



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DE ESTÁGIO

MARIANA NAKABARA GAROZZO

**INSTRUMENTAÇÃO
LABORATÓRIO FITOFARMATEC**

**BOTUCATU
2023**

MARIANA NAKABARA GAROZZO

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DE ESTÁGIO

**INSTRUMENTAÇÃO
LABORATÓRIO FITOFARMATEC**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho como requisito parcial à obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

BOTUCATU
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Garozzo, Mariana Nakabara.

Instrumentação laboratório FitoFarmaTec / Mariana
Nakabara Garozzo. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Farmacologia. 2. Laboratórios. 3. Relatórios.

Palavras-chave: Farmacologia; Instrumentação; Laboratório.

Resumo

Trabalho de Conclusão de Curso realizado no Laboratório Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. O presente trabalho apresenta o relatório de atividades realizadas durante estágio em farmacologia, bem como seus principais conceitos, experimentos e uso de equipamentos de análise.

Abstract

Final Course Project carried out at the Phytopharmaceuticals, Pharmacology, and Biotechnology Laboratory (FitoFarmaTec) of the Institute of Biosciences in Botucatu, São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho. This paper provides a report on the activities conducted during the pharmacology internship, along with its key concepts, experiments, and the utilization of analysis equipment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO AO LABORATÓRIO FITOFARMATEC
2. UTENSÍLIOS DE PESQUISA
 - 2.1 Microtubo
 - 2.2 Tubo Falcon
3. APARATOS E MAQUINÁRIO DE ANÁLISES TECNOLÓGICAS
 - 3.1 Balança
 - 3.2 Pipeta
 - 3.3 Estufa
 - 3.4 Phmetro
 - 3.5 Vórtex
 - 3.6 Brix
 - 3.7 Incubadora
 - 3.8 Microscópio
 - 3.9 Centrifugadora
 - 3.10 Câmara fria
 - 3.11 Geladeiras -20°C e -80°C
 - 3.12 Cromatógrafo gasoso
 - 3.13 Cromatógrafo líquido
 - 3.14 Espectrômetro de massa
 - 3.15 Biomark
 - 3.16 Step One
 - 3.17 Espectrofotômetro
 - 3.18 Rotaevaporador
 - 3.19 Liofilizador
 - 3.20 Autoclave
4. PROCESSOS DE ANÁLISES PROTOCOLADOS
 - 4.1 Fermentação *in vitro*
 - 4.2 Análises de genotoxicidade
 - 4.3 Extração de DNA
 - 4.4 PCR
5. MANUTENÇÃO DO BIOTÉRIO
 - 5.1 Processos de higienização
 - 5.2 Manutenção dos animais
 - 5.3 Conceitos bioéticos
6. CONCEITOS
 - 6.1 Ácidos Graxos de Cadeia Curta
 - 6.2 Probióticos
 - 6.3 Prebióticos
 - 6.4 Polaridade Molecular
 - 6.5 Molaridade
 - 6.6 Padrão Interno
7. CONCLUSÃO

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO AO LABORATÓRIO FITOFARMATEC

O Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), liderado pelo Professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi e localizado no Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, conduz pesquisas em experimentação animal e humana com foco na Doença Inflamatória Intestinal, utilizando métodos farmacológicos e biotecnológicos. O laboratório avalia a eficácia e segurança de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais da flora brasileira, compostos naturais puros obtidos de espécies vegetais e da suplementação dietária com alimentos funcionais desenhados a partir de espécies comestíveis do Brasil. Além disso, o laboratório também estuda produtos naturais no controle da obesidade e de produtos dermo-cosméticos à base de extratos vegetais com foco prioritário na inflamação dérmica e como agentes anti-envelhecimento.

Para avaliar as diferentes potencialidades terapêuticas dos produtos naturais, o FitoFarmaTec utiliza ferramentas farmacológicas e biotecnológicas como testes *in vivo*, *in vitro*, *in silico* e de biofísica molecular, associados a métodos químicos e de expressão gênica e análises de microRNAs. O laboratório também realiza estudos por meio de técnicas de biofísica molecular e química quântica, principalmente com cumarinas naturais purificadas em projetos de pesquisa associados ao Grupo de Pesquisa de Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP - São José do Rio Preto.

