

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

 EDITORA
ARTEMIS
2021

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

 EDITORA
ARTEMIS
2021

2021 by Editora Artemis
Copyright © Editora Artemis
Copyright do Texto © 2021 Os autores
Copyright da Edição © 2021 Editora Artemis



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof ^ª Dr ^ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^ª Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^ª Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Manuel Simões
Imagem da Capa	Vivilweb/123RF
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^ª Dr.^ª Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, Cuba*
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, *Universidade Federal de Uberlândia*
Prof.^ª Dr.^ª Amanda Ramalho de Freitas Brito, *Universidade Federal da Paraíba*
Prof.^ª Dr.^ª Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano, Peru*
Prof.^ª Dr.^ª Angela Ester Mallmann Centenaro, *Universidade do Estado de Mato Grosso*
Prof.^ª Dr.^ª Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Carmen Pimentel, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*
Prof.^ª Dr.^ª Catarina Castro, *Universidade Nova de Lisboa, Portugal*
Prof.^ª Dr.^ª Cláudia Padovesi Fonseca, *Universidade de Brasília-DF*
Prof.^ª Dr.^ª Cláudia Neves, *Universidade Aberta de Portugal*
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, *Universidade Federal da Grande Dourados*
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Deuzimar Costa Serra, *Universidade Estadual do Maranhão*
Prof.^ª Dr.^ª Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, *Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal*
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, *Universidade de São Paulo*
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, *Universidade Federal de Roraima*
Prof.^ª Dr.^ª Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México*
Prof.^ª Dr.^ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*



Prof.^a Dr.^a Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca*, Espanha
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República*, Uruguay
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara*, México
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona*, Espanha
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, *Universidade Federal do Triângulo Mineiro*
Prof.^a Dr.^a Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, *Instituto Politécnico da Guarda*, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Iara Lúcia Tescarollo Dias, *Universidade São Francisco*
Prof.^a Dr.^a Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura*, Peru
Prof.^a Dr.^a Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof. Dr. Ivan Amaro, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro*
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío*, Chile
Prof.^a Dr.^a Ivânia Maria Carneiro Vieira, *Universidade Federal do Amazonas*
Prof. Me. Javier Antonio Alborno, *University of Miami and Miami Dade College*, USA
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha*, Espanha
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, *Universidade de Évora*, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, *UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros*
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid*, Espanha
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín*, Colômbia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, *Universidade Estadual Paulista*
Prof.^a Dr.^a Livia do Carmo, *Universidade Federal de Goiás*
Prof.^a Dr.^a Luciane Spanhol Bordignon, *Universidade de Passo Fundo*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela*, Espanha
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, *Universidade Estadual Paulista*
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, *Universidade Federal de Sergipe*
Prof.^a Dr.^a Mar Garrido Román, *Universidad de Granada*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Margarida Márcia Fernandes Lima, *Universidade Federal de Ouro Preto*
Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida José de Oliveira, *Universidade Federal da Bahia*
Prof.^a Dr.^a Maria do Céu Caetano, *Universidade Nova de Lisboa*, Portugal
Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, *Universidade Federal do Maranhão*
Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Pato, *Instituto Politécnico de Viseu*, Portugal
Prof.^a Dr.^a Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"*, Cuba
Prof.^a Dr.^a Mauriceia Silva de Paula Vieira, *Universidade Federal de Lavras*
Prof.^a Dr.^a Odara Horta Boscolo, *Universidade Federal Fluminense*



Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Turpo Gebera Osbaldo Washington, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades / Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-87396-50-7

DOI 10.37572/EdArt_211221507

1. Biociência. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina. 4. Bioética.
I. Simões, Manuel.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

PREFÁCIO

A biotecnologia baseia-se em conhecimentos multidisciplinares fortemente associados às ciências naturais e exatas, e às ciências aplicadas. As ciências biológicas e o seu enquadramento na biotecnologia têm aplicações em grandes áreas de importância socioeconómica, principalmente na medicina humana e animal, ambiente, agronomia e na indústria. Os processos biotecnológicos são caracterizados por usarem células procariotas ou eucariotas, partes das mesmas ou análogos moleculares - com o objetivo de se obterem produtos e serviços. Avanços significativos na biotecnologia surgiram das sinergias estabelecidas entre engenheiros, cientistas e reguladores para transformar descobertas científicas em novos processos e produtos, com impacto socioeconómico. A elevada dinâmica académica e industrial no desenvolvimento de conhecimento em ciências biológicas e biotecnologia é revelador da sua importância. Contudo, a necessidade de atualização dos avanços científicos, em conjugação com a transformação desse novo conhecimento em conteúdo curricular técnico-científico relevante são desafios para um eficaz processo formativo de recursos humanos altamente qualificados. O enquadramento ético e regulamentar de novos processos e produtos é igualmente desafiante.

Este livro foi dividido em quatro partes: a primeira parte reúne capítulos (1 a 6) relacionados com as biociências e a biotecnologia na área biomédica. A segunda parte concentra capítulos (7 a 11) na área do ambiente. A terceira parte é composta pelos capítulos 12 a 14 que se enquadram em aspetos da bioprospeção. A quarta parte contém os capítulos 15 e 16 que abordam aspetos do ensino/aprendizagem em biotecnologia e da bioética, respetivamente. Neste contexto, pretende com este livro contribuir para que estudantes e professores do ensino superior, ligados às biociências e à biotecnologia, quer a nível de graduação quer de pós-graduação, possam ter uma perspetiva de avanços na área. Este livro pode ser também útil a profissionais ligados a setores nos quais as biociências e a biotecnologia têm um papel de relevo, bem como para professores do ensino pré-académico.

Manuel Simões

SUMÁRIO

BIOMEDICINA

CAPÍTULO 1..... 1

A DESCOBERTA DA INSULINA CELEBRA 100 ANOS

Maria Teresa Rangel-Figueiredo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215071

CAPÍTULO 2..... 16

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE SUSPENSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

Arisbel Cerpa-Naranjo

Begoña Ibañez Martínez

Isabel Lado Touriño

Mariana P. Arce


Javier Pérez Piñeiro

Niurka Barrios Bermúdez

María Luisa Rojas Cervantes

Rodrigo Moreno Botella

Sebastián Cerdán García-Esteller

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215072

CAPÍTULO 3.....28

PREMOLARES HUMANOS: ESTUDIO DE FOSITAS INYECTADAS CON COLORANTE Y SU RELACION CON ESTRUCTURAS DENTINALES

Marcela Zaffaroni

Santiago Cueto

Alicia Kohli

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215073

CAPÍTULO 4..... 40

EFFECT OF *Zinnia peruviana* ROOT EXTRACT ON THE PRODUCTION OF MICROBIAL BIOFILMS

Ana Mariel Mohamed

Diego Alberto Cifuentes

Sara Elena Satorres

Claudia Maricel Mattana

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215074

CAPÍTULO 5..... 50

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE TETRATIOMOLIBDATO DE AMONIO EN LA ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL

Rocío Ayelem Conforti

María Belén Delsouc

Marilina Casais

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215075

CAPÍTULO 6..... 61

LAS CARDIOPATÍAS, EL EJERCICIO Y SU INTERRELACIÓN AMBIENTAL: REVISION DE LITERATURA

Pedro Jorge Cortes Morales

Eduarda Eugenia Dias de Jesus

Fabricio Faitarone Brasilino

Luis Fernando Rosa

Maria Caroline Marcomini Tezolin

Luana de Andrade Mazia

Gilmar Sidnei Erzinger

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215076

AMBIENTE

CAPÍTULO 7..... 74

MICROFAUNA EM CÓRREGOS DE CABECEIRA DO CERRADO CENTRAL DO BRASIL

Claudia Padovesi-Fonseca

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215077

CAPÍTULO 8..... 85

ESTUDO SOBRE A GERAÇÃO, O PROCESSO SELETIVO E O DESTINO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DO CAMPUS DE PORTO NACIONAL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Brenda Thais Kalife de Assunção

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215078

CAPÍTULO 9..... 95

TRATAMIENTO BIOLÓGICO EM EFLUENTES DE ÁGUA PARA USINAGEM DE OLIVEIRA

Mariela Beatriz Maldonado

Emiliano Gabriel Fonarsin

Leonel Lisanti

Ariel Marquez

Walter Pirán

Noemi Graciela Maldonado

Pablo Enrique Martín

Daniela Adriana Barrera

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215079

CAPÍTULO 10..... 110

PRODUCCIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y SU USO EN SUELOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Jairo Vanegas Gordillo

Daniela Forero Gutiérrez

Paola Navarro Munoz

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150710

CAPÍTULO 11..... 132

USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO HIDROTHERMAL Y RADIACIÓN POR MICROONDAS DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN LA CAPTURA DE CARBONO Y AUMENTO DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS

Jairo Vanegas Gordillo

Laura Milena Bejarano

Paola Alexandra Aguilar Díaz

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150711

BIOPROSPEÇÃO

CAPÍTULO 12..... 154

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXTRAPOLISACÁRIDO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RESIDUOS OLIVÍCOLAS

Fodda Assad Robledo

María Alejandra Soloaga

Patricia Alejandra Córdoba

María Celeste Rosso
María de los Ángeles Spano Cruz
Verónica Alejandra Galleguillo
Gema Blanca Reynoso

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150712

CAPÍTULO 13.....163

SESQUITERPENOIDES DE PLANTAS NATIVAS DEL NOROESTE ARGENTINO CON ACCION INSECTICIDA

Susana Beatriz Popich

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150713

CAPÍTULO 14.....177

DORMANT RUPTURE AND HORMONES LEVELS IN *Jatropha curcas* L. AND *Jatropha macrocarpa* GRISEB SEED

Nancy Elisabeth Tavecchio
Lihué Olmedo Sosa
Ana Edit Vigliocco
Oscar Terenti
Erika Ayelen Escudero
Hilda Pedranzani

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150714

ENSINO E ÉTICA EM BIOTECNOLOGIA

CAPÍTULO 15.....190

DESAFIOS NO ENSINO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS BIOFILMES

Manuel Simões
Lúcia Chaves Simões
Conceição Fernandes
Maria José Saavedra

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150715

CAPÍTULO 16.....199

BIOÉTICA EN LA FORMACIÓN EN MEDICINA

Julia Susana Elbaba

 https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150716

SOBRE O ORGANIZADOR.....	206
ÍNDICE REMISSIVO	207

CAPÍTULO 12

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXTRAPOLISACÁRIDO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RESIDUOS OLIVÍCOLAS¹

Data de submissão: 23/08/2021

Data de aceite: 10/09/2021

Fodda Assad Robledo

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
Provincia: La Rioja- Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-5202-0324>

María Alejandra Soloaga

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina
<https://orcid.org/0000-0003-1815-2240>

Patricia Alejandra Córdoba

Centro de Investigación e Innovación
Tecnológica (CENIIT)
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-9929-7443>

María Celeste Rosso

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-2431-5627>

María de los Ángeles Spano Cruz

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina

Verónica Alejandra Galleguillo

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina

Gema Blanca Reynoso

Laboratorio de Microbiología
Departamento de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)
La Rioja- Argentina

RESUMEN: En este estudio se determinó la producción de extrapolisacáridos (EPS) a través de la capacidad para formar biopelículas, de cepas autóctonas de *Aerococcus viridans*,

¹ Financiación: Universidad Nacional de La Rioja. Resolución CICYT N° 026/2018.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Enterobacter cloacae, *Acinetobacter iwoffii* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de residuos olivícolas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de La Rioja, donde se crioconservan. La capacidad para formar biopelículas en estas cepas, se determinó cuantitativamente mediante la técnica O´Toole y se clasificaron según el criterio establecido por Stepanovic como no formadoras, formadoras fuertes, moderas o débiles. La cuantificación por espectrofotometría determinó que todas las cepas estudiadas fueron productoras de biopelículas. La mayor cuantificación celular fue presentada por *Enterobacter cloacae* cuyo valor de densidad óptica fue 0.45 seguida de *Pseudomonas aeruginosa* que presentó una densidad óptica de 0.30, mientras que las densidades ópticas para *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* fueron de 0.21 y 0.16. Según la clasificación utilizada, se consideró a *Enterobacter cloacae* como formadora fuerte (punto de corte de 0,41- 0.56). *Pseudomonas aeruginosa* se consideró como formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadoras débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se clasificó a *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii*. La caracterización del biofilm específico resulta importante para lograr describir los mecanismos en formación de las biopelículas bacterianas que promueven la resistencia a los antibióticos.

PALABRAS CLAVES: Extrapolisacáridos. Biopelículas. Residuos olivícolas. *Enterobacter cloacae*.

