



## **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO E MEIOS DE CULTURA NA OBTENÇÃO DE CERCOSPORINA PRODUZIDA POR *Cercospora aff. canescens***

Gabriela Maria de Lima **Dias**<sup>1</sup>; Elke Simoni Dias **Vilela**<sup>2</sup>; Daniel de Eiji Hinoue de **Souza**<sup>3</sup>;  
Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**<sup>4</sup>; Kátia de Lima **Nechet**<sup>5</sup>

**Nº 22405**

**RESUMO-** *O objetivo deste trabalho foi determinar como diferentes métodos de fermentação e meios de cultura influenciam na produção de cercosporina de Cercospora aff. canescens (CMAA 1444). O isolado foi selecionado como candidato a mico-herbicida no controle de cordas-de-viola. Os ensaios foram realizados utilizando a fermentação submersa e fermentação sólida e doze combinações do meio de cultura Czapek-Dox modificado. Na fermentação submersa foram utilizados Erlenmeyers contendo 5 discos de micélio do isolado e mantidos em agitador orbital (150 rpm) a 25°C. Na fermentação sólida foram utilizadas placas de Petri contendo quatro discos de micélio e mantidas em incubadora tipo BOD, a 25°C. Nos ensaios, os fotoperíodos adotados foram 0, 12, ou 24 h. Após 21 dias, as extrações dos metabólitos com solvente de acetato de etila foram realizadas a partir da biomassa e da fração líquida obtida da fermentação submersa, e da biomassa obtida da fermentação sólida. Os extratos foram submetidos à análise de cromatografia em camada delgada visualizadas a  $\lambda = 365$  nm e os resultados comparados com o padrão analítico de cercosporina. Os metabólitos obtidos da fermentação submersa indicaram a produção de diversos compostos não identificados. O metabólito obtido da fermentação sólida apresentou similaridade com o padrão analítico de cercosporina, utilizando meios de cultura compostos pela combinação de 1 g de nitrato de cálcio e variações de dextrose (22,5, 45 e 4,5 g), de sulfato de magnésio e fosfato de potássio (1, 2,5 e 0,25 g), independente do fotoperíodo.*

**Palavras-chaves:** *Ipomoea spp.*, metabólitos secundários, controle biológico, mico-herbicida.

<sup>1</sup>Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Química, ESAMC, Campinas-SP; lima.gabi360@gmail.com

<sup>2</sup> Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; elke.vilela@embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista Embrapa: Graduação em Biotecnologia, UNICAMP, Campinas-SP; eijihinoue18@gmail.com

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br.

<sup>5</sup> Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.br



**ABSTRACT** – *The aim of this work was to determine how different fermentation methods and culture media influence the production of cercosporin by Cercospora aff. canescens (CMAA 1444). The isolate was selected as a potential mycoherbicide to control the weed species morning glories. Each of the twelve assays were carried out using 12 different combinations of Czapek-Dox media modified and submitted to liquid and solid fermentation. Erlenmeyers containing five mycelial disks from the isolate were maintained in an orbital shaker (150 rpm) at 25 °C and used in the liquid fermentation. In the solid fermentation, Petri dishes with 4 mycelial disks were maintained in BOD incubator at 25 °C. In the assays, the photoperiods adopted were 0, 12, and 24 h. After 21 days, the metabolites were extracted with ethyl acetate, using the biomass and liquid fraction obtained from liquid fermentation, and the biomass obtained from solid fermentation. The extracts were submitted to thin layer chromatography, visualized at  $\lambda = 365$  nm and the results compared with a cercosporin analytical standard. The metabolites resulting from liquid fermentation indicated the production of non-identified multiple compounds. The metabolite from solid fermentation was similar to the cercosporin analytical standard and were obtained by using different culture media composed of combinations of 1 g of calcium nitrate with variations of dextrose (22,5, 45, and 4,5 g), magnesium sulfate, and potassium phosphate (1, 2,5, and 0,25 g), regardless of the photoperiod.*

**Keywords:** *Ipomoea* spp., secondary metabolites, biological control, mycoherbicide.



## 1. INTRODUÇÃO

As cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.) são importantes invasoras em áreas de cana crua, uma vez que apresentam capacidade de germinar sob a camada de palha que se forma em áreas de cana-de-açúcar manejadas sem queima (MONQUERO *et al.*, 2011). Essas plantas competem tanto no início da cultura, mas também durante a colheita, pois seus ramos se fixam aos colmos, dificultando o corte mecanizado, e comprometendo o rendimento das máquinas e qualidade do produto colhido (LORENZI, 2006; BHULLAR *et al.*, 2012 SEM REF). Além disso, a presença da palha diminui a eficácia tanto de herbicidas pré-emergentes como dos pós-emergentes em função da barreira física formada pela palha. (PIZZO *et al.*, 2010; SILVA; MONQUERO, 2013).

