
- [3] Stepanovic S. et al. *J. Microbiol Methods*, 40, 175–9, 2000.
- [4] Vestby, L., et al. *J. Appl. Microbiol.*, 108(3), 771–778, 2010.

P7 - Avaliação da morte celular em células tumorais de grau IV induzida por diterpenos naturais com esqueleto de halimano e de labdano

Joana M. Andrade^{1,2}, Przemyslaw Sitarek³, Ewa Skala³, Ewelina Synowiec⁴, Tomasz Kowalczyk⁵, Ana Díaz-Lanza², Patrícia Rijo^{1,6}

¹Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL

²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, SPAIN

³Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical University of Lodz, Łódź, POLAND

⁴Laboratory of Medical Genetics, University of Lodz, Łódź, POLAND

⁵Department of Genetics and Plant Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection University of Lodz, Lodz, POLAND

⁶Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, PORTUGAL

As plantas medicinais do género *Plectranthus* são uma valiosa fonte de produtos naturais bioativos, como por exemplo, os diterpenos (1,2). Estudos anteriores revelaram o interesse biológico dos diterpenos de origem natural, nomeadamente como citotóxicos e como anti-infecciosos contra estirpes de micobactéria não-virulenta (2,3).

Neste trabalho, um diterpeno de esqueleto halimano (HAL: 11R *, 13E) -11-acetoxihalima-5,13-dien-15-óico) e dois diterpenos de esqueleto labdano (PLEC: plectromatina C e MRC: mistura 1:1 de 1,6-di-O-acetilforscolina e 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina), foram previamente isolados de *P. ornatus* Codd. (1,2). Estes diterpenos foram avaliados nos mecanismos de morte celular em células tumorais de grau IV (H7PX). A citotoxicidade dos compostos foi quantificada usando o método de MTT e a análise da apoptose/necrose bem como a distribuição do ciclo celular foram avaliadas por citometria de fluxo. O biomarcador γ -H2AX foi utilizado para detetar quebras na cadeia dupla de DNA por ELISA usando o kit "H2A.X Phosphorylation Assay Kit". Os resultados demonstraram que todos os compostos reduziram a viabilidade das células de acordo com a dose administrada, mas com maior sensibilidade para o HAL. Na citometria de fluxo, a experiência revelou que a morte celular ocorreu principalmente por via apoptótica, com um aumento da população de apoptose precoce e tardia após o tratamento de HAL, de 74,85%. A distribuição do ciclo celular revelou um aumento da percentagem de fase de paragem em G2/M após tratamento com HAL (60,37%). Além disso, foram observados níveis aumentados (10-15 vezes) de γ -H2AX fosforilada após tratamento com HAL.

De acordo com a literatura, este é o primeiro trabalho a relatar estas atividades para os diterpenos em estudo, sendo que os trabalhos de avaliação biológica continuam em estudo.

Agradecimentos: Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UID/DTP/04567/2016.

Referências:

- [1] Rijo P., et al. *Magn Reson Chem* MRC, (2005), 43, 595–8.
- [2] Andrade J.M., et al. *Biomed Biopharm Res*, (2018), 15, 103-112.
- [3] Burmistrova O., et al. *J Nat Prod*, (2013), 76, 1413–23.

P8 - Kinetics of bacterial destruction by microwave/ultrasound coupling: case study *Enterococcus faecalis*.

Kernou Ourdia dite Nouara¹, Belbahi Amine¹, Kerdouche Kamelia¹, Amir Akila¹, Rijo Patricia²

¹Laboratory 3BS, University Abderahmane Mira, bejaia, Algeria.

²CBIOS-Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-028 Lisboa, Portugal

Food processing industries are one of the largest sources of wastewaters, with a trend of increasing volumes being produced. The physical and chemical properties of the effluents derived from the food sector vary in line with the product type and quantity (1). Treatment methods currently applied to wastewater include anaerobic treatment, ultrasound, filtration, chlorination, heat treatment, radiation treatment and various combinations of these (2, 3).

Indeed, our method is based on the destruction of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in the dairy effluent (DE) by two methods: microwave (MW) and ultrasounds (US).

A primary study consists in destroying an *E. faecalis* charge of 108UFC / mL by ultrasound at different amplitude (60%, 80%, and 100%) and at different power levels (300w, 600w, and 900w) and the coupling of the methods is performed on sterile physiological water on a model medium (DE).

It is noted that pretreatments by US (80%) at 5min and 20min or by MW (600w, 50s) gave a better destruction than the ultrasounds alone or microwaves alone.

