



Cleberton Correia Santos
(Organizador)

Estudos Interdisciplinares nas Ciências e da Terra e Engenharias 4

Cleberton Correia Santos
(Organizador)

Estudos Interdisciplinares nas Ciências
Exatas e da Terra e Engenharias 4

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

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

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

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
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
E82	<p>Estudos interdisciplinares nas ciências exatas e da terra e engenharias 4 [recurso eletrônico / Organizador Cleberton Correia Santos. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias; v. 4)</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-622-5 DOI 10.22533/at.ed.225191109</p> <p>1. Ciências exatas e da Terra. 2. Engenharias. 3. Tecnologia. I.Santos, Cleberton Correia. II. Série.</p> <p style="text-align: right;">CDD 016.5</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O livro “Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias” de publicação da Atena Editora apresenta em seu 4º volume 37 capítulos com temáticas voltadas à Educação, Agronomia, Arquitetura, Matemática, Geografia, Ciências, Física, Química, Sistemas de Informação e Engenharias.

No âmbito geral, diversas áreas de atuação no mercado necessitam ser elucidadas e articuