

Teorias e Métodos da **BIOFÍSICA**

Sabrina Passoni Maravieski
(Organizadora)

 **Atena**
Editora
Ano 2019

Sabrina Passoni Maravieski
(Organizadora)

Teorias e Métodos da Biofísica

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

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

T314 Teorias e métodos da biofísica [recurso eletrônico] / Organizadora
Sabrina Passoni Maravieski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora,
2019.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-189-3

DOI 10.22533/at.ed.893191403

1. Biofísica. I. Maravieski, Sabrina Passoni.

CDD 571.4

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra “Teorias e Métodos da Biofísica” faz parte de uma série de livros publicados pela Atena Editora, e neste volume único, em seus 12 capítulos, apresenta uma diversidade de estudos realizados nas diversas áreas da biofísica, bem como relação com outras áreas que esta exige nos dias atuais.

A biofísica é uma ciência interdisciplinar na qual se emprega as teorias, os métodos ou técnicas específicas da física para resolver questões biológicas. Atualmente, com o avanço tecnológico a biofísica está presente na maioria das ciências da saúde, tais como: Medicina, Fonoaudiologia, Odontologia, Enfermagem, Terapia Ocupacional, Fisioterapia, Bioengenharia e Biomedicina. Na área de Ecologia, temos também a biofísica Ambiental. Algumas especializações em biofísica podem ser ainda multidisciplinares, como por exemplo: a Bioinformática, a Biologia Estrutural, Toxicologia Ambiental e Biologia de Sistemas.

Dessa forma, o leitor poderá encontrar nesta obra, uma variedade pesquisas cujas áreas que envolvem a biofísica estão interligadas nas quais muitos pesquisadores buscam por soluções emergentes. A interdisciplinaridade entre estas diversas áreas aqui citadas é um processo natural e inevitável, pois a formação dos profissionais das ciências da saúde ou biológicas, seja qual for a sua formação, necessita da relação entre diversas áreas do conhecimento.

Hoje o profissional se destaca pela capacidade de saber inovar e alcançar resultados positivos em suas pesquisas com base nas diversas ciências, utilizando uma ou mais tecnologias. Isso se faz possível se este profissional tiver conhecimento das demais áreas, pois não basta ser bom em uma única ciência, é preciso ser multi-intelectual.

Nesta obra, portanto, o leitor poderá encontrar parcerias estabelecidas entre diversas áreas do conhecimento de diversos departamentos de pesquisa: Engenharia Elétrica e de Computação, Semicondutores, Biocalorimetria, Bioquímica Médica, Nanotecnologia e Nanomedicina, Bioquímica e Biofísica, Farmácia, Química do Estado Sólido, Ciências Médica, Clínica Médica (Nefrologia), Radioterapia, Histologia e Embriologia, Biofísica e Radiobiologia, Morfologia e Fisiologia Animal, Nanociências e Materiais Avançados.

Logo, este volume é dedicado à interdisciplinaridade nas diversas áreas das Ciências da Saúde e Biológica, pois o mercado atual exige uma revolução tecnológica e cabe a aos pesquisadores, dessas diversas áreas, buscar conhecer as demandas atuais para promover essas inovações de forma interdisciplinar, e não isoladamente. Neste sentido, esta obra foi dividida em 6 áreas temáticas da Biofísica: Bioeletricidade, Bioestatística, Biomecânica, Biofísica Ambiental, Biomedicina, e Radiobiologia.

Na área de Bioeletricidade, composta apenas de um capítulo (capítulo1), apresentamos uma pesquisa realizada entre os cursos de Engenharias de Computação e Elétrica e o curso de Ciências Médicas, em que envolve os Departamentos de Química de Estado Sólido, Semicondutores, Instrumentos e Fotônica e o de Clínica Médica

(Nefrologia). Trata-se da investigação do nível de fósforo no sangue, em que, quando este apresenta-se acima do normal está associado a casos de óbitos de pacientes renais crônicos. Para isto os autores propõem o desenvolvimento de um transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) que possa ser utilizado para quantificar a massa de fósforo no dialisato total final extraída durante o processo de hemodiálise.