Estudos de controle biológico pelo método mico-herbicida com o uso de fungos fitopatogênicos vêm sendo conduzidos na Embrapa Meio Ambiente visando o desenvolvimento de um bioinsumo para o controle de cordas-de-viola. O isolado fúngico de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 (GenBank MG652650) foi selecionado como candidato a mico-herbicida por ser capaz de causar mancha foliar seguida de desfolha nas plantas-alvo (NECHET *et al.*, 2019). Entretanto, o principal problema é a dependência da alta concentração de inóculo da suspensão utilizada ( $2 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>) para causar desfolha nas plantas, e a dificuldade de produção de inóculo desse isolado (NECHET; HALFELD-VIERA, 2019), uma vez que o gênero *Cercospora* é de difícil esporulação *in vitro*.

Por outro lado, *Cercospora* também é conhecido pela produção da fitotoxina cercosporina, do grupo químico perylenequinonas, que desempenha um papel importante no processo de infecção do patógeno em plantas (DAUB, 1982). A identificação de metabólitos secundários pode resultar na obtenção de bioativos com ação herbicida que podem ser utilizados diretamente no controle da planta-alvo ou em conjunto com o inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* para aumentar a sua infectividade.

Considerando-se que a produção de metabólitos secundários *in vitro* é influenciada pelas condições de cultivo do fungo, este trabalho teve como objetivo determinar como diferentes métodos de fermentação e meios de cultura influenciam na produção de cercosporina por *Cercospora* aff. *canescens*.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente. Os ensaios foram compostos de doze combinações diferenciada dos componentes do meio de cultura Czapek-Dox modificado (Ensaio E a Q): dextrose ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ -40% C), nitrato de cálcio ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 17% N), sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ), cloreto de potássio (KCl), e sulfato de ferro ( $FeSO_4 \cdot H_2O$ ) (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) (Tabela 1). Para os componentes KCl e  $FeSO_4 \cdot H_2O$  utilizou-se a mesma quantidade em todos os ensaios, 0,5 g e 0,03 g, respectivamente. Os pHs dos meios de cultura variaram de 7 a 8,5. Os ensaios foram realizados utilizando dois tipos de fermentação: fermentação líquida submersa e fermentação sólida. Na fermentação sólida, 16 g de ágar por litro foi adicionado ao meio de cultura.

**Tabela 1.** Variação dos componentes do meio de cultura (g) e condições de cultivo dos ensaios de fermentação com *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444).

Composição dos meios de cultura e fotoperíodos dos ensaios					
Ensaio	Dextrose (g)	Nitrato de Cálcio (g)	Sulfato de Magnésio (g)	Fosfato de Potássio (g)	Fotoperíodo
E	22,5	1	1	1	24 h
F	50	23,5	1	1	24 h
G	45	1	1	2,5	24 h
H	100	23,5	1	2,5	24 h
I	4,5	1	1	1	24 h
J	1	23,5	1	1	24 h
K	4,5	1	1	1	12 h
L	45	1	2,5	2,5	24 h
M	4,5	1	1	1	12 h
N	4,5	1	1	1	0 h
P	4,5	1	0,25	2,5	12 h
Q	4,5	1	2,5	0,25	12 h

O isolado de *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444) foi recuperado da preservação pelo método Castellani (CASTELLANI, 1967), e repicado para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), mantidas em incubadora tipo BOD a 25°C com fotoperíodo de luz 12/12h. Após este período, cinco discos de BDA contendo crescimento fúngico foram transferidos



para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio líquido sintético Czapek-Dox modificado (fermentação líquida submersa) e quatro discos transferidos para placas de vidro com 90 mm de diâmetro contendo 20 ml de meio sólido sintético Czapek-Dox modificado (fermentação sólida).

### **2.1) Extrações da fermentação líquida submersa**

Os frascos da fermentação líquida submersa foram mantidos em incubadora orbital a 150 rpm, a 25 °C, e as placas de Petri da fermentação sólida foram mantidas em incubadora tipo BOD, a 25 °C, por 21 dias. Nos ensaios, os fotoperíodos adotados foram 0, 12, ou 24 h. (Tabela 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição um Erlenmeyer ou uma placa de Petri.

