

# ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS COM SUBSTRATO ISOTOPICAMENTE MARCADO ( $^{13}\text{C}$ -MFA) EM *S. typhimurium*

D. M. CORREIA<sup>1</sup>, C. R. SARGO<sup>1</sup>, R. C. GIORDANO<sup>1</sup>, I. ROCHA<sup>2</sup>, A. J. SILVA<sup>1</sup> e T. C. ZANGIROLAMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica  
E-mail para contato: teresadequfscar@yahoo.com.br

**RESUMO** – *Linhagens atenuadas de Salmonella têm sido estudadas para produção e veiculação de substâncias com fins terapêuticos. Modelos metabólicos em escala genômica são ferramentas importantes no desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica. Este trabalho teve por objetivo obter dados experimentais para aprimorar o modelo metabólico e aprofundar o conhecimento do metabolismo de S. typhimurium. Foram realizados cultivos contínuos em diferentes taxas de diluição (0,24 h<sup>-1</sup> e 0,48 h<sup>-1</sup>), utilizando U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glicose como substrato. Após hidrólise da biomassa, os aminoácidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A análise de fluxos metabólicos, usando o software livre OpenFLUX, permitiu determinar a distribuição de fluxos nas principais vias metabólicas de S. typhimurium. Verificou-se que a glicólise foi a via majoritariamente utilizada para catabolizar a glicose, em ambas as taxas de diluição estudadas. As maiores diferenças nos fluxos estimados, para as duas taxas de diluição, verificaram-se nas reações anapleróticas. Sobrepondo os dados de fluxos intracelulares determinados ao modelo metabólico existente será gerado um modelo mais preciso do metabolismo de S. typhimurium.*

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de produtos biotecnológicos usando linhagens atenuadas de *Salmonella* tem sido intensivamente estudada nas últimas décadas. Entre os produtos de interesse que podem ser produzidos por *Salmonella* encontram-se a flagelina, polissacarídeo capsular Vi, lipopolissacarídeos e vacinas, com destaque para a sua utilização como vetor bacteriano vivo, com aplicações na medicina humana e veterinária (Braga *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2013; Kothari *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2011).

A viabilização de processos produtivos de produtos biotecnológicos que utilizam células vivas de *S. typhimurium*, ou suas partes, requer o cultivo deste microrganismo em altas densidades celulares. Estudos anteriores, desenvolvidos por Sargo *et al.* (2015), mostraram que o crescimento celular de *S. typhimurium* é limitado pela formação de ácidos orgânicos (tais como o acetato), observada em conjunto com o crescimento celular de *S. typhimurium*, mesmo a baixas taxas específicas de crescimento.

A engenharia metabólica tem sido muito utilizada no melhoramento genético de diversos organismos de forma direcionada e eficiente. Através da seleção racional de genes alvo para manipulação das vias metabólicas, permite, por exemplo, melhorar a produção de um produto de interesse ou minimizar a produção de metabólitos indesejados, entre outras aplicações (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Neste contexto, modelos metabólicos em escala genômica são ferramentas muito importantes, uma vez que permitem prever fenótipos em diferentes condições, permitindo desenvolver estratégias de engenharia metabólica. Para isso, é necessário que as previsões obtidas com estes modelos tenham uma elevada precisão, a qual só pode ser obtida pelo conhecimento e compreensão do metabolismo do organismo em estudo.

Para *S. typhimurium* LT2 encontram-se publicados quatro modelos metabólicos em escala genômica (Abuon *et al.*, 2009; Raghunathan *et al.*, 2009; Thiele *et al.*, 2011; Hartman *et al.*, 2014), apresentando, de uma forma geral, um grau de validação bastante reduzido, devido à falta de dados experimentais de *Salmonella typhimurium* LT2 obtidos em condições controladas e reprodutíveis. Estudos anteriores mostraram que o modelo metabólico STM\_v.1.0, publicado para *S. typhimurium* LT2 (Thiele *et al.*, 2011), não é capaz de prever de forma adequada a produção de subprodutos, ao mesmo tempo que superestima a produção de biomassa (Sargo *et al.*, 2015).

Assim, o conhecimento aprofundado do metabolismo, o qual para *S. typhimurium* ainda é restrito, torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica e de cultivo que permitam atingir elevadas densidades celulares em cultivos de curta duração.