2. UTENSÍLIOS DE PESQUISA

2.1 Microtubo

Os microtubos, mais conhecidos como “Eppendorfs” devido a sua marca, são pequenos tubos que podem variar de tamanho (desde 0,5mL a 2mL), feitos de plástico e muito utilizados na prática da pesquisa científica para aplicações na biologia molecular e bioquímica. Possuem uma tampa de fechamento seguro para preparação, centrifugação e armazenamento de substâncias.

2.2 Tubo Falcon

Os tubos Falcon são tubos relativamente maiores que o microtubo, também são feitos de plástico e possuem volume de 15mL e 50mL. Realizam a mesma função dos microtubos: são usados na preparação, congelamento, centrifugação e armazenamento de amostras químicas. Possuem uma tampa de rosquear que podem ser mais bem vedadas com plásticos específicos para essa função (Parafilm).

3. APARATOS E MAQUINÁRIO DE ANÁLISES TECNOLÓGICAS

3.1 Balança

A balança analítica é utilizada para medição de massas de amostras ou substâncias químicas. Ela possui alta precisão, mas deve estar devidamente regulada. É recomendado que o ambiente em que ela se encontra esteja fechado, pois até interferências como ventos ou ar-condicionado ocorram no resultado. Para isso, ela possui duas pequenas portas laterais que podem ser fechadas, de modo a evitar estes fatores externos.

3.2 Pipeta

As pipetas são tubos (pipeta Pasteur) ou aparelhos (pipetas automáticas) que medem volumes variáveis de líquidos para transferências entre recipientes. A pipeta Pasteur pode ser conhecida popularmente como “conta gotas”, e não possui alta precisão de medida. As pipetas automáticas, mais usadas nas atividades do laboratório, possuem alta precisão e podem captar desde as menores quantidades, como nL, até quantidades maiores, como mL, dependendo da sua especificação. Elas estão acompanhadas de ponteiras, que são os materiais descartáveis para o contato e a transferência com as substâncias.

3.3 Estufa

A estufa de laboratório é uma máquina muito importante para o andamento das pesquisas científicas. Ela serve para secagem, derretimento, ou outro controle de temperatura a qual uma substância deve ser encontrada. Ela também pode controlar fatores como umidade e pressão, e preparação de materiais esterilizados.

3.4 Phmetro

O Phmetro, ou medidor de pH, é um aparelho capaz de identificar a acidez ou a alcalinidade de soluções. Possui um eletrodo que gera tensão e identifica os átomos de H⁺, e os converte para a escala de 0 a 14 de pH.

Após seu uso, o canal do eletrodo deve ser limpo com água destilada para próxima medição.

3.5 Vórtex

O vórtex é um agitador de tubos que serve para homogeneização de substâncias. Pode possuir encaixes específicos para tubos e microtubos, ou pode conter um agitador externo capaz de agitar qualquer recipiente fechado.

3.6 Brix

Brix é uma escala de medida de sólidos solúveis em solução de sacarose, ou seja, é um aparelho que possui uma abertura que mede a quantidade de açúcar em líquidos. Ele funciona a partir do índice de refração da substância e conversão para escala Brix.

3.7 Incubadora

A incubadora é uma máquina que possui diversas funções no laboratório. Possui um ambiente fechado, em que se pode controlar a temperatura e a agitação do plano. É usada para proteção das amostras de agentes externos e principalmente, para os desenvolvimentos dos microrganismos em amostras experimentais, como o de fermentação *in vitro*, muito comum nos experimentos do laboratório FitoFarmaTec.

3.8 Microscópio

O microscópio é um instrumento de visualização de células ou microrganismos que não podem ser enxergados a olho nu. Possui diferentes lentes de aproximação, incluindo lentes que se deve usar óleo de imersão para melhor formação da imagem. As lâminas utilizadas nos

microscópios devem estar preferencialmente fixadas e coloridas especificamente de acordo com o material que se quer estudar.

3.9 Centrifugadora

A centrifugadora é uma máquina muito importante no laboratório. Ela é capaz de separar substâncias dentro da própria amostra. No laboratório FitoFarmaTec, a centrifugadora é muito usada na separação das fases polares e apolares das amostras para os estudos dos ácidos graxos (substâncias apolares). Pode-se determinar previamente a que velocidade e tempo em que ela centrifuga os tubos.