DETERMINATION OF THE EXTRA-POLYSACCHARIDE PRODUCTION OF BACTERIA FROM OLIVE RESIDUES

ABSTRACT: In this study, the production of extra-polysaccharides (EPS) was determined through the ability to form biofilms of autochthonous strains of *Aerococcus viridans*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii* and *Pseudomonas aeruginosa*. They were isolated from olive residues in the Microbiology Laboratory of the National University of La Rioja, which is the place where they are cryopreserved. The ability to form biofilms in these strains was quantitatively determined using the O´Toole technique. They were classified, according to the criteria established by Stepanovic, as non-forming, strong, moderate or weak forming. The quantification by spectrophotometry determined that all the studied strains were biofilm producers. *Enterobacter cloacae* presented the highest cell quantification. Its optical density value was 0.45, followed by *Pseudomonas aeruginosa*, which presented an optical density of 0.30, while the optical densities for *Acinetobacter iwoffii* and *Aerococcus viridans* were 0.21 and 0.16. According to the classification used, *Enterobacter cloacae* is considered a strong producer (cut-off point of 0.41-0.56). *Pseudomonas aeruginosa* is considered a moderate producer (cut-off point 0.22-0.41). Lastly, *Aerococcus viridans* and *Acinetobacter iwoffii* were classified as weak producers (cut-off points 0.11-0.26). The characterization of the specific biofilm is important to describe the mechanisms in the formation of bacterial biofilms that promote resistance to antibiotics.

KEYWORDS: Extrapolysaccharides. Biofilms. Olive residues. *Enterobacter cloacae*.

1 INTRODUCCIÓN

La Rioja es una de las principales provincias productoras de aceite de oliva en Argentina. Esta agroindustria se caracteriza por generar una gran cantidad de subproductos y residuos líquidos, sólidos y semisólidos en sus procesos de transformación.

Los microorganismos producen polisacáridos de tres tipos distintos: extracelulares, estructurales y formas intracelulares de almacenamiento. Los extrapolisacáridos (en adelante EPS) son polisacáridos de alto peso molecular que se encuentran al exterior de la célula microbiana pudiendo encontrarse como cápsula o disociados totalmente de la célula acumulándose fuera de la pared celular¹².

Los EPS pueden ser producidos por un amplio número de microorganismos tales como: arqueas, bacterias, algas unicelulares, levaduras y hongos⁴. Entre algunas bacterias se destacan: *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter sp*, *Alcagines latus*, *Enterobacter cloacae*, *Azobacter vinelandii*² y algunas especies del género *Bacillus*; como *B. megatorium*, *B. cereus*, *Paenobacillus jamilae*⁷.

Por otro lado, los EPS son constituyentes importantes de las biopelículas producidas por cepas bacterianas pertenecientes a la microbiota ambiental con un comportamiento saprófito, pero que frecuentemente son reportadas como microorganismos causantes de enfermedades tanto en humanos como en animales⁵. Las biopelículas son comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de exopolímeros, entre ellos EPS, que ellas mismas producen como mecanismo de supervivencia y protección. Esta capacidad les permite adherirse y colonizar superficies tanto en tejido vegetal y animal, plásticos, acero¹³. Además, les confiere resistencia a agentes físicos y químicos como así también, a diferentes mecanismos del sistema inmune innato, otorgándoles mayor resistencia a antibióticos debido a varios factores, entre ellos, la incapacidad del antibiótico para penetrar a través de la matriz exopolisacárida disminuyendo su eficacia⁶.

La resistencia a antibióticos se debería a varios factores, entre ellos, la incapacidad del antibiótico para penetrar en la biopelícula, a través de la matriz exopolisacárida disminuyendo la eficacia de los antibióticos¹⁴. Los microorganismos multiresistentes, sobreviven en diferentes ambientes mediante la formación de biopelículas y la resistencia a múltiples fármacos, es una característica que se puede transmitir horizontalmente entre bacterias, exacerbando el problema de la resistencia a los antibióticos en humanos¹⁴.

Actualmente existe gran interés en estudiar la composición química de los EPS de las biopelículas bacterianas por sus múltiples aplicaciones industriales y biomédicas. Sin embargo, no abundan en la bibliografía especializada estudios tendientes a determinar la capacidad para formar biopelículas, estableciendo así su inocuidad para habilitar su empleo con fines biotecnológicos.

El objetivo general de este trabajo fue determinar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad para formar biopelículas de *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* aisladas de residuos olivícolas producidos en La Rioja, Argentina.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS BACTERIANAS

El análisis filogenético de secuencias de ADNr 16S indicó que las cepas pertenecen a las especies *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aerococcus viridans*, confirmándose la identidad mediante pruebas fenotípicas⁹. Estas Cepas fueron previamente aisladas de muestras de residuos olivícolas¹⁰ y conservadas mediante criopreservación según el método de Simione³ en el laboratorio de Microbiología de la UNLaR.