A análise de fluxos metabólicos (MFA) apresenta-se como uma das ferramentas mais eficientes na análise das rotas metabólicas, fornecendo informações essenciais sobre o sistema biológico em estudo. A análise de fluxos metabólicos com carbono 13 (<sup>13</sup>C-MFA) tem sido largamente aplicada para caracterizar fenótipos pela quantificação *in vivo* dos fluxos de carbono. Os experimentos são realizados utilizando um substrato isotopicamente marcado, após atingir o estado estacionário da marcação, podem ser analisados os metabólitos livres ou os aminoácidos proteínogênicos, permitindo inferir acerca do fluxo de carbono e das rotas metabólicas ativas (Wittmann, 2007).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento do metabolismo de *S. typhimurium* LT2 e obter dados experimentais que possam ser usados para melhorar as previsões feitas com o modelo metabólico existente, foram realizados cultivos contínuos usando substrato isotopicamente marcado (U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glicose), seguido de uma análise de fluxos metabólicos (<sup>13</sup>C-MFA).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Cultivos contínuos

*Salmonella typhimurium* LT2 (*Salmonella* Genetic Stock Centre – University of Calgary, Canadá) foi cultivada em reator contínuo em condições controladas. Todo o

procedimento foi efetuado de acordo com o descrito em Sargo *et al.* (2015), para o crescimento aeróbio com glicose como fonte de carbono.

A estratégia de cultivo contínuo utilizada passou pelo cultivo contínuo com glicose não marcada ( $^{12}\text{C}_6$ -glicose) até o estado estacionário ser atingido e este ser mantido por dois tempos de residência. Em seguida, a alimentação foi substituída por 20% de  $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -glicose (99%) e 80% de  $^{12}\text{C}_6$ -glicose, por um tempo de residência. Foram efetuados cultivos às taxas de diluição (D) de  $0,24\text{ h}^{-1}$  e  $0,48\text{ h}^{-1}$ . Foi analisada a composição dos gases de exaustão ( $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ ).

## 2.2. Métodos analíticos e preparação de amostras

Durante os cultivos foram recolhidas amostras para determinação da concentração de células (pelo método da massa seca), glicose e metabólitos extracelulares (por CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência).

Após a alimentação com substrato marcado, foram recolhidas alíquotas de caldo de cultivo (em triplicata). Após centrifugação e descarte do sobrenadante, a proteína presente na biomassa foi hidrolisada com HCl (6 M), com ácido tioglicólico (1%, v/v), sob atmosfera inerte. A hidrólise ocorreu durante 24 horas a  $105\text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram neutralizadas com NaOH (10 M). Após liofilização, as amostras foram submetidas a uma derivatização química com metil-cloroformato (MCF) (Smart *et al.*, 2010). As amostras derivatizadas foram injetadas no GC-MS (Varian 4000 GC/MS), composto por um cromatógrafo gasoso, acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo Ion Trap e operando com ionização por impacto eletrônico (EI) de 70 eV, utilizando o método descrito por Smart *et al.* (2010).

## 2.3. Tratamento de dados

Os aminoácidos presentes nas proteínas constituintes das biomassas hidrolisadas de *S. typhimurium* para as taxas de diluição  $0,24\text{ h}^{-1}$  e  $0,48\text{ h}^{-1}$  foram identificados a partir de uma biblioteca de padrões derivatizados com MCF, considerando os tempos de retenção e respectivos espectros de massa de cada aminoácido. Para identificação dos aminoácidos, além do software do equipamento GC-MS (Varian), também foi usado o software livre AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) (DAVIES, 1998). Foram registadas as marcações e intensidades obtidas para os principais íons detetados em cada aminoácido na análise de espectrometria de massa.

## 2.4. Estimação de fluxos metabólicos

Usando os dados de intensidade dos principais íons presentes nos aminoácidos, foram calculados os vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para os principais íons de cada aminoácido (tal como descrito por NANCHEN *et al.*, 2007). Os MDVs foram corrigidos tendo em consideração o número de elementos que possuem abundância natural de isótopos ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ) presentes nos fragmentos analisados, utilizando o software livre Isocor (MILLARD *et al.*, 2012). Foi desconsiderada a contribuição da biomassa não

marcada com  $^{13}\text{C}$ . Foi ainda calculada a marcação fracionária para todos os fragmentos de aminoácidos detetados (NANCHEN *et al.*, 2007).