Após 21 dias, a biomassa fúngica e a fração líquida obtida de cada ensaio da fermentação submersa foram transferidas para frascos do tipo Falcon e centrifugadas para separação da parte líquida e da biomassa fúngica (Figura 1 A).

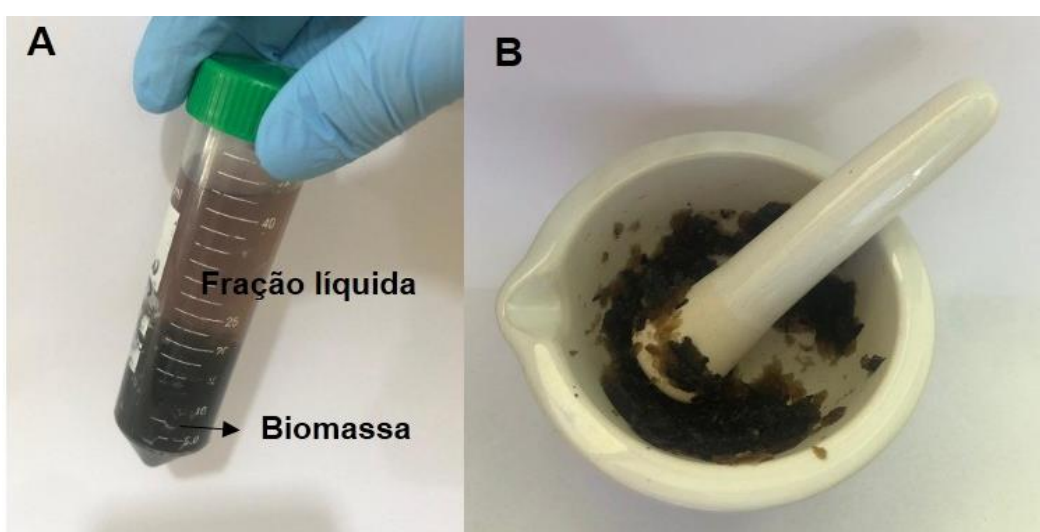
A extração da parte líquida foi realizada em três etapas utilizando 50 mL, 30 mL e 30 mL do solvente acetato de etila obtendo um único extrato. A este extrato foi adicionado sulfato de sódio para absorção de gotículas de água formadas pelo processo de emulsão e filtradas com o papel de filtro Whatman N° 1. A secagem dos extratos foi realizada em rotaevaporador a 35 °C, com vácuo de 200 mmHg, para a obtenção do extrato de meio líquido da fermentação líquida submersa (GUNASINGUE *et al.*, 2016).

A biomassa fúngica foi filtrada, utilizando em papel de filtro Whatman N° 1, e submersa em uma solução 5 N de hidróxido de potássio por 4 horas e mantidas em agitação (JENNS *et al.*, 1989). As repetições de cada ensaio foram reunidas em uma única amostra que foi ajustada com ácido clorídrico até pH 7,0 com posterior extração. A extração foi feita utilizando a mesma metodologia da parte líquida conforme mencionado anteriormente para obtenção do extrato de biomassa fúngica da fermentação submersa.

### **2.2) Extração da fermentação sólida:**

A extração da fermentação sólida foi feita utilizando-se o meio sólido com crescimento fúngico da placa de Petri, triturado em um cadinho com auxílio de pistilo (Figura 1B). Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos com 20 ml de acetato de etila, mantidos por 10 min em banho de ultrassom e, em seguida em mesa agitadora a 150 rpm por duas horas. Posteriormente, foi adicionado às amostras, sulfato de sódio e filtrado com papel de filtro Whatman N° 1 para

obtenção de material sólido, submetido a mais dois processos de extração com 10 mL de acetato de etila. As repetições de cada ensaio foram reunidas em uma única amostra obtendo-se o extrato da fermentação sólida (Figura 2A). A extração de cada meio de cultura e condição de cultivo sem o crescimento fúngico (testemunhas) foi realizada como controle, tanto para a fermentação líquida submersa como para a fermentação sólida da mesma forma como mencionado anteriormente (Figura 2A).



**Figura 1.** Fração líquida e da biomassa fúngica obtidas do crescimento de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1441 após 21 dias em fermentação líquida submersa (A) e biomassa fúngica obtida do crescimento de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1441 após 21 dias em fermentação sólida (Própria, 2022).