3.10 Câmara fria

A câmara fria é como se fosse uma grande geladeira de armazenagem de substâncias. Ela se mantém a 4°C e funciona principalmente para a manutenção dos reagentes químicos e amostras que devem permanecer estáveis até sua utilização.

3.11 Geladeiras -20°C e -80°C

As geladeiras -20°C e -80°C são equipamentos que congelam as substâncias para que elas não possuam nenhum tipo de atividade biológica que altere as composições das substâncias que serão analisadas. Normalmente, congela-se as amostras que estão mais perto de processamento e análise final.

3.12 Cromatógrafo gasoso

O cromatógrafo gasoso é uma máquina que separa substâncias orgânicas voláteis. A separação funciona a partir da diferente distribuição de substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel, em que um gás quimicamente inerte tem a função de eluir da coluna (fase estacionária) os componentes constituintes da solução. Os compostos com menor afinidade com a fase estacionária são os primeiros a eluir, seguidos dos compostos com maior afinidade. O tempo de análise depende da amostra e do objeto de estudo, mas normalmente é rápida, em torno de minutos. Porém, é necessário se atentar às práticas que antecipam a cromatografia, pois ela deve estar dentro dos padrões de análise do aparelho, de modo a evitar contaminações ou interferências (BARTLE, 2002, apud. NASCIMENTO *et al.*, 2018).

3.13 Cromatógrafo líquido

O cromatógrafo líquido, também chamado de HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), assim como o cromatógrafo gasoso, é usado na separação, identificação e quantificação de substâncias dentro de uma mistura (WATERS, 2013, apud. PORTO, 2014). A diferença principal entre as duas consiste no princípio de que a amostra deve ser solúvel na fase móvel. A cromatografia líquida, também, é muito utilizada na purificação de produtos como proteínas, ácidos nucleicos, esteroides etc.

Ela é constituída de colunas de aço inoxidável com diâmetro de 2mm e com presença de partículas inferiores a 2µm, que ajudam na separação das moléculas (PORTO, 2014).

3.14 Espectrômetro de massa

O espectrômetro de massa é um aparelho, que no laboratório FitoFarmaTec, está acoplado ao cromatógrafo gasoso, de modo que as substâncias que são solubilizadas no cromatógrafo, são determinadas a partir da relação entre massa e carga de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD, 2003, apud. CANTÚ, 2008).

3.15 Biomark

O Biomark é um aparelho de alto rendimento que processa, analisa e mensura marcadores moleculares de diferentes perfis de expressão gênica e genotipagem de amostras. Ele também realiza a detecção de assinaturas moleculares e a variação de células raras.

3.16 StepOne

O StepOne é um aparelho que permite a realização de PCR em tempo real. Ele funciona a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida de processos de detecção e quantificação de fluorescência produzida pelos ciclos de amplificação. Assim, ele permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA. No laboratório FitoFarmaTec, ele foi muito utilizado para estudar e identificar as bactérias da microbiota dos estudos *in vivo* e *in vitro* que corriam nas pesquisas vigentes. O material, depois de recolhido, foi processado em várias etapas até que estivesse pronto para avaliação no StepOne. Foram necessários reagentes específicos, como o SYBR, para que ele pudesse ser analisado no aparelho.

O SYBR é uma espécie de corante fluorescente utilizado nos estudos de moléculas. Ele se liga com os ácidos nucleicos formando um complexo muito brilhoso, que possibilita sua quantificação a partir da sua análise espectral (DRAGAN, 2012).

3.17 Espectrofotômetro

O Espectrofotômetro é um aparelho amplamente utilizado em laboratórios e sua função corresponde à medição e comparação de quantidade de luz absorvida por uma determinada solução. Seu funcionamento corresponde a uma fonte de luz que atravessa uma fenda até que chegue num prisma, que fraciona essa luz em comprimentos de ondas individuais para que apenas um deles chegue na amostra e possa ser detectado.

3.18 Rotaevaporador

Rotaevaporador, ou evaporador a vácuo, é um equipamento de laboratório que realiza a separação de solventes presentes em uma solução ou amostra, fazendo também a sua transferência para outros recipientes. Ele funciona a partir do aquecimento da amostra submetida a vácuo e assim, um solvente fará a evaporação da solução. Seu vapor será transferido até um condensador, onde ocorrerá sua condensação, com recolhimento em outro frasco do equipamento.