The following treatments:-US(80%-5min)/ MW(600w/30s) , MW(600w/30s)/ US(80%-5min) -US(80%-20min)/ MW(600w/30s), MW(600w/30s)/ US(80%-20min) have a decontaminating effect on *E. faecalis* ,(4) that means that disruption by microwave and ultrasound separately is better than the coupling of the two methods.

It is clear that the destruction by a pretreatment by microwave it much better than destruction by preprocessing ultrasound contrary to what is said by Wong and al., 2010 (5). As for a prospective research, we consider to study: 1- a destruction of *E. faecalis* in an ultrasonic bath and by microwave method on a model medium; 2- in comparison, the variable concentration of an antimicrobial *Salvia officinalis* extract is added to the milk effluent and the effect of ultrasound and microwave methods on the destruction of *E. faecalis* will be then studied; 3- an eco-toxicological study on *Artemia salina* model will be also performed.

Reference

- (1) Patange A., and al., *Science of the Total Environment*, (2018), 631–632, 298–307
- (2) Demirel, B., and al., *Process Biochem*, (2005), 40, 2583–2595.
- (3) Yavuz, Y., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (2011), 86, 964–969.
- (4) Joyce, E., and al., *Ultrasonics Sonochemistry*, (2003), 10, 315–318
- (5) Wang, J., and al., *International Journal of Food Science and Technology*, (2010), 45, 459–465

P9 - Presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano en muestras de contenido de huevo y órganos de gallinas de postura con antecedentes de tifosis aviar

Mario A. Soria y Dante J. Bueno

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Concepción del Uruguay, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

La Tifosis aviar (TA) es una enfermedad septicémica específica de aves adultas producida por *Salmonella* ser. *Gallinarum* biovar *Gallinarum*. Para el control de la TA se utilizan antibióticos (ATB), que pueden dejar residuos tanto en los órganos de las aves tratadas como en los huevos provenientes de aves afectadas, con el consecuente riesgo para los consumidores y el incremento de bacterias multirresistentes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de sustancias inhibitorias de crecimiento bacteriano (SICB) en órganos (hígado y bazo), clara (CL) y yema (Y) de huevos de gallinas de postura provenientes de granjas con antecedentes de TA (GATA) y estudiar la concordancia entre los tipos de muestras del contenido del huevo. Se muestrearon 8 GATA donde en 4 de ellas habían sido administrados ATB (florfenicol, enrofloxacin y amoxicilina). Se analizaron un total de 78 muestras de hígado (H) y 78 de bazo (B) de aves agónicas y muertas al momento del muestreo, 210 muestras de pool de CL y 210 de pool de Y. Para el estudio de sustancias inhibitorias se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS) como control del ensayo. Además, para las muestras de CL y Y se utilizaron cepas de *Salmonella* ser. *Typhimurium* 06/11 (ST), *Salmonella* ser. *Enteritidis* PT 1 (SE), *Salmonella* ser. *Gallinarum* biovar *Gallinarum* 03/121 (SG) y *Salmonella* ser. *Gallinarum* biovar *Pullorum* 90/142 (SP). La muestra con una zona de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar Mueller-Hinton mayor o igual a 8 mm fue considerada positiva. La concordancia entre las muestras de CL y Y para la detección de SICB para cada serovar de *Salmonella* fue evaluada mediante el estadístico Kappa. El 17,4% y el 6,5% de las muestras de H y B provenientes de AA y el 3,1% de las muestras de H provenientes de AM inhibieron el crecimiento de BS, respectivamente. Resultados similares fueron demostrados por Sattar y col. [3]. Por otro lado, ninguna de las muestras de B provenientes de AM presentó dicho efecto. En referencia al contenido de huevo, se observó que el crecimiento de BS fue inhibido por el 100% y el 28,6% de las muestras de CL y Y, respectivamente. La inhibición del crecimiento para SE, SG, ST y SP fue del 20,5%, 13,8%, 7,6% y 7,1% en las muestras de CL, respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de inhibición del crecimiento en las muestras de Y fue de 28,6%, 13,8%, 13,3% y 13,3% para ST, SG, SE y SP, respectivamente. No se observó la presencia de SICB en las muestras de CL y Y provenientes de granjas que no recibieron ATB. La concordancia entre las muestras de CL y Y para cada serovar fue excelente (SG), buena (SP) y media (SE y ST). Las cepas de *Salmonella* spp. son mejor indicadoras de la presencia de residuos de ATB que la cepa de BS.

Se agradece al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y al Programa CYTED (Red 115RT0488).