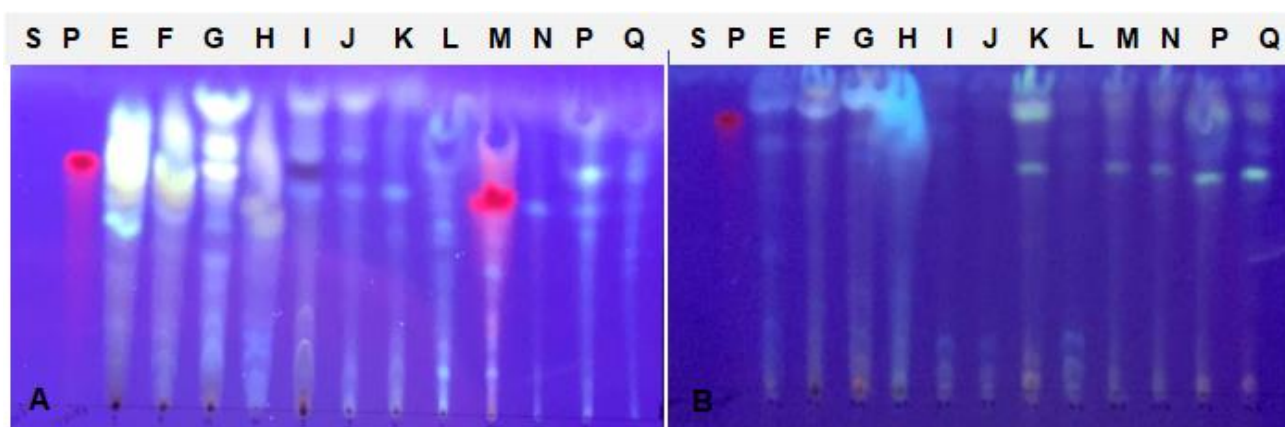
**Figura 2.** Exemplo dos extratos obtidos do crescimento de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1441 após 21 dias em fermentação sólida (A) e das respectivas das testemunhas (A) dos diferentes ensaios (Própria, 2022).

Cada extrato obtido foi submetido à análise de CCD (cromatografia em camada delgada). A análise foi realizada aplicando os extratos utilizando cromatofolhas de alumínio (Modelo DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>), submersas em uma combinação de clorofórmio, etanol e água. Como controle negativo utilizou-se o solvente acetato de etila e como controle positivo utilizou-se o padrão analítico de cercosporina (Cercosporin from *Cercospora hayii*- Sigma® C6696). O resultado da produção ou não de cercosporina foi visualizado através de exposição das cromatofolhas à uma lâmpada ultravioleta usando  $\lambda = 365$  nm de comprimento de onda, utilizando a Câmara de UV para visualização de fluorescência 264/395 nm.

A produção de cercosporina foi confirmada pela visualização de padrão coincidente ao padrão analítico de cercosporina comercial. Para cada amostra produtora de cercosporina, foram obtidas as massas (mg) e a leitura de absorbância a 480 nm, comprimento de onda de leitura do padrão cercosporina (JENNS *et al.*, 1989). As leituras das absorbâncias dos extratos foram realizadas em espectrofotômetro Tecan Magellan®.

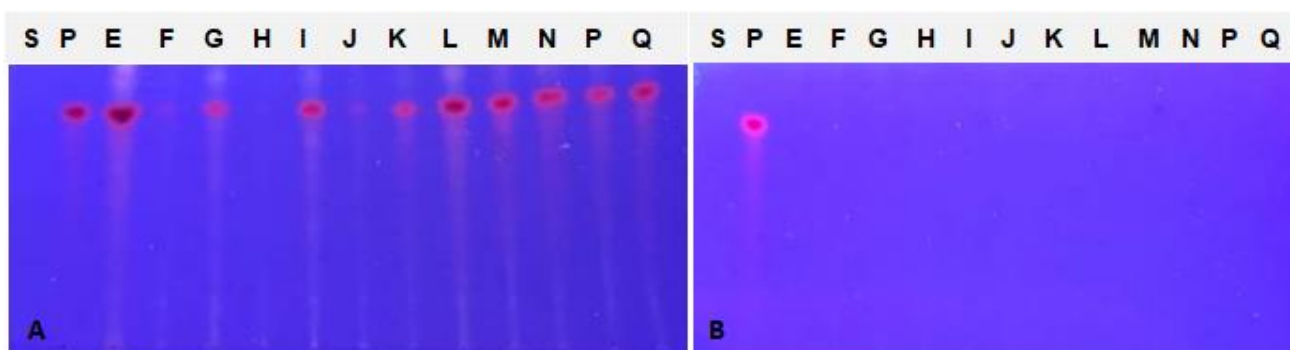
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de cercosporina a partir da extração de metabólitos produzidos por *Cercospora* aff. *canescens* cultivado em diferentes meios de cultura e utilizando as fermentações líquida submersa e fermentação sólida são apresentadas nas figuras 3 e 4. Os metabólitos obtidos a partir dos extratos de meio líquido (Figura 3A) e dos extratos de biomassa fúngica (Figura 3B) da fermentação líquida submersa de *Cercospora* aff. *canescens* não apresentaram uma separação nítida similar ao padrão analítico de cercosporina, e aparentemente indicaram a produção de diversos compostos não identificados.