3.19 Liofilizador

O Liofilizador é um equipamento que permite a secagem de materiais sem a necessidade de aquecê-los. O princípio físico envolvido na liofilização é a sublimação, que é a passagem direta do estado sólido para o gasoso, sem a passagem pelo estado líquido. No laboratório FitoFarmaTec, a utilização deste equipamento foi necessária para a secagem dos produtos que seriam testados na fermentação *in vivo* e *in vitro* dos estudos do laboratório.

Em forma de pó, esses produtos poderiam ser formatados da melhor maneira para serem administrados na fermentação.

3.20 Autoclave

A autoclavagem é um tratamento e processamento térmico sob pressão bastante utilizado em ambientes que necessitam de materiais esterilizados. O Autoclave consiste em manter o material contaminado a uma temperatura elevada, através do contato com vapor de água, durante um período de tempo suficiente para destruir todos os agentes patogênicos e assim, esterilizando os materiais. Ele é indicado para a esterilização de instrumentos de plástico, termoplástico, borracha, fibra, tecido, acrílico e aço.

4. PROCESSOS DE ANÁLISES PROTOCOLADOS

4.1 Fermentação *in vitro*

O processo de fermentação *in vitro* é comumente realizado no laboratório FitoFarmaTec pelos alunos para os estudos dos ácidos graxos de cadeia curta metabolizados pelas bactérias da microbiota intestinal. Sua análise ocorre em quatro principais etapas, que no laboratório, foram realizadas em quatro dias, respectivamente.

A primeira etapa consiste nas preparações. Os produtos, que no caso consistiam na cevada e laranja, foram liofilizados e separados nas concentrações de interesse do experimento. Essas concentrações foram 100mg, 300mg e 1g. Em seguida, foram definidos os números de replicações, que acabaram sendo em duplicata, ou seja, cada concentração possuiria duas cópias para análise. Define-se, então, os grupos controle e os grupos teste, e assim são nomeados os tubos e microtubos nos quais os respectivos produtos seriam colocados. Outro reagente importante que foi preparado foi o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o ácido ortofosfórico (H_3PO_4). O bicarbonato de sódio funciona para alcalinizar a solução para que o meio tenha pH similar ao do intestino. O ácido ortofosfórico, futuramente, transformará a amostra no microtubo em uma solução heretofásica, que auxiliará na detecção dos ácidos graxos de cadeia curta.

Para preparar a solução de concentração ideal de bicarbonato de sódio para o experimento, foram necessários 0,9 mL, referente a três processos de fermentação que seriam realizados. Contabilizando a massa molecular dessa molécula, tem-se 84,01g. A concentração em mol é 159mmols. Ao aplicar a fórmula de concentração em mol/L, temos que seria necessário misturar 12,02g de bicarbonato de sódio com 900mL de água para atingirmos uma solução com concentração exigida.

Já para a solução de ácido ortofosfórico, foi necessário misturar o ácido que já estava a 5% de concentração no laboratório, e transformá-lo em uma solução de 0,5% adicionando 10 partes de água. Ou seja, para criarmos uma solução de 500mL com ácido ortofosfórico a 0,5%, adicionamos 50mL do ácido a 450mL de água.

A segunda etapa do processo consta no início da fermentação *in vitro*. O bicarbonato de sódio que foi armazenado na câmara fria foi retirado e aquecido na incubadora a uma temperatura de 37°C, como a do corpo humano. Foram trazidas as amostras de fezes e separados 2g de amostra por tubo Falcon para receber cada uma a sua concentração de produto designada no dia anterior.

As misturas são realizadas na capela pois é um ambiente que ameniza os odores e facilita o manuseio dos reagentes. Em cada tubo Falcom com os 2g de fezes, adicionou-se 10mL de bicarbonato de sódio e as respectivas concentrações dos produtos a serem testados. Os tubos foram preenchidos com Argônio pois assim retira-se o oxigênio do tubo e então são lacrados para permitir a fermentação, já que no intestino ela ocorre de forma anaeróbia. As amostras foram homogeneizadas no vórtex e colocadas na incubadora por 24 horas, a 150rpm a 37°C para que o processo de fermentação ocorra.