Na área de Bioestatística, apresentamos dois capítulos. No capítulo 2, a pesquisa foi desenvolvida pelos Departamentos de Morfologia e Fisiologia em conjunto com o Departamento de Biofísica e Radiobiologia de uma Faculdade Rural. Na pesquisa foi utilizando o método da complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), o qual permite calcular a complexidade de uma série temporal sem a necessidade de longos segmentos de dados. Este método, estatístico é baseado em dinâmica não linear e costumam ser são amplamente empregado na análise e descrição adequada de processos nas áreas de química, física e biologia. Neste, o método foi desenvolvido com o objetivo de determinar a complexidade de sequências finitas na análise do particionamento do polietilenoglicol no nanoporo unitário de alfa-hemolisina inserido em uma bicamada lipídica plana. O objetivo foi investigar o processo de chegada e permanência da molécula polimérica (analito) no nanoporo (biossensor). No capítulo 3, os pesquisadores avaliaram diferentes espectrômetros utilizados em análises clínicas e laboratórios de pesquisa os quais permitem determinar as concentrações de espécimes químicas diversas. Por considerarem a aplicabilidade destes dispositivos importante no quesito qualidade dos resultados fornecidos, os autores apresentam técnicas de estatística e os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros.

O capítulo 4, inserido na área temática de Biomecânica, trata-se de uma pesquisa onde a Oftalmologia e a Estética Funcional, estão intimamente ligadas aos fenômenos de transferência de massa estudados na Física. Neste, os autores mostraram como a falha da transferência de massa intraocular, por convecção forçada, pode afeta o movimento oculomotor e provoca diversas enfermidades, tais como: erro de refração, ceratocone, glaucoma de ângulo aberto ou fechado. Sugerindo por fim, a necessidade do SUS incluir, em seus procedimentos, a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, assim como a ANS regulamentar esta cirurgia em todos os planos de saúde.

Na área temática de Biofísica Ambiental, pesquisadores do Laboratório de Nanociências e Materiais Avançados realizaram estudos por meio da técnica de espectroscopia UV-visível com o intuito de promover uma formação interdisciplinar entre alunos de Pós-Graduação. Nesse sentido, os autores desenvolveram estratégias experimentais que permitem aos estudantes dominarem o uso da técnica de espectroscopia UV-visível para análises qualitativas e quantitativas com uso de um corante altamente conhecido e de larga aplicação como é o azul de metileno (capítulo 5). No capítulo 6, pesquisadores realizaram um levantamento do número de veículos na cidade de Recife para verificação da poluição atmosférica. Para eles, a poluição

atmosférica é comprovadamente um agente causador e de piora do quadro de diversas doenças, entre elas doenças respiratórias, câncer de pulmão, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. No capítulo 7, pesquisadores do Departamento de Biofísica e Radiobiologia utilizaram o ensaio cometa em hemócitos do moluscos de água doce *Biomphalaria glabrata*, é um biodicador natural utilizados para a detecção de possíveis danos no DNA após a exposição ao MMS e para avaliar a potencial aplicação para monitoramento da genotoxicidade do ambiente de água doce.

Na área temática de Biomedicina, o leitor poderá aprofundar seus estudos em três capítulos. No capítulo 8, os autores do Departamento de Histologia e Embriologia, analisaram e avaliaram a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico do *Allium sativum* L. frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Na área de Bioquímica Médica no Laboratório de Biocalorimetria (capítulo 9), pesquisadores realizaram estudos de uma importante enzima a L-asparaginase, a qual é amplamente utilizada no tratamento da leucemia. Tendo em vista a importância de seu uso, surgiu a necessidade de buscar alternativas para reduzir seus efeitos adversos e aumentar sua estabilidade. Assim a pesquisa resultou na obtenção de nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com ZnCl₂. A alta concentração de quitosana, segundo os autores, permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. Já no capítulo 10, os autores analisaram e caracterizaram nanopartículas de quitosana-tripolifosfato (QT-TPP) associadas ao fármaco sumatriptano (SMT) como uma alternativa na terapia de enxaqueca via uso tópico.