**Figura 3.** Análise de cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos do meio líquido (A) e da biomassa fúngica (B) após 21 dias de fermentação líquida submersa de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 nos diferentes ensaios. Controle negativo- solvente (S) e controle positivo – padrão analítico de cercosporina (P).

O metabólito obtido a partir da extração de fermentação sólida de *Cercospora* aff. *canescens* apresentaram similaridade com o padrão analítico de cercosporina (Cercosporina de *Cercospora* hayii- Sigma- C6696-5 mg.) e, diferentemente da extração em fermentação líquida, não houve visualização de outras bandas nestes extratos. As bandas só não foram observadas para os ensaios F, H e J (Figura 4A). Os extratos obtidos das respectivas testemunhas da fermentação sólida não apresentaram produção de metabólitos secundários (Figura 4B).



**Figura 4.** Análise de cromatografia em camada delgada dos extratos obtidos da biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 após 21 dias de cultivo em fermentação sólida (A) e das testemunhas (B) nos diferentes ensaios. Controle negativo- solvente (S) e controle positivo – padrão analítico de cercosporina (P).

As leituras de absorvância foram realizadas apenas para os extratos obtidos da fermentação sólida, uma vez que foram aqueles que apresentaram produção de metabólito secundário similar ao padrão analítico de cercosporina (Tabela 2). O valor de absorvância do padrão analítico de





cercosporina foi de 0,309. Os ensaios E e L apresentaram os maiores valores de absorvância, 0,857 e 0,591, respectivamente, e acima do valor do padrão comercial. Estes ensaios também foram os que apresentaram bandas de maior intensidade na análise cromatográfica (Figura 4A). Os ensaios F, H e J, apresentaram os menores valores de absorvância, 0,032, 0,026 e 0,035, respectivamente, bem abaixo do valor do padrão comercial e valores similares aos das respectivas testemunhas. A absorvância dos extratos das testemunhas variou de 0,040 a 0,071 (Tabela 2).

As maiores massas de extratos foram obtidas no ensaio E (7,3 mg) seguido do ensaio L (5,5 mg) e G (5 mg). Para os demais ensaios com produção de metabólito secundário, as massas variaram de 2,7 a 3,2 mg (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores da massa dos extratos (mg) e das absorvâncias (480 nm) dos extratos obtidos da biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 após 21 dias de cultivo em fermentação sólida e de suas respectivas testemunhas.

Ensaio	Absorvância (480 nm) dos extratos da fermentação sólida	Absorvância (480 nm) das testemunhas	Massa dos extratos obtidos de fermentação sólida (mg)
E	0,857	0,052	7,3
F	0,032	0,071	2,8
G	0,143	0,060	5
H	0,026	0,056	2,3
I	0,306	0,044	2,5
J	0,035	0,047	2,5
K	0,135	0,040	2,7
L	0,591	0,040	5,5
M	0,485	0,042	2,7
N	0,342	0,043	2,9
P	0,248	0,044	3,1
Q	0,374	0,046	3,2

- Absorvância do padrão analítico de cercosporina: Abs (480nm)= 0,309

Neste trabalho demonstramos que o isolado de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 foi capaz de produzir *in vitro* metabólito secundário similar ao padrão comercial de cercosporina quando



utilizada a fermentação sólida. Além disso, a produção foi influenciada pela composição do meio de cultura. O meio Czapek-Dox foi selecionado e permitiu a variação da composição dos componentes, dextrose (fonte de carbono), nitrato de cálcio (fonte de nitrogênio), sulfato de magnésio e sulfato de potássio.