A terceira etapa ocorre após as 24 horas de fermentação das amostras na incubadora. Os tubos são retirados da incubadora e abertos para a adição de 6mL ácido ortofosfórico (1:1) com a intenção de ajudar na separação de duas grandes fases da amostra: uma fase com característica polar, e outra, apolar. Nesta última, seria a fase para onde os ácidos graxos de cadeia curta migrariam e seriam encontrados. Os tubos, agora com o ácido ortofosfórico presente, são novamente agitados no vórtex e colocados 2g em microtubos para que futuramente ele possa ser colocado na centrífuga. Esses microtubos são congelados até o próximo dia.

A quarta etapa é a etapa de processamento para análise. As amostras são descongeladas e passam novamente pelo agitador e então pela centrífuga. Após esse processo, retira-se 1mL do sobrenadante com ajuda da pipeta e o transfere para um novo microtubo. Em seguida, deve ser adicionado um novo reagente importante para a análise dos ácidos graxos de cadeia curta, o acetato de etila. Assim como o ácido ortofosfórico, ele ajuda na separação das moléculas polares das apolares no microtubo, melhorando ainda mais a purificação dos ácidos graxos que são de interesse para o estudo. Com o acetato de etila adicionado, os tubos são novamente agitados e centrifugados, para que haja novamente a transferência da fase apolar para outro microtubo. A seguir, essa solução, rica em ácidos graxos, será transformada numa solução capaz de ser analisada pelo cromatógrafo com a adição do padrão interno, que é uma substância de valor já conhecida, para quantificação.

4.2 Análises de genotoxicidade

O teste de genotoxicidade realizado por meio da análise do teste de micronúcleos foi realizado no laboratório FitoFarmaTec com o intuito de investigar a toxicidade da cevada que foi implementada na ração de animais na experimentação *in vivo*.

O micronúcleo é um corpo pequeno de DNA que se encontra no citoplasma após a telófase devido a disfunções do fuso mitótico ou quebras isocromatídicas da divisão celular (RIBEIRO, et al., 2003, apud. DA SILVA, et al., 2011). O teste de micronúcleos é muito utilizado para a identificação de agentes clastogênicos e aneugênicos, de modo a enxergar a capacidade do produto em questão de gerar mutações no DNA das células (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994, apud. DA SILVA et al., 2011).

O teste, em prática, constava na contagem de 1000 células presentes na lâmina feita a partir da medula óssea de ratos. O tecido ser a medula óssea é importante pois são células que estão em constante multiplicação (VILELA, et al., 2003, apud. DA SILVA, et al., 2011). Dessas 1000 células contabilizadas, deve-se saber quantas eram eritroblastos normocromáticos e quantas eram eritroblastos policromáticos. Do número total de eritroblastos policromáticos contabilizados, haveria outro número que representasse a presença de micronúcleo nestas

células, que indicariam ação de toxicidade de produto caso fosse um número alto em relação ao número de células saudáveis.

4.3 Extração de DNA

O processo de extração e purificação de DNA é necessário antes da análise de PCR. É nesse momento que se utilizam kits e materiais especializados. Porém, de modo geral, pode-se dizer que o DNA é purificado a partir de fragmentos de gel, que são primeiro solubilizados para liberar o DNA. A amostra é então carregada em uma coluna de rotação do kit e isolada usando um procedimento simples de ligação/lavagem/eluição. Assim, os fragmentos de DNA são recuperados em tampão ou água, prontos para uso e análise posteriores.

4.4 PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um processo extremamente importante e reconhecido como uma das técnicas mais importantes da biologia molecular. Pequenas quantidades de material genético são amplificadas para identificar e manipular DNA, detectar organismos infecciosos, variações genéticas, incluindo mutações e realizar inúmeras outras tarefas. A PCR envolve três etapas: desnaturação, hibridação e extensão. Primeiramente, o material genético é desnaturado, convertendo moléculas de DNA de fita dupla em fitas simples. Os iniciadores, mais comumente chamados de primers, são moléculas de oligonucleotídeos específicos para o reconhecimento desse DNA que será amplificado (NASCIMENTO, 2010). Em seguida, ocorre a hibridação nas regiões complementares das moléculas de fita simples. Na terceira etapa, eles são estendidos pela ação da DNA polimerase, de modo a serem amplificados, quantificados e analisados (BORAH, 2011).

5. MANUTENÇÃO DO BIOTÉRIO

5.1 Processos de higienização

O biotério é um espaço que deve ser mantido limpo mesmo quando não há a presença de animais, bem como os materiais que são utilizados lá dentro. É um espaço que será um importante passo da experimentação e por isso é necessário que a sua manutenção seja constante.