Para a análise dos fluxos metabólicos foi utilizado o software livre OpenFLUX (QUEK *et al.*, 2009). Para o cálculo da distribuição dos fluxos foram gerados arquivos com os seguintes dados:

- Reações envolvidas no metabolismo e respectivas transições de átomos de carbono, consistindo num total 59 reações;
- Fluxos de substrato fornecido – fluxo de  $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ -glicose ( $\text{mmol.g de massa seca.h}^{-1}$ ); Aminoácidos medidos e sua distribuição isotopomérica de massa calculada para os aminoácidos analisados por GC-MS e erros associados;
- Composição da biomassa e velocidade de crescimento – os dados de composição de biomassa foram recolhidos da literatura (HARTMAN *et al.*, 2014).
- Fluxos de produção de metabólitos extracelulares, normalizados em função do fluxo de glicose consumida.

Para encontrar a melhor distribuição de fluxos metabólicos foram efetuados 50 ciclos de otimização, usando o programa OpenFLUX.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O metabolismo de *S. typhimurium* LT2 foi estudado em cultivo contínuo com as taxas de diluição de  $0,24 \text{ h}^{-1}$  e  $0,48 \text{ h}^{-1}$ , com 20% de  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glicose. Foram calculados os fluxos de produção de acetato,  $\text{CO}_2$  e consumo de glicose para as taxas de diluição em estudo (Figura 1).

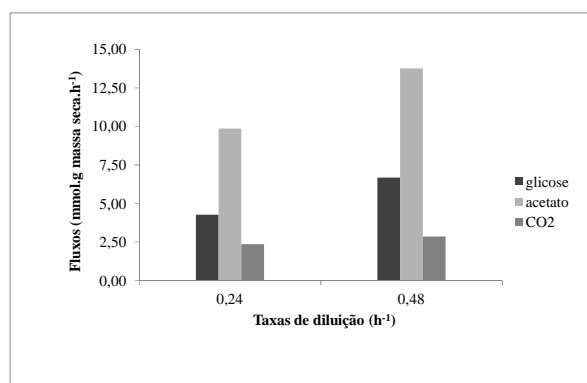


Figura 1- Fluxos obtidos nos cultivos em contínuo de *S. typhimurium* nas diferentes taxas de diluição.

Os aminoácidos constituintes da proteína da biomassa foram analisados, após derivatização com MCF, por GC-MS. No total foram detectados 15 aminoácidos (glicina, alanina, aspartato, fenilalanina, glutamato, isoleucina, histidina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina e valina). Não foi possível detectar cisteína e triptofano em

nenhuma amostra, devido a estes aminoácidos serem oxidados durante a hidrólise ácida das proteínas. Os aminoácidos asparagina e glutamina são convertidos a aspartato e glutamato durante a hidrólise, sendo por isso analisados em conjunto com o aspartato e glutamato, respectivamente. O aminoácido arginina não é derivatizado usando o MCF, não sendo por isso detectado.

De forma a determinar a contribuição da marcação de  $^{13}\text{C}$  em cada fragmento de aminoácido analisado, foi estimada a marcação fracionária. Como a percentagem de glicose marcada com carbono 13 durante o cultivo foi de 20%, era esperado que os fragmentos de aminoácidos tivessem uma marcação fracionária de 20%. Assim, nos casos em que a marcação fracionária obtida não se encontrava próximo de 20%, esse fragmento de aminoácido foi desconsiderado para a análise de fluxos metabólicos. Seguindo esta metodologia não foram usados os dados dos seguintes aminoácidos: aspartato, glicina, histidina e metionina. Estas diferenças na marcação fracionária podem ser atribuídas a erros experimentais de análise.

Os dados de distribuição isotopomérica de massa, para cada fragmento de aminoácido, foram corrigidos para a abundância natural de isótopos, tal como descrito na metodologia. A contribuição da biomassa não marcada também foi desconsiderada, tendo em conta que apenas 63% da biomassa se encontra teoricamente marcada quando se efetua a alimentação com substrato isotopicamente marcado durante apenas um tempo de residência (Nanchen, 2007).