Pode-se observar que os únicos ensaios que não produziram metabólito secundário semelhantes a cercosporina foram os ensaios F, H e J, com uso das maiores dosagens de nitrato de cálcio (23,5 g), quando comparado com os demais ensaios que utilizaram apenas 1 g de nitrato de cálcio. Esta maior dosagem representa relações de C:N abaixo de 10:1 (DIAS *et al.*, 2021) demonstram que relação C:N influencia a produção de biomassa de *Cercospora aff. canescens* em fermentação líquida. Portanto, este parece ser um fator que influencia também a produção de metabólito secundário do fungo.

A luz não teve efeito na produção de metabólito secundário, uma vez que nas três condições de luz: escuro (ensaio N), fotoperíodo (ensaios K, M, P e Q), e luz contínua (ensaios E, G, I e L) foram observados o padrão do metabólito secundário similar ao padrão analítico de cercosporina. Entretanto, os resultados indicam que o uso de luz contínua permite a maior produção de metabólito secundário por *Cercospora aff. canescens*, uma vez que as condições de fermentação sólida dos ensaios E e L, aparentemente maiores produtores de metabólito secundário e de massa de extrato, foram a exposição à luz contínua. O efeito da luz na produção de cercosporina é amplamente conhecido na literatura. A cercosporina é uma fototoxina, portanto ativada pela luz, gerando oxigênio reativo, que leva ao rompimento da membrana plasmática do hospedeiro (SWIDERSKA-BUREK *et al.*, 2021).

Etapas posteriores do estudo envolvem a purificação do metabólito secundário e obtenção de curvas de absorvância em cromatografia líquida (HPLC) para comparação com a curva de absorvância do padrão analítico de cercosporina. A partir desta confirmação será possível otimizar as condições de cultivo do isolado em fermentação sólida para obtenção de uma composição que permita a maior produção de cercosporina. A combinação de metabólito secundário com o inóculo do fungo pode potencializar a ação de um mico-herbicida e permitir o desenvolvimento de uma tecnologia de base biológica para obtenção de um bioinsumo.



#### 4. CONCLUSÃO

A produção de metabólito secundário similar à cercosporina foi obtida com a fermentação sólida de *Cercospora* aff. *canescens* por 21 dias quando se utilizou o meio Czapek-Dox modificado com valores fixos de 1 g de nitrato de cálcio, e variações de dextrose (22,5, 45 e 4,5 g), de sulfato de magnésio e fosfato de potássio (1, 2,5 e 0,25 g). Os resultados subsidiarão ensaios de otimização da produção de metabólito secundário de *Cercospora* aff. *canescens* que podem ser utilizados no controle biológico de cordas-de-viola.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, à Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura e apoio logístico, e à Embrapa pelo apoio financeiro (10.19.02.002.00.00). Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 303396/2018-0).

#### 6. REFERÊNCIAS

- BHULLAR, M. S. *et al.* Control of morningglories (*Ipomoea* spp.) in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Weed Technology**, v. 26, p.77-82, 2012.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitized toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v.72, n.4, p. 369-371, 1982.
- DHINGRA, O. B.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.
- DIAS, G. M. de L. *et al.* Definição de parâmetros para a produção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2021, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto de Zootecnia, 2021. Evento online. CIIC 2021. RE21406. 10 p.
- GUNASINGUE, N. *et al.* Cercosporin from *Pseudocercospora capsellae* and its critical role in white leaf spot development. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1521-1532, 2016.
- JENNS, A. E.; DAUB, M.E.; UPCHURCH, R.G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, n.2, p. 213-219, 1989.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 339p.



MONQUERO, P.A. *et al.* Monitoramento do banco de sementes de plantas daninhas em áreas com cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, v. 29, n.1, p. 107-119, 2011.

NECHET, K. L. *et al.* **Weeds**. In: SOUZA, B.; VÁZQUEZ, L.; MARUCCI, R. (ed). Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: biological control and functional biodiversity. Cham: Springer, 2019. cap. 35. p. 437-449.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Development of *Cercospora* leaf spot on *Ipomoea* weed species for biological control. **BioControl**, v. 64, p.185-195, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-018-09918-w>.

PIZZO, I. V. *et al.* Seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

SILVA, P. V.; MONQUERO, P. A. Influência da palha no controle químico de plantas daninhas no sistema de cana crua. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.1, p.94-103, 2013.

ŚWIDERSKA-BUREK, U. *et al.* Phytopathogenic Cercosporoid fungi-from taxonomy to modern biochemistry and molecular biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.22:8555, 2021. DOI: 10.3390/ijms21228555.