A última área temática é a Radiobiologia, composta de dois capítulos promissores para as pesquisas atuais. Essa área vem crescendo em interdisciplinaridade, principalmente devido o crescimento das pesquisas em Medicina Nuclear, em Engenharia Biomédica e das técnicas de obtenção de imagem, as quais sofrem constantes avanços tecnológicos. Com isso, no capítulo 11, os autores investigaram a ação radioprotetora do extrato bruto da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata* e os resultados obtidos mostraram que o extrato da casca de A. colubrina apresentou uma discreta atividade radioprotetora. E por fim, no capítulo 12, com o intuito de fornecer mais dados sobre os efeitos da radiação ionizante no sistema nervoso central, os pesquisadores avaliaram a atividade elétrica cerebral de ratos expostos à radiação ionizante através do exame de eletrocorticograma (ECoG) e pode-se observar alterações nas ondas cerebrais através do uso de dois métodos matemáticos: a Transformada de Fourier (TF) Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) concluindo que a exposição a essa radiação causa alterações eletrofisiológicas, que incluem diminuição da complexidade e modificações nas ondas cerebrais.

Aos autores dos diversos capítulos, pela dedicação e esforços sem limites, que viabilizaram esta obra que retrata os recentes avanços científicos e tecnológicos nas Ciências da Saúde e Biofísica, os agradecimentos dos Organizadores e da Atena Editora.

Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes, professores e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias promovendo a interdisciplinaridade nas diferentes áreas das Ciências da Saúde e Biofísica.

Sabrina Passoni Maravieski

SUMÁRIO

ÁREA TEMÁTICA BIOELETRICIDADE

CAPÍTULO 1 1

DESENVOLVIMENTO DE TRANSISTOR DE EFEITO DE CAMPO SENSÍVEL A ÍONS (ISFET) PARA QUANTIFICAÇÃO DA MASSA DE FÓSFORO REMOVIDO DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS NAS SESSÕES DE HEMODIÁLISE

Sergio Henrique Fernandes

Leandro Tiago Manera

Helder José Ceragioli

Rodrigo Bueno de Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.8931914031

ÁREA TEMÁTICA BIOESTATÍSTICA

CAPÍTULO 2 17

COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV NA ANÁLISE DO TRANSPORTE DO POLIETILENOGLICOL ATRAVÉS DO NANOPORO DE ALFA-HEMOLISINA

Gesilda Florenço das Neves

Dijanah Cota Machado

Carlos Manuel Machado Carneiro

Luiz Hamiel Almeida Consoni

Cláudio Gabriel Rodrigues

Romildo Albuquerque Nogueira

DOI 10.22533/at.ed.8931914032

CAPÍTULO 3 25

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS:ANÁLISE DA DISPERSÃO DAS MEDIDAS

Cleonilde Maria do Nascimento

Carla Luiza Barros Bernardes Borja

Bruno Edberg Alves de Lira

Jabson Herber Profiro de Oliveira

Dijanah Cota Machado

Milton Marcelino Filho

DOI 10.22533/at.ed.8931914033

ÁREA TEMÁTICA BIOMECÂNICA

CAPÍTULO 4 36

MOVIMENTO OCULOMOTOR E ALGUMAS PATOLOGIAS

Humberto Dória Silva

Eduardo Dória Silva

Maria Tamires Dória Silva

Cristiana Pereira Dória

Cristiane Pereira Dória

DOI 10.22533/at.ed.8931914034

CAPÍTULO 5 43

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE ESTADOS AGREGADOS DE CORANTES

Adrienne Marlise Mendes Brito

Hebert Freitas dos Santos

Iseli Lourenço Nantes-Cardoso

DOI 10.22533/at.ed.8931914035

CAPÍTULO 6 60

POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE RECIFE

Cleonilde Maria do Nascimento

Nicolas Nunes Ferreira

Helotônio Carvalho

Sheilla Andrade de Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.8931914036