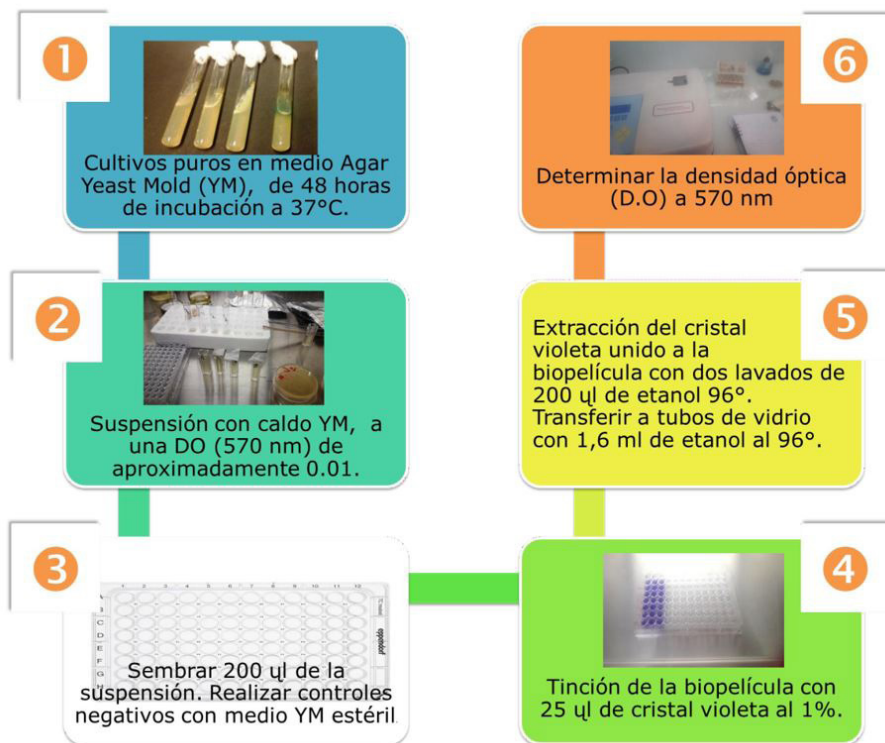
La viabilidad de las cepas crioconservadas se evaluó repicando las cepas en medio LB (Luria Beltrani) incubando a 30°C por 24 horas. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con Medio Mineral (Vogel- Bonner) adicionado con glucosa e incubadas a 37°C por 48 horas.

2.2 EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se determinó la capacidad de producir biopelículas de las cepas aisladas empleando la técnica de O´Toole⁸ con modificaciones. Ver esquema del proceso en la figura 1. La formación de biofilms se produce porque las bacterias se adhieren a las cubetas de las microplacas de poliestireno de fondo curvo. A continuación, se cuantificó la producción de las biopelículas por espectrofotometría. La mayor densidad óptica se considera mejor producción de biopelículas.

Para ello, se tomaron 3 a 4 colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo solido Yeast Mold(YM), de 48 horas de incubación a 37°C. Se realizó una suspensión con caldo YM, a una densidad óptica (DO_{570}) nm. de aproximadamente 0.01. En cada policubeta estéril, se sembró 200 ul de dicha suspensión, se realizaron controles negativos con medio YM estéril. Luego de incubar 12 horas a 37°C, se agregó 25 ul de una solución acuosa de cristal violeta al 1%, después de actuar 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con solución fisiológica para eliminar las células planctónicas (no integrantes de biopelículas). Sólo las células adheridas formadoras de biopelículas quedan en la superficie de la cubeta coloreadas con cristal violeta. Cuantificación de Biopelículas: el cristal violeta unido a las biopelículas se extrajo con dos lavados de 200 ul de etanol 96° (el cristal violeta adherido se solubiliza) y luego fueron transferidos a tubos de vidrio con 1,6 ml de etanol al 96°. Luego a determinó la densidad óptica (D.O) a 570 nm en un espectrofotómetro UV- Cercano Visible ZL-5000 Plus. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, se analizaron los promedios de las lecturas obtenidas para cada cepa y se compararon respecto al blanco.

Figura 1: Ensayo *in vitro* para la detección de la biopelícula en placa de poliestireno.



La interpretación de los resultados requiere definir un punto de corte que separe a las bacterias no formadoras de biopelículas de aquellas que sí son formadoras. Para ello se empleó una técnica estadística descrita por Stepanovic¹¹ para la interpretación de los resultados.

Para este estudio se calculó la media de la densidad óptica (DO) de los controles y se midió la densidad óptica de cada cepa bacteriana individualmente. A continuación, procedió a definir el punto de corte (DOc) utilizado. El DOc se define como tres Desviaciones estándares (DS) sobre la DO media de los controles: $DOc = DO \text{ media de los controles} + (3 \times DS \text{ de los controles})$.