A partir do momento em que há animais no biotério, é imprescindível que o ambiente seja cuidadosamente mantido durante todo o tempo da experimentação, não apenas para que os resultados sejam os melhores possíveis, mas também pelo bem-estar dos animais que vivem lá. Existem regras que exigem a manutenção do biotério de acordo com o próprio comportamento do animal.

Instalações como estantes especializadas para alocação dos animais, filtros de ar e as próprias caixas em que os animais são mantidos tem suas especificidades de modo a contribuir tanto com a experimentação, quanto com a vida dos mesmos.

5.2 Manutenção dos animais

Uma vez que os animais estão presentes no biotério, antes mesmo do início do experimento, é necessário que tenham alguns dias de aclimação. Isso é importante para que eles passem por processos de reconhecimento do lugar, acomodação e até estabelecimento da

dominância entre os componentes dentro de cada caixa. Os camundongos tendem a ser mais dominantes e agressivos que os ratos, já que as duas espécies de animais costumam ser usadas em experimentos no laboratório FitoFarmaTec.

Após os dias de aclimação, em que eles já estão acostumados com o novo ambiente, o experimento pode começar. No laboratório, os animais foram separados em diferentes grupos, sendo eles: controle, banana, açai e café. Os tratamentos são produtos a partir das referidas plantas que foram implementadas na alimentação junto da ração dos animais.

Para a manutenção dos animais, é necessário que pelo menos uma vez por semana as caixas fossem trocadas, bem como a maravalha e o bebedouro. A ração era contabilizada e repostada de acordo com o consumo.

Todas as anotações são válidas: animais feridos, comportamentos estranhos ou consumo de água e ração fora do normal devem ser levados em consideração na experimentação animal.

5.3 Conceitos bioéticos

A experimentação com animais de laboratório requer regras e conceitos bioéticos devido ao respeito que se deve ter com a vida dos animais. Apesar de serem animais de testes, eles ainda são seres vivos que merecem condições dignas de existência.

Os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório foram desenvolvidos pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL). Dentre os principais artigos, pode-se citar:

ARTIGO I – Todas as pessoas que pratiquem a experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar a dor;

ARTIGO II – O experimentador é, moralmente responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal;

ARTIGO III – Procedimentos que envolvam animais devem prever e se desenvolver considerando-se sua relevância para a saúde humana o animal, a aquisição de conhecimentos ou o bem da sociedade;

ARTIGO IV – Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas a apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo necessário para se obter resultados válidos. Ter em mente a utilização de métodos alternativos tais como modelos matemáticos, simulação por computador e sistemas biológicos “*In vitro*”;

ARTIGO V – É imperativo que se utilizem os animais de maneira adequada, incluindo aí evitar o desconforto, angústia e dor. Os investigadores devem considerar que os processos determinantes de dor ou angústia em seres humanos causam o mesmo em outras espécies, a não ser que o contrário tenha se demonstrado;

ARTIGO VI – Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequadas. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem se realizados em animais não anestesiados e que estejam apenas paralisados por agentes químicos e/ou físicos;

6. CONCEITOS

6.1 Ácidos Graxos de Cadeia Curta

O intestino humano é altamente colonizado não só por muitos microrganismos diferentes, mas também de espécies diferentes. A maioria desses colonizadores são bactérias que vivem em simbiose com o organismo humano, de modo a construírem uma barreira defensora e protetora do trato gastrointestinal. A microbiota intestinal, assim chamada essa colônia de microrganismos encontrada no intestino humano, trabalha não apenas como essa barreira protetora, mas também como metabolizadora de substratos que são ingeridos mas não digeridos pelo organismo. Uma das principais categorias de moléculas produzidas por essa microbiota intestinal a partir da fermentação anaeróbica e metabolização dos nutrientes, são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os AGCCs são ácidos graxos orgânicos, que possuem uma cadeia de, em média, 2 a 6 carbonos, e que apresentam características comprovadamente promissoras em atividade anti-inflamatória, não apenas em regiões do intestino, mas também em todo o organismo a partir da sua difusão pelo sistema circulatório.

Os AGCCs mais estudados e conhecidos são acetato (C2), propionato (C3), butirato (C4) e valeriato (C5) (VINOLO et al., 2011).