CAPÍTULO 7 66

UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECTAR EFEITO GENOTÓXICO DO METANOSULFONATO DE METILA EM CÉLULAS DE *Biomphalaria glabrata*

Dewson Rocha Pereira

Maíra de Vasconcelos Lima

Willams Nascimento de Siqueira

Gabrielly Christynne Nascimento Sales

Hianna Arely Milca Fagundes Silva

José Luiz Ferreira Sá

Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

DOI 10.22533/at.ed.8931914037

ÁREA TEMÁTICA BIOMEDICINA

CAPÍTULO 8 73

AValiação DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DO *Allium sativum* L

Gleyka Daisa de Melo Santos

Erwelly Barros de Oliveira

Paloma Lys de Medeiros

Eliete Cavalcanti da Silva

João Soares Brito da Luz

DOI 10.22533/at.ed.8931914038

CAPÍTULO 9 82

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE ALTO PESO MOLECULAR - TRIPOLIFOSFATO PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNA

Caroline Dutra Lacerda

Patrícia Severino

Maria Lucia Bianconi

DOI 10.22533/at.ed.8931914039

CAPÍTULO 10 94

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS

Aryane Alves Vigato

Renato Grillo

Leonardo Fernandes Fraceto

Daniele Ribeiro de Araújo

DOI 10.22533/at.ed.89319140310

ÁREA TEMÁTICA RADIOBIOLOGIA

CAPÍTULO 11 109

AÇÃO RADIOPROTETORA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE *Anadenanthera colubrina* SOBRE OS EMBRIÕES DE *Biomphalaria glabrata*

José Luís Ferreira Sá

Williams Nascimento Siqueira

Hianna Arely Milca Fagundes Silva.

Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra

Dewson Rocha Pereira

Larissa Silva de Azevedo Melo

Maíra de Vasconcelos Lima

Luiz Alberto Lira Soares

Márcia Vanusa Silva

Maria Tereza Santos Correia

Ana Maria Mendonça Albuquerque Melo

DOI 10.22533/at.ed.89319140311

CAPÍTULO 12 117

MÉTODOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE

Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti

Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar

Alexandre Parisio Barbosa de Oliveira

Jonas Sérgio de Oliveira Filho

Romildo de Albuquerque Nogueira

DOI 10.22533/at.ed.89319140312

SOBRE A ORGANIZADORA..... 126

UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECTAR EFEITO GENOTÓXICO DO METANOSULFONATO DE METILA EM CÉLULAS DE *Biomphalaria glabrata*

Dewson Rocha Pereira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

Maíra de Vasconcelos Lima

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

Willams Nascimento de Siqueira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

Gabrielly Christynne Nascimento Sales

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

Hianna Arely Milca Fagundes Silva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

José Luiz Ferreira Sá

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,
Recife, Pernambuco - PE.

de água doce *Biomphalaria glabrata*, para a detecção de possíveis danos no DNA após a exposição ao MMS e para avaliar a potencial aplicação para monitoramento da genotoxicidade do ambiente de água doce. O *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) é um bioindicador ambiental utilizado, de forma eficaz e sensível, para identificação de agentes genotóxicos, enquanto que o metanosulfonato de metila (MMS) é reconhecido como agente genotóxico utilizado no ensaio cometa como controle positivo em células de mamíferos, mas nunca foi testado em *B. glabrata*. Neste estudo moluscos *B. glabrata* foram expostos ao MMS (0,3 mM) e avaliados por meio do ensaio cometa. Foi observado efeito genotóxico do MMS sobre *B. glabrata*, onde 90 % dos nucleóides do grupo tratado apresentaram dano ao DNA, verificado pela migração de DNA cromossomal e consequente formação de cauda. O ensaio cometa com *B. glabrata* pode, assim, proporcionar o estudo da ação de agentes químicos sobre o meio aquático de forma sensível e preventiva e o MMS pode ser utilizado como controle positivo dos experimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Ensaio cometa, *Biomphalaria glabrata*, MMS