Atendiendo a los resultados obtenidos, las bacterias se clasifican en:

- No Formadoras: La DO de la cepa se encuentra por debajo del punto de corte establecido ($DO \leq DOc$).
- Formadores débiles: La DO de la cepa se encuentra entre el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo ($DOc < DO \leq 2DOc$).
- Formadores moderados: La DO de la cepa se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo ($2DOc < DO \leq 4DOc$).

- Formadores fuertes: La DO de la cepa se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de ($4DO_c < DO$).

3 RESULTADOS

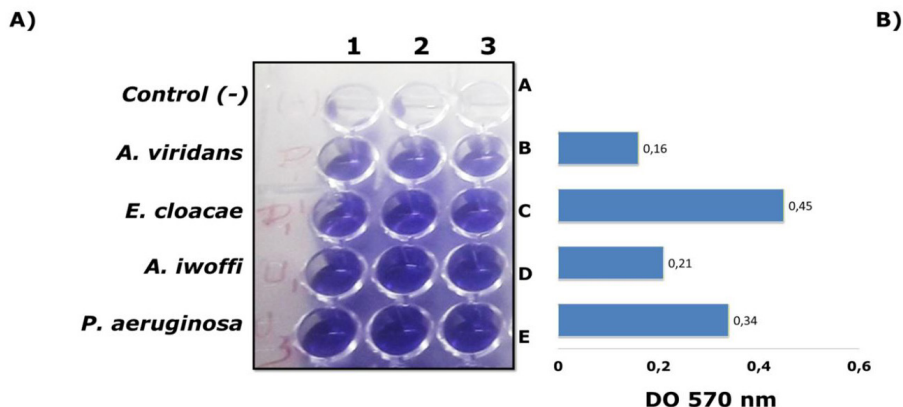
3.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS BACTERIANAS

Las cuatro cepas fueron activadas empleando el medio LB (Luria Beltrani) tras la incubación a 37°C por 48 horas, se observaron características como turbidez, formación de un velo en la superficie del medio, depósitos en el fondo con crecimiento homogéneo. Luego de repicar las cepas en el Medio Mineral (Vogel- Bonner) adicionado con glucosa y tras la incubación a 37 °C durante 48 horas de incubación.

3.2 EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Las cuatro especies bacterianas previamente identificadas, fueron estudiadas mediante la técnica de O'Toole⁸, la cuantificación por espectrometría determinó que todas las bacterias aisladas fueron productoras de biopelículas, algunas con mayor capacidad que otras, lo cual se evidenció con los resultados de las diferentes densidades ópticas. La mayor cuantificación celular fue presentada por *Enterobacter cloacae* cuyo valor de densidad óptica fue 0.45; seguida de *Pseudomona aeruginosa* que presentó una densidad óptica de 0.30, mientras que las densidades ópticas para *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* fueron de 0.21 y 0.16, respectivamente como se observa en la figura 2 A Y B.

Figura 2: A) Observación del ensayo *in vitro* para la detección de la biopelícula. Todas las muestras se testaron por triplicado. B) Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas. Pocillos del 1A al 3A: Control negativo; del 1B al 3B: *A. viridans* (DO 0,16); del 1C al 3C: *E. cloacae* (DO 0,45); del 1D al 3D *A. iwoffii* (DO 0,21) y del 1E al 3E *P. aeruginosa* (DO 0,34).



Según la clasificación establecida por Stepanovic¹¹, se pudo clasificar a las especies estudiadas. Se destacó como formador fuerte de biopelículas a *Enterobacter cloacae* (punto de corte de 0,41- 0.56), Dentro de formador moderado se situó a *Pseudomona aeruginosa* (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadores débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se situó a *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii*, según se describe tabla 1:

Tabla 1: Clasificación estadística de la capacidad de formar biopelículas *in vitro* de cepas nativas aisladas de residuos olivícolas. *Enterobacter cloacae* es un formador fuerte de biopelícula (punto de corte de 0,41- 0.56). *Pseudomona aeruginosa* es formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii* son formadoras débiles de biopelícula (puntos de corte 0.11- 0.26).