Foram determinadas as distribuições de fluxos para as taxas de diluição em estudo usando o software livre OpenFLUX (Quek *et al.*, 2009). Para tal, foi utilizado um modelo estequiométrico simplificado de *Salmonella typhimurium*, incluindo as reações presentes na glicólise, pentose fosfato, Entner-Doudoroff, ciclo do ácido cítrico e reações anapleróticas. A Figura 2 apresenta as distribuições de fluxos obtidas para as taxas de diluição  $0,24\text{ h}^{-1}$  e  $0,48\text{ h}^{-1}$ . Os fluxos foram expressos em base molar e normalizados em função de  $100\text{ mmol}$  de fluxo de glicose. Os resultados obtidos mostraram diferenças entre as diferentes taxas de diluição estudadas. A análise dos dados indica que após a entrada da glicose na célula, esta é direcionada, predominantemente, para a glicólise, em ambas as taxas de diluição, desviando, no entanto, um fluxo significativo para a via da pentose fosfato. A reação de piruvato a acetil-CoA apresentou um maior fluxo na taxa de diluição de  $0,24\text{ h}^{-1}$ , quando comparada à taxa de diluição de  $0,48\text{ h}^{-1}$ , associada ao maior fluxo de produção de acetato, observado experimentalmente. As maiores diferenças nos fluxos estimados, para as duas taxas de diluição estudadas, ocorreram ao nível do fluxo nas reações anapleróticas, as quais são responsáveis por repor intermediários no ciclo do ácido cítrico. Verificou-se que a via do glioxilato apresentou-se ativa em *S. typhimurium* na taxa de diluição mais baixa estudada ( $0,24\text{ h}^{-1}$ ), enquanto na taxa de diluição mais elevada ( $0,48\text{ h}^{-1}$ ), foi utilizada a reação anaplerótica de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato, apresentando um fluxo semelhante ao observado na via do glioxilato para a taxa de diluição de  $0,24\text{ h}^{-1}$ . No ciclo do ácido cítrico foi observado um fluxo semelhante para duas taxas de diluição.

Os valores calculados experimentalmente e estimados de MIDs (distribuição de isotopômeros de massa), apresentaram, de uma forma geral, um desvio relativo percentual de aproximadamente 18% para a taxa de diluição de  $0,24\text{ h}^{-1}$  e 21% para a taxa de diluição de

$0,48 \text{ h}^{-1}$ , mostrando a concordância entre os dados experimentais calculados e os simulados.