RESUMO: O objetivo deste estudo foi usar o ensaio cometa em hemócitos do moluscos

ABSTRACT: The aim of the study was to use the comet assay on haemocytes of freshwater

snail *Biomphalaria glabrata*, for detection of possible DNA damage after exposure to MMS and to evaluate the potential application for genotoxicity monitoring of freshwater environment. *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) is an environmental bioindicator used in an effective and sensitive way to identify genotoxic agents, whereas methyl methanesulfonate (MMS) is recognized as a genotoxic agent used in the comet assay as a positive control in mammals, but has never been tested on snails. In this study *B. glabrata* mollusks were exposed to MMS (0.3 mM) and evaluated by the comet assay. A genotoxic effect of MMS was observed on *B. glabrata*, where 90% of nucleotides from the treated group showed damage to the DNA, verified by chromosomal DNA migration and consequent tail formation. This study confirmed that the comet assay applied on *Biomphalaria glabrata* haemocytes may be a useful tool in determining the potential genotoxicity of water pollutants and MMS can be used as a positive control of the experiment. **KEYWORDS:** Comet assay, *Biomphalaria glabrata*, MMS.

1 | INTRODUÇÃO

Devido as diversas atividades humanas, milhares de substâncias nocivas são liberadas diariamente no meio ambiente podendo causar impactos danosos aos organismos vivos (AMORIM et al., 2003). Dentre os diferentes ecossistemas, o meio aquático é um dos principais locais para descartes de resíduos industriais, esgotos domésticos e outros. Estas substâncias podem acarretar prejuízos para a sobrevivência das espécies e conseqüentemente um impacto ambiental que deve ser avaliado (CAJARAVILLE et al., 2000).

As conseqüências da ação das substâncias poluidoras podem ser percebidas por meio de alterações fisiológicas, comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução ou até mesmo a morte de toda a comunidade, impactando diretamente a estrutura do ecossistema (RESH, DAVID & VH, 1993; CLEMENTS, 2000). As malformações causadas por alterações da molécula de DNA, podem ser um risco também para a saúde humana, por ser repassada por meio da cadeia alimentar (JHA, 1998). Estas alterações podem estar relacionada com o surgimento de doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, entre outras (ERDTMANN, 2003).

Para o monitoramento e identificação do grau de dano sofrido nos seres vivos de um ecossistema impactado, se faz necessário a utilização de técnicas que avaliem os parâmetros físico-químicos relacionados com os danos surgidos nos organismos expostos a estes agentes teratogênicos. O Ensaio Cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) vem sendo utilizado em diversas áreas de conhecimento, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO & TICE, 2003; VERÇOSA et al., 2017; FOWLER et al., 2017). É uma técnica desenvolvida para detectar quebras no DNA de forma preventiva (pré-mutagênese) (KAMMANN

et al., 2001; DE LAPUENTE et al., 2015). As células, avaliadas por esta técnica, que possuem elevado grau de dano no DNA apresentam uma forma semelhante a de um cometa, pois ocorre aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo (SPEIT & HARTMANN, 1999; SIDDIQUI, KHANVILKAR & VINEETA, 2017).

O molusco *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*), considerado um bioindicador ambiental (CLAXTON, HOUK & HOUGHES, 1998; DE FREITAS TALLARICO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2018) foi utilizado recentemente para avaliar alterações ao DNA através do ensaio cometa (GRAZEFFE et al., 2008). A hemolinfa deste animal contém hemócitos (células de defesa) que irão estar em contato direto com os contaminantes. Portanto, este tecido é apropriado para o teste do cometa (VILLELA et al., 2006). Neste estudo, moluscos *B. glabrata* foram expostos à substância genotóxica metanosulfonato de metila (MMS), com a finalidade de observar dano à molécula de DNA, por meio do ensaio cometa, estabelecendo um controle positivo para futuro experimentos envolvendo moluscos e agentes químicos na área da biofísica ambiental.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados moluscos adultos da espécie *B. glabrata* pigmentados, apresentando 10-14 mm de diâmetro de concha, oriundos do Moluscário do Laboratório de Radiobiologia localizado no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os animais foram mantidos em recipientes de polietileno com capacidade para 20 L de água filtrada e dechlorada (pH 7,0 e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$) e alimentados diariamente com alfaces (*Lactuca sativa*) frescos e livres de agrotóxicos.