Referencias

- [1] Barrow, PA. y Freitas Neto, OC. *Avian Pathology* (2011), 40:1-13.
- [2] Kang et al, *Avian Pathology* (2010). 39, 201-205.
- [3] Sattar S. et al., *Veterinary World* (2014), 7, 738–743.

P10 - Citotoxicidade de antioxidantes alimentares de origem vegetal em células de osteosarcoma humano U2OS

Marisa Nicolai, Nuno Almeida, Patrícia Rijo, João Costa, Nuno Saraiva, Ana Sofia Fernandes

CBiOS-Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

As plantas são uma das principais fontes de produtos naturais com propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante dos fitoquímicos atraiem atenção devido ao seu papel na prevenção e tratamento de diversas doenças humanas. Em relação ao cancro, dados epidemiológicos têm consistentemente relacionado o consumo de vegetais com um risco reduzido de vários tipos de doenças oncológicas. Embora a maioria da literatura mencione os antioxidantes dietéticos como agentes quimiopreventivos, outros estudos sugerem potenciais propriedades farmacológicas antitumorais. Contudo, os estudos disponíveis foram realizados em diferentes condições experimentais, impossibilitando uma análise comparativa das propriedades antitumorais dos compostos.

O osteosarcoma tem uma baixa incidência global. No entanto, é o terceiro tipo de tumor maligno mais comum na adolescência. Além disso, este tipo de cancro é localmente agressivo e tende a produzir metástases precocemente, justificando-se a procura de novas abordagens terapêuticas.

Deste modo, este trabalho avaliou o perfil citotóxico de onze antioxidantes encontrados em frutas e vegetais, em células de osteosarcoma humano U2OS, nomeadamente, catequina, kaempferol, quercetina, resveratrol, ácido gálico, ácido férulico, curcumina, ácido ascórbico, melatonina, licopeno e β -caroteno. Avaliou-se a viabilidade celular, através da técnica de coloração do violeta de cristal, após exposição das células durante 24 horas, a diferentes concentrações dos compostos na gama micromolar. O β -caroteno e o ácido gálico reduziram consideravelmente a viabilidade das células U2OS, tendo apresentado valores de IC50 iguais a 18,8 μ M e 184,5 μ M, respetivamente. Os restantes compostos não reduziram significativamente a viabilidade celular.

Estes resultados contribuem para a seleção de antioxidantes alimentares úteis em estratégias de combate a este tipo de cancro, quer através do desenho de regimes nutricionais personalizados, quer para o desenvolvimento de novos fármacos inspirados em produtos naturais.

P11 - Caracterização química e nutricional do bagaço de *Vitis vinera* L.

Nicolai, M.¹, Pereira, P.^{1,2}, Rijo, P.^{1,3}, Palma L.¹

¹Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

²Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

³Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

*Shared first authorship

O subproduto da vinificação é uma potencial fonte de diversos compostos químicos que podem ser aplicados nas indústrias farmacêutica e cosmética e especialmente na indústria alimentar, no sentido de melhorar as características nutricionais. O principal objetivo deste estudo foi a caracterização de cinco diferentes subprodutos da vinificação de duas regiões portuguesas, o Alentejo e o Ribatejo. Neste sentido, determinou-se o pH (3,77-4,52), teor de cinzas (3,69-7,93%), teor de humidade (5,23-15,10%), teor de polifenóis totais (0,16-1,93 mmol AG Eq/g de extrato), inibição atividade antioxidante (2,59-80,59%) e proteína (vestigiais). Os resultados mostraram uma elevada correlação entre a atividade antioxidante e os teores de polifenóis.

Com base nos resultados obtidos, a inclusão de bagaço de uva na produção industrial de alimentos pode constituir um importante contributo para o futuro da alimentação e nutrição humana considerando o seu elevado teor em antioxidantes.

P12 - Aplicação de líquidos iónicos derivados da colina como excipientes funcionais em formulações tópicas contendo compostos pouco solúveis

Rita Caparica^{1,2}, Ana Júlio¹, André Rolim Baby³, Maria Eduarda Araújo⁴, João Guilherme Costa^{1,5*}, Tânia Santos de Almeida^{1*}

¹CBIOS-Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

²Departamento Ciências Biomédicas, Universidade de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Espanha.

³Departamento de Farmácia, Escola de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 15, São Paulo, SP 05508-900, Brasil.