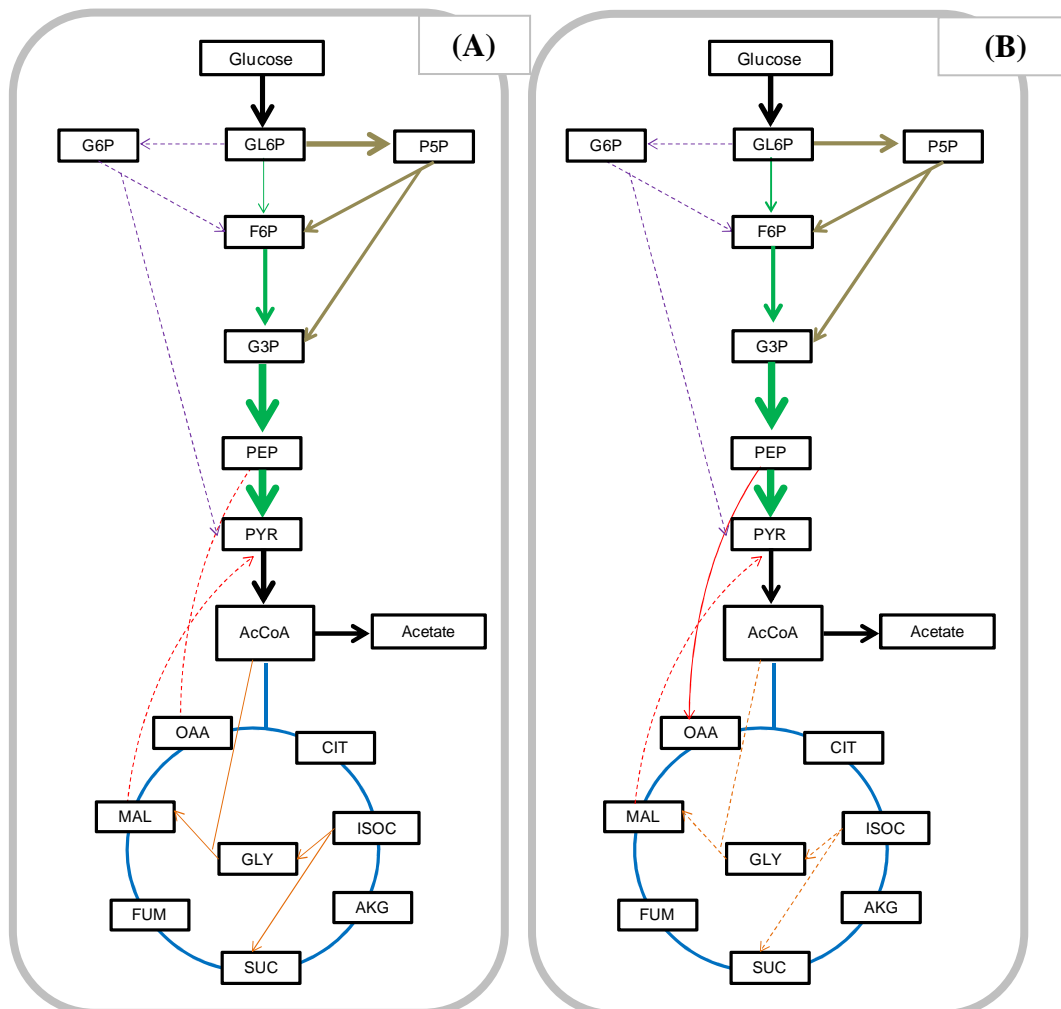


Figura 2 – Distribuição de fluxos metabólicos internos estimados para *S. typhimurium* LT2. (A)  $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$ ; (B)  $D = 0,48 \text{ h}^{-1}$ . A espessura das setas é proporcional aos fluxos estimados (-----  $< 5$ ; ———  $> 25$ ; ———  $> 125$ ). As rotas metabólicas encontram-se representadas em diferentes cores: verde – glicólise; marrom – pentose fosfato; roxo – Entner-Doudoroff; azul – ciclo do ácido cítrico; laranja – ciclo do glioxilato; vermelho – reações anapleróticas. Metabólitos: AcCoA – acetil-CoA; AKG – alfa-cetoglutarato; CIT – citrato; F6P – frutose-6-fosfato; FUM – fumarato; G3P – gliceraldeído-3-fosfato; G6P – 6-fosfo-D-gluconato; GL6P – glicose-6-fosfato; GLY – glioxilato; ISOC – isocitrato; MAL – malato; OAA – oxaloacetato; P5P – pentose fosfato; PEP – fosfoenolpiruvato; PYR – piruvato; SUC – succinato.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi empregada a análise de fluxos metabólicos com carbono marcado ( $^{13}\text{C}$ -MFA) para estimar os fluxos das principais reações das vias do carbono central de *S. typhimurium*. Os dados obtidos permitiram comparar a distribuição de fluxos metabólicos intracelulares entre as taxas de diluição estudadas ( $0,24\text{h}^{-1}$  e  $0,48 \text{ h}^{-1}$ ), tendo-se verificado que as principais diferenças nos fluxos ocorreram a nível das reações anapleróticas. A integração