Especie	D.O	Puntos de corte
<i>A. viridans</i>	0.16	Formador débil (0.11 - 0.26)
<i>E. cloacae</i>	0.45	Formador fuerte (0.41-0.56)
<i>A. iwoffii</i>	0.21	Formador débil (0.11- 0.26)
<i>P. aeruginosa</i>	0.34	Formador moderado (0.22- 0.41)

4 DISCUSIÓN

La técnica de O´Toole utilizada en este estudio, permitió cuantificar la producción *in vitro* de EPS a través de la capacidad de formar biopelículas. Sin embargo, se deben elaborar protocolos que permitan establecer una extrapolación de los resultados obtenidos bajo condiciones de experimentación *in vitro*, optimizadas e ideales, las cuales proporcionan una máxima formación de biopelículas, a una situación real *in vivo*¹¹. Debido a este hecho, es importante identificar a aquellos microorganismos que son formadores fuertes de biopelículas *per se*, así como identificar también a los microorganismos que bajo determinados cambios de las condiciones del medio producidas en un medio *in vivo* son capaces de formar biopelículas. El punto crítico del estudio es lograr una estandarización del experimento ya que se hace imprescindible la necesidad de disponer de métodos de estudio de formación de biopelículas, un factor de virulencia que refleja directamente en la susceptibilidad a los antimicrobianos.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que las metodologías empleadas permitieron determinar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad

para formar biopelícula de *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* aisladas de residuos olivícolas producidos en La Rioja, Argentina. Mediante la técnica de O´Toole se pudo cuantificar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad para formar biopelículas de estas cepas, resultado ser una técnica medible y reproducible en el laboratorio mediante el diseño de un protocolo adecuado. La cuantificación por espectrofotometría realizada, determinó que todas las cepas estudiadas fueron productoras de biopelículas, siendo *Enterobacter cloacae* la cepa que presentó la mayor cuantificación celular, seguida de *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter iwoffii*. Según la clasificación estadística propuesta por Stepanovi^{c11}, se consideró a *Enterobacter cloacae* como formadora fuerte (punto de corte de 0,41-0.56). *Pseudomona aeruginosa* se consideró como formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadoras débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se clasificó a *Aerococcus viridans* y a *Acinetobacter iwoffii*. Son extensas las publicaciones científicas acerca de la producción de biopelículas y su estudio está ampliamente cubierto por muchos autores, pero la mayoría de las revisiones revelan información habitualmente restringida a las especies de referencia, como *Staphylococcus aureus* en gram positivos y *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli* en gram negativos. No obstante, en este trabajo se pudieron determinar otros microorganismos productores de biopelículas como *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans*. En este punto es importante resaltar que estas bacterias pertenecen a la microbiota ambiental con un comportamiento saprófito, pero que también son frecuentemente reportadas como microorganismos importantes a nivel hospitalario, es decir que son agentes causantes de enfermedades nosocomiales precisamente por la capacidad de producir biopelículas y la alta resistencia a desinfectantes y antibióticos. Además, este tipo de agentes están involucrados en la colonización e infección en pacientes inmunocomprometidos como patógenos oportunistas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Annous A. (2009). Biofilms in fresh fruit and vegetables. Biofilms in the food and beverage industries. Woodhead Publishing and CRC Press. Boca Raton; 517-535.
2. Chanprateep S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Bioscience and Bioengineering. 110(6), 621-632.
3. Day J., Stacey, G. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2ed. Totowa: Humana Press. 347.
4. De Almeida A. (2004). Bioplásticos: Una alternativa ecológica. Revista Química; 3: 122-133.

5. Dieser S., Fessia A., Ferrari M., Raspanti C., Odierno L. (2017). *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Revista Argentina Microbiología* 49(4):305-310.
6. Gunduz T., Tuncel G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 89:329-336.
7. Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A. (1990). Antibacterial activity of waste waters of olive oil mills. In: Cheremisinoff PN (eds) *Encyclopedia of environmental control technology*, vol 4. Gulf Publishing, Houston, 731–757.
8. O’Toole, G. A., y Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
9. Soloaga M.A., Rosso M.C., Spano Cruz M.A., Cordoba P.A., Rojas N.L. and Ghiringhelli P.D. (2018). Identificación molecular de bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos en residuos olivícolas. Bacteria 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. PopSet: 1418575285. GenBank. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nucore&Cmd=Link&LinkName=nucore_popset&IdsFromResult=1418575286 [visitado 27/08/2018].
10. Soloaga M. A., Rosso M. C., Spano Cruz, A., Galleguillo V., Zaracho A., Cortes Molina, V., Córdoba P., Rojas, N., Ghiringhelli P. (2016). Aislamiento de cepas bacterianas autóctonas productoras de polihidroxicanoatos en residuos olivícolas. I Simposio de Uso de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: resúmenes y mesa redonda. 1° Ed. Edición INTA. ISBN 978-987-521-715-7. Pág: 95.
11. Stepanovic S., Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: over-view of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS*; 115:891-9.
12. Sutherland I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*; 147: 3-9.
13. Vanegas L.; Correa, C.; Morales M.; Martinez L.; Rúgeles, G. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from Biofilms in a food processing plant. *Rev. MVZ.*; 14:2.
14. Velázquez N.; Guadarrama L. Olivares C., Salinas E. (2017). Presence of environmental coagulase-positive *staphylococci*, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. *Revista Argentina Microbiología*. 49(1):15-23.