2.2 Exposição ao metanosulfonato de metila (MMS)

Para realização dos experimentos foram formados dois grupos com cinco espécimes cada. Os moluscos do grupo um foi exposto ao MMS (0,3 mM) da Acros organics por 24 horas. Enquanto que os espécimes do grupo dois (controle) foram exposto a água filtrada e dechlorada. Após o período de exposição os moluscos foram submetidos ao ensaio cometa.

2.3 Ensaio cometa

O ensaio alcalino do Cometa foi realizado como descrito por Singh e col. (1988), com algumas adaptações. Para cada animal duas lâminas de microscópio foram cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-aldrich) dissolvida em PBS (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}). Foi coletado 100 μL de hemolinfa de cada animal, através de estímulo sucessivo da região podal, que culmina na liberação de hemolinfa pelo

animal. Este volume de hemolinfa foi homogeneizado em 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão, e colocado sobre a lâmina coberta com a agarose de ponto de fusão normal. Após solidificação a 4°C (5-10 min), as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10 %, pH 10,0) por 12 h a 4°C. Após lise, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese horizontal (10 cm x 28 cm) e imersas em tampão alcalino, pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM) por 20 min e submetidas a eletroforese (0,74 V/cm, 150 mA) por 20 min a 4°C. As lâminas foram então neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 por 15 min, fixadas com álcool absoluto por 10 min e coradas com SYBR safe (Invitrogen). Foram analisadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. A análise visual dos danos nos hemócitos foi realizada de acordo com Jaloszynski e col. (1997), que consistiu na classificação dos cometas em categorias (0 a 3). Cada uma dessas categorias representa, de forma crescente, a extensão do dano ao DNA. Por exemplo, na categoria 0 os cometas não apresentam cauda, na categoria 3 os cometas apresentam cabeça pequena e cauda longa contendo a maior parte do conteúdo de DNA (dano máximo).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito genotóxico do MMS foi avaliado sobre hemócitos de *B. glabrata* por meio do Ensaio Cometa. No ensaio foi observada a presença de cauda e diminuição da cabeça dos nucleóides do grupo exposto ao MMS em comparação ao grupo controle (Figura 1). A análise visual dos cometas demonstrou que 90% dos nucleóides do grupo exposto ao MMS (0,3 mM) apresentaram dano ao DNA entre as categorias 2 e 3, indicando migração do DNA cromossomal danificado comparado ao grupo controle. Portanto, a concentração de 0,3 mM de MMS foi capaz de induzir dano ao material genético do *B. glabrata*.

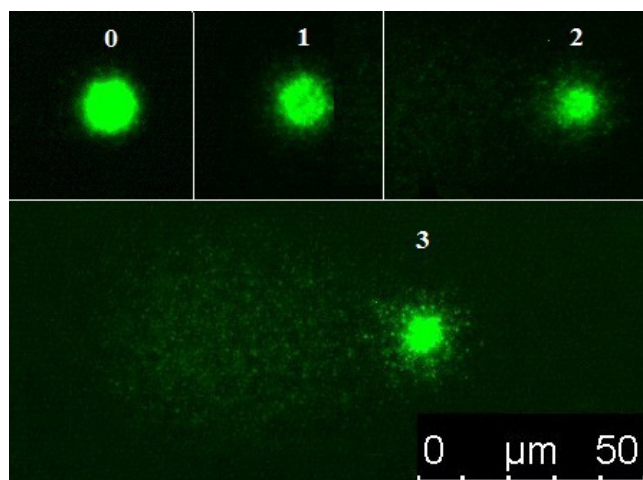


Figura 1. Imagens de cometas, a partir de hemócitos expostos ao MMS de *Biomphalaria glabrata*, corados com SYBR safe. Categoria zero (0) representa a ausência de dano genético, e as categoria de 1-3 indicam dano ao DNA de forma crescente. (Fonte: Autor).