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

dos dados de fluxos estimados com o modelo metabólico à escala genômica irá permitir obter um modelo metabólico que descreva de forma mais adequada o metabolismo de *S. typhimurium*. A obtenção de um modelo metabólico em escala genômica mais preciso e realista irá possibilitar a sua utilização no delineamento *in silico* das modificações genéticas mais promissoras, de forma a direcionar o metabolismo da *Salmonella* para a produção de produtos de interesse.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABUON, M.; SUTHERS, P. F.; JONES, G. I.; CARTER, B. R.; SAUNDERS, M. P.; MARANAS, C. D.; WOODWARD, M. J.; ANJUM, M. F. Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model: comparison of similarity and differences with a comensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.*, v. 284, n. 43, p. 29480-29488, 2009.
- BRAGA, C. J.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; ALENCAR, B. C.; BARGIERI, D. Y.; BOSCARDIN, S. B.; RODRIGUES, M. M.; FERREIRA, L. C. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine*, v. 28, n. 5, p. 1373-1382, 2010;
- DAVIES, A. N. The new Automated Mass Spectrometry Deconvolution and Identification System (AMDIS). *Spectrosc. Eur.*, v. 10, p. 24-27, 1998.
- HARTMAN, H. B.; FELL, D. A.; ROSSELL, S.; JENSEN, P. R.; WOODWARD, M. J.; THORND AHL, L.; JELSB AK, L.; OLSEN, J. E.; RAGHUNATHAN, A.; DAEFLER, S.; POOLMAN, M. G. Identification of potential drug targets in *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* using metabolic modelling and experimental validation. *Microbiology*, v. 160, p. 1252-1266, 2014.
- KONG, W.; CLARK-CURTISS, J.; CURTISS III, R. Utilizing *Salmonella* for antigen delivery: the aims and benefits of bacterial delivery vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, v. 12, n. 4, p. 345-347, 2013.
- KOTHARI, S. KIM, J. A.; KOTHARI, N.; JONES, C.; CHOE, W. S.; CARBIS, R. Purification of O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide produced by *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A. *Vaccine*, v. 32, n. 21, p. 2457-2462, 2014.
- MILLARD, P.; LETISSE, F.; SOKOL, S.; PORTAIS, J. C. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics*, v. 28, n. 9, p. 1294-1296, 2012.
- NANCHEN, A.; FUHRER, T; SAUER, U. *Determination of metabolic flux ratios from <sup>13</sup>C experiments and gas chromatography – mass spectrometry data*. Methods in Molecular Biology, vol. 358: Metabolomics: Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc., 2007.
- OLIVEIRA, B. H.; SILVA, M. R.; BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; FERREIRA, L. C. S.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TAKAGI, M. Production of native flagellin from



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

- Salmonella typhimurium* in a bioreactor and purification by tangential ultrafiltration. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 28, n. 4, p. 575-584, 2011.
- QUEK, L. E.; WITTMANN, C.; NIELSEN, L. K.; KROMER, J. O. OpenFLUX: efficient modelling software for <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.*, v. 8, n. 25, 2009.
- RAGHUNATHAN, A.; REED, J.; SHIN, S.; PALSSON, B.; DAEFLER, S. Constraint-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction. *BMC Syst. Biol.*, v. 3, n. 38, 2009.
- ROCHA, I.; FERREIRA, E. C. On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant *E. coli*. *Anal. Chim. Acta*, v. 462, n. 2, p. 293-304, 2002.
- SARGO, C. R.; CAMPANI, G.; SILVA, G. G.; GIORDANO, R. C.; DA SILVA, A. J.; ZANGIROLAMI, T. C.; CORREIA, D. M.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* dissimilarity: Closely related bacteria with distinct metabolic profiles. *Biotechnol. Prog.*, v. 31, n. 5, p. 1217-1225, 2015.
- SMART, K. F.; AGGIO, R. B. M.; HOUTTE, J. R. V.; VILLAS-BÔAS, S. G. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Nat. Protoc.*, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, 2010.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. *Metabolic Engineering Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998.
- THIELE, I.; HYDUKE, D. R.; STEEB, B.; FANKAM, G.; ALLEN, D. K.; BAZZANI, S.; CHARUSANTI, P.; CHEN, F. C.; FLEMING, R. M. T.; HSIUNG, C. A.; DE KEERSMAECKERA, S. C. J.; LIAO, Y. C.; MARCHAL, K.; MO, M. L.; OZDEMIR, E.; RAGHUNATHAN, A.; REED, J. L.; SHIN, S. I.; SIGURBJORNSDÓTTIR, S.; STEINMANN, J.; SUDARSAN, S.; SWAINSTON, N.; THIJS, I. M.; ZENGLER, K.; PALSSON, B. O.; ADKINS, J. N.; BUMANN, D. community effort towards a knowledge-base and mathematical model of the human pathogen *Salmonella typhimurium* LT2. *BMC Syst. Biol.*, v. 5, n. 8, 2011.
- WITTMANN, C. Fluxome analysis using GC-MS. *Microb. Cell Fact.* v. 6, p. 1–17, 2007.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Eugénio Ferreira do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga, Portugal). Apoio financeiro recebido do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), do projeto de cooperação internacional CAPES-FCT (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil— Fundação para a Ciência e a Tecnologia/Portugal—Processo 315/11), CAPES (Atração de Jovens Talentos—Processo 064922/2014-01).

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