Os AGCCs são moléculas muito estudadas também no laboratório FitoFarmaTec, a partir dos processos de fermentação *in vivo* e *in vitro*. Após a purificação das amostras de fezes e análise processadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, é possível identificar a presença desses ácidos graxos, assim como determinar sua concentração.

6.2 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que são implementados no corpo humano de diferentes formas, seja pela alimentação ou medicação e que, em quantidades adequadas, são benéficas para as atividades fisiológicas do corpo e à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2013). Para agir desta forma, os probióticos exercem efeitos protetores, competindo e aumentando a resistência contra patógenos. Assim, sua utilização ajuda no crescimento de colônias com bactérias que são úteis e benéficas, em contrapartida ao detrimento de bactérias potencialmente prejudiciais, de modo a melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ, 2002).

6.3 Prebióticos

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que estimulam a produção de moléculas ou atividades específicas e benéficas por bactérias que compõem a microbiota intestinal. Além disso, os prebióticos podem evitar o crescimento de patógenos no hospedeiro (GIBSON, ROBERFROID, 1995; MATTILA-SANDHOLM, 2002).

No laboratório FitoFarmaTec são estudados desenvolvimentos de potenciais fibras prebióticas a partir de produtos de plantas medicinais, principalmente encontradas na cadeia agrícola brasileira.

6.4 Polaridade Molecular

A polaridade das moléculas pode ser descrita pelas cargas elétricas, juntamente da simetria dessas cargas dentro de uma molécula. Assume-se que as moléculas assimétricas são

polares, e que as moléculas simétricas são apolares, referindo-se a densidade eletrônica. A simetria da molécula está associada a dois fatores: ao tipo de átomo envolvido na ligação e a geometria molecular (SOLOMONS, 1999).

No laboratório FitoFarmaTec, o conceito de polaridade aparece muito quando estudamos a purificação dos ácidos graxos. Neste caso, as moléculas de ácidos graxos apresentam uma extremidade polar e outra apolar, e são chamadas de anfipáticas. O que confere esta característica a esse tipo de molécula é a presença de uma função de ácido carboxílico polar de um lado, em contrapartida a uma cauda de hidrocarbonetos que confere característica apolar a outra extremidade da molécula.

6.5 Molaridade

Molaridade, ou concentração em mol/L, é uma relação existente entre o número de mols de soluto e o volume da solução em litros e pode ser expressa pela expressão $M=n/V$. Usa-se o devido conceito para a estipulação de concentrações de soluções químicas.

6.6 Padrão Interno

O padrão interno é uma substância inespecífica usada para ser adicionada a uma mistura como elemento de referência para quantificação após análise. Ou seja, é uma substância que é adicionada, em quantidades e propriedades conhecidas que permite, após a inserção de uma amostra no cromatógrafo, por exemplo, quantificar as outras moléculas presentes a partir da comparação com as quantidades conhecidas desse padrão interno.

7. CONCLUSÃO

A formatação do TCC como instrumentação permitiu que fossem conhecidas diferentes práticas e atividade dentro do laboratório FitoFarmaTec. Além disso, estudar como esses processos funcionam para descrevê-los ajuda na fixação no entendimento maior sobre tecnologia e a pesquisa científica.

Como aluna e participante do laboratório, pude conviver com mestrandos e doutorandos que mostram um pouco da rotina da profissão do biólogo pesquisador, sendo elucidador e complementar à formação que se tem durante a graduação.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório que foram pacientes e me ensinaram como ser uma pesquisadora e como trabalhar em grupo dentro do ambiente acadêmico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORAH, P. Primer designing for PCR. **Science Vision**, v. 11, n. 3, p. 134-136, 2011.
- CANTÚ, Marcelo Delmar et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- DA SILVA, Francisco Carlos et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.
- DRAGAN, A. I. et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. **Journal of fluorescence**, v. 22, p. 1189-1199, 2012.
- GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- MATTLA-SANDHOLM, Tiina et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.
- NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do et al. Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. E-book. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. 334 p. (Estudos da Pós-Graduação). Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39260>.
- NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.
- PORTO, Helena Sofia Morgado. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspectos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. 2014. Tese de Doutorado.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R. A. M. A. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.
- SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SOLOMONS, TW Graham; FRYHLE, Craig B. **Química orgânica**. Limusa, 1999.
- VINOLO, Marco AR et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.