Estudos recentes utilizaram o MMS em ensaio cometa com diferentes sistemas biológicos, desde células de mamíferos (COLLIN, DUŠINSKÁ & HORSKÁ, 2001), peixes (LEMOS et al., 2005) e moluscos (*Corbicula flumínea*) (RIGONATO, MANTOVANI & JORDÃO, 2005). Este agente genotóxico demonstrou eficácia na indução de danos ao DNA avaliados por meio do ensaio cometa em *B. glabrata*. O MMS é um agente alquilante que atua sobre os centros nucleofílicos do DNA formando monoaddutos (tipo de ligação química), por meio de uma reação de substituição (JENKINS et al., 2005). Diferentes resposta celulares são ocasionadas pela formação de monoaddutos, como: parada na replicação, inibição da transcrição, parada no ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (WANG & LIPPARD, 2005).

4 | CONCLUSÕES

A utilização do Ensaio Cometa com *B. glabrata* possibilita a obtenção de informações a nível molecular, o que permite estudar a ação de agentes químicos de forma sensível e preventiva. O MMS, nas condições descritas neste trabalho pode ser utilizado como controle positivo nos experimentos de genotoxicidade com hemócitos de *B. glabrata* expostos a agentes químicos. Reforçando a utilização destes animais como bioindicadores de ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 6, p. 158-170. 2003.
- ARAÚJO, H. D. A.; SILVA, L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S.; SILVA, N. H., MELO, A. M., MARTINS, M. C. B. & LIMA, V. L.. **Toxicity of Usnic Acid from Cladonia substellata (Lichen) to embryos and adults of Biomphalaria glabrata.** Acta tropica, v. 179, p. 39-43, 2018.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S. & SPEIT, G. **The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing.** Mutagenesis, v. 20, n. 4, p 245-254. 2005.
- BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P; HONMAH, M; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMAJ, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD V; UNO, Y.; VASQUEZ, M. & HARTMANN, A. **Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup.** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 627, n. 1, p. 31-35. 2007.
- CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENCO, A. **The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.** Science of the Total Environment, v. 247, n. 2, p. 295-311, 2000.
- CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S. & HUGHES, T. J. **Genotoxicity of industrial wastes and effluents,** Mutation Research, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.
- CLEMENTS, W. H. **Integrating effects of contaminants across levels of biological organization.** Journal Ecosystem Stress and Research, v. 7, n. 2, p. 113-116, 2000.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M. & DUTHIE, S. J. **The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells.** Mutation Research/DNA Repair, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A. R.; DUŠINSKÁ, M. & HORSKÁ, A. **Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay.** Acta Biochimica Polonica, V. 48, N. 3, p. 611-614 2001.

DE FREITAS TALLARICO, L.; BORRELY, S. I., HAMADA, N., GRAZEFFE, V. S., OHLWEILER, F. P., OKAZAKI, K., Granatelli, A. T. Pereira, I. W.; Pereira, C. A. DE B. & Nakano, E. **Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 110, p. 208-215, 2014.

DE LAPUENTE, J; LOURENÇO, J., MENDO, S. A., BORRÀS, M., MARTINS, M. G., COSTA, P. M. & PACHECO, M. **The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives.** Frontiers in genetics, v. 6, p. 180, 2015.

ERDTMANN, B. **A genotoxicidade nossa de todos os dias.** In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: **Ed. Alcance**, p. 21-48 2003.

FOWLER, T. L; FISHER, M. M., BAILEY, A. M., BEDNARZ, B. P., & KIMPLE, R. J.. **Biological characterization of a novel in vitro cell irradiator.** PloS one, v. 12, n. 12, p. e0189494, 2017.