⁴Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

⁵Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal

*autoría sénior partilhada

O desenvolvimento de novos e mais eficientes sistemas de veiculação contendo compostos pouco solúveis continua a ser uma preocupação nos dias de hoje. Neste contexto, os líquidos iónicos (LI), devido às suas propriedades impares, como a sua suscetibilidade elevada a modificações e a sua possível incorporação em diferentes tipos de formulações, possibilitam a sua utilização como excipientes funcionais em sistemas de veiculação, aumentando a solubilidade e a incorporação de compostos pouco solúveis.

No âmbito deste trabalho, o líquido iónico derivado da colina e aminoácido - [Cho][Phe] foi sintetizado e a sua aplicação como excipiente funcional para aumentar a solubilidade de dois produtos naturais pouco solúveis, o ácido ferúlico e a rutina, foi avaliada. Adicionalmente, o impacto da combinação dos LI com os compostos estudados na viabilidade celular e na atividade antioxidante dos compostos foi também estudada.

Os resultados obtidos mostram que na presença de LI, a solubilidade do ácido ferúlico e da rutina é sempre maior, quando comparado com o controlo, sendo a sua solubilidade tanto maior quanto maior for a temperatura e a concentração de LI utilizado.

A segurança do sistema LI:composto, [Cho][Phe]:ácido ferúlico e [Cho][Phe]:rutina foi avaliada através de um estudo de viabilidade celular usando o ensaio do cristal violeta. Os resultados demonstraram que a presença do LI não afeta significativamente o impacto dos compostos ativos estudados na viabilidade celular.

Em seguida, de forma a avaliar influência do LI na atividade antioxidante do ácido ferúlico e da rutina, usou-se o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Os resultados demonstraram que a presença do LI não influencia a atividade antioxidante dos compostos. No entanto, como os LI aumentam a solubilidade dos compostos estudados, as soluções contendo LI apresentam uma maior atividade antioxidante devido à presença de uma maior quantidade dos compostos em solução

Posteriormente, foram ainda preparadas emulsões O/A contendo cada um dos compostos em estudo e o líquido iónico. As formulações preparadas demonstraram ser estáveis e a presença do LI permitiu a incorporação de maiores quantidades de ambos os compostos.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram que o líquido iónico estudado poderá ser utilizado como excipiente funcional uma vez que a sua presença, em concentrações não tóxicas, aumenta a solubilidade e a incorporação de compostos pouco solúveis em sistemas de veiculação tópica.

Agradecimentos: Este trabalho foi suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), através do financiamento UID/DTP/04567/2016 do CBIOS. Parte deste trabalho foi ainda financiado pela FCT através do financiamento CQB (UID/MULTI/00612/2013).

P13 - Hemi-síntese de carbamatos a partir do diterpeno natural 6,7-dehidroroileanona

Vera M. S. Isca¹, Catarina Garcia^{1,2}, Carlos M. Monteiro³, Noélia Duarte³, Carlos A.M. Afonso³, Patrícia Rijo^{1,3}

¹Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL.

²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, SPAIN.

³Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, PORTUGAL.

As roileanonas são compostos bioativos frequentemente presentes no genus *Plectranthus* [1]. O óleo essencial de *P. madagascariensis* é rico em 6,7-dehidroroileanona (DHR, 1, figure 1), uma roileanona citotóxica [2]. Este diterpeno tem um grupo hidroxilo ácido, o qual poderá sofrer reações que permitam a introdução de novos grupos funcionais na molécula.

O principal objetivo do trabalho a decorrer é a hemi-síntese de uma biblioteca de compostos com potencial citotóxico.

Realizou-se a extração de óleo essencial de *P. madagascariensis* em larga escala, por um método de extração otimizado [2], para o isolamento de DHR. Esta roileanona foi, então, sujeita a reações de carbamilação com diferentes isocianatos. Até a data foram obtidos os carbamatos 2, 3 e 4, na figura 1, com bons rendimentos de extração. A caracterização estrutural dos produtos obtidos foi conseguida com recurso a espectros de RMN e MS-ESI(+).

Referências:

[1] Rijo, P. et al., *Polymers* (Basel), 6, 479–490, 2014.

[2] Garcia, C. et al., *Future Med Chem*, 1, 1177–1189, 2018.

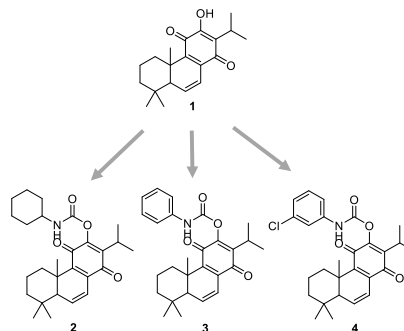


Figure 1 – 6,7-dehidroroileanone (DHR), 1 and new derivatives synthesized, 2 to 4.