SOBRE O ORGANIZADOR

Manuel Simões é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; N° orcid: 0000-0002-3355-4398

ÍNDICE REMISSIVO

A

Acetonic root extract 41
Aguas de maquinado de aceitunas 96, 99
Aplicaciones biomédicas 16, 17, 21
Áreas preservadas 74

B

Biochar 110, 111, 113, 114, 115, 116, 120, 121, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153
Biodiversidade aquática 74
Bioética 199, 200, 201, 204, 205
Biofilme 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196
Biopelículas 41, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161
Biorremediación 96, 98, 102, 105, 106, 107, 108

C

Captura de carbono 112, 116, 132, 133, 134, 136, 145, 146, 147, 148, 151, 153
Carbono orgánico 110, 111, 115, 116, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 135, 136, 137, 142, 143, 144, 145, 150
Caries 28, 29, 30, 36, 37, 38, 39
Ciência e tecnologia multidisciplinar 190
Cobre 19, 50, 51, 52, 122, 153
Competencias 199, 200, 202, 203, 204, 205

D

Destinação 85, 87, 89, 90
Diabetes mellitus 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 14, 15
Dormancy 177, 178, 179, 180, 183, 185, 186, 187, 188, 189

E

Efectos subletales 163, 172
Efluentes 96, 97, 98, 100, 102, 106, 107, 193
Ejercicio físico 62, 63, 66, 68, 70
Endometriosis 50, 51, 53, 58, 59, 60
Enfermedad cardiovascular 62, 63

Enmienda orgánica 110, 111, 125, 126, 129
Enmiendas orgánicas 110, 111, 132, 133
Enterobacter cloacae 155, 156, 157, 159, 160, 161
Esmalte 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37
Espécies endêmicas 74, 75, 76, 78, 82
Estradiol 51, 52, 54, 55, 57, 59
Extrapolisacáridos 154, 155, 156

F

Factores de caries 29
Falta de gestão 85

G

Glicemia 1, 2, 5, 9, 12

H

Hidrochar 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150
Hormona 1, 10, 11, 12, 51

I

Incorporación de efluentes 96
Insectos 163, 164, 165, 166, 167, 168, 171, 172, 173, 175
Insulina 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13

J

Jatropha 48, 177, 178, 180, 184, 185, 186, 187, 188, 189

M

Medicina 1, 4, 11, 13, 18, 28, 61, 62, 66, 67, 72, 175, 199, 200, 201, 204, 205
Medio ambiente 62, 63, 64, 66, 69, 97
Microbial biofilms 41, 42, 49
Microbiologia aplicada 190
Microondas 132, 133, 134, 135, 141, 144, 150
Microorganismos nativos 96, 99, 102, 103, 104, 106, 107

N

Nanotubos de carbono 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26

P

Per capita 85, 86, 89, 91

Percepção 199, 200, 203, 204

Permeabilidade dentinal 29, 37

Phytohormones 178, 187

Pirolisis 110, 111, 113, 119, 120, 124, 125, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 141, 144, 150, 151, 153

Potencial zeta 17, 19, 21, 22, 24

Productividade 110, 111, 112, 117, 128, 129

R

Reología 17

Resíduo sólido 85, 88, 89, 91

Resíduos olivícolas 155, 156, 160, 161, 162

Resíduos orgânicos 89, 110, 111, 113, 117, 118, 125, 132, 133, 134, 148, 149, 150

Resistência antimicrobiana 190

S

Savana 74, 75, 77

Savana brasileira 74

Seeds 178, 179, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189

Sesquiterpenoides 163, 166, 167

Suero fetal bovino 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25

T

Tetratiomolibdato de amonio 50, 51, 52

Tipos de esmalte 29

Toxicidad 41, 163, 164, 168, 169, 174

Tratamiento hidrotermal 132, 133

V

Vernonieae 163, 166, 167, 168, 172, 173, 176

Z

Zinnia peruviana 40, 41, 43, 44, 46, 48, 49