GONTIJO, A. M. M. C. & TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas.** Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

GRAZEFFE, V. S.; DE FREITAS TALLARICO, L.; DE SA PINHEIRO, A.; KAWANO, T.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. de B. & NAKANO, E. **Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 654, n. 1, p. 58-63, 2008.

JĄŁOSZYŃSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-ŚWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J. & SZYFTER, K. **Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay.** Mutation Research/ DNA Repair, v. 385, n. 3, p. 223-233, 1997.

JENKINS, G. J. S.; DOAK, S. H.; JOHNSON, G. E.; QUICK, E.; WATERS, E. M. & PARRY, J. M. **Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?** Mutagenesis, v. 20, n. 6, p. 389-398, 2005.

JHA, A.N. **Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies.** Mutation Research, v. 399, n. 1, p. 1-2, 1998.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. **A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay.** Mutation Research, Amsterdam. v. 498, p. 61-77, 2001.

LEMOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T. & MANTOVANI, M. S. **Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 19, n. 2, p. 197-201, 2005.

RESH, V. H. & ROSENBERG, D. M. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.** New York :. Chapman & Hall,. ix, 488 1993.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. **Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity.** Genetics and Molecular Biology, v. 28, n. 3, p. 464-468, 2005.

SABATIER, L.; LEBEAU, J.; DUTRILLAUX, B. **Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability.** Radiation and Environmental Biophysics, v. 34, n.4, p.293-232, 1995.

SIDDIQUI, S; KHANVILKAR, V. V. & JAGDALE, D. **In-vitro methods of screening of anti-cancer agent.** World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, V 6, Issue 9. 2017.

SILVA, H. A. M. F.; SIQUEIRA, W. N., SÁ, J. L. F., SILVA, L. R. S., MARTINS, M. C. B., AIRES, A. L., AMÂNCIO, F. F.; Pereira, E. C.; ALBUQUERQUE, M. C. P.; MELO, A. M. M. A. & SILVA, N. H. **Data set of the toxic effects of divaricatic acid depside on Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni cercariae.** Data in Brief, 2018.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L., **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells,** Experimental cell research. v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SPEIT, G. & HARTMANN, A. **The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, v. 113, p. 203-212, 1999.

TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J. C. & SASAKI, Y. F. **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** Environmental and molecular mutagenesis, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VERÇOSA, C. J.; DE MORAES FILHO, A. V., DE ARAÚJO CASTRO, Í. F., DOS SANTOS, R. G., CUNHA, K. S.; SILVA, D. D. M.; GARCIA, A. C. L.; NAVONI, J. A.; DO AMARAL, V. S. & ROHDE, C. **Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of Drosophila melanogaster exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 141, p. 148-153, 2017.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. **DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants;** Mutation Research, v. 605, p. 78–86, 2006.

WANG, D. & LIPPARD, S. J. **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** Nature reviews Drug discovery, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

SOBRE A ORGANIZADORA

Sabrina Passoni Maravieski - Possui graduação em Licenciatura em Física e Mestrado em Ciências/ Física, ambos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atualmente é doutoranda na área de Ensino de Ciências nas Engenharias e Tecnologias pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. É também professora adjunta do Centro de Ensino Superior de Campos Gerais na cidade de Ponta Grossa. Ministra as disciplinas de: Mecânica dos Fluidos, Fenômenos de Transporte, Mecânica Aplicada, Eletricidade e Magnetismo, Física Atômica e Nuclear, Física da Ressonância Magnética Nuclear, Física das Radiações Ionizantes e Não Ionizantes e Física e Instrumentação Aplicada a Engenharia Biomédica; nos cursos de Engenharia Elétrica, Engenharia Civil, Tecnologia em Radiologia, Pós -Graduação em Segurança do Trabalho e Imagenologia. Já atuou como professora de Ensino Médio em escolas pública e particular ministrando aulas de Física e Robótica.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-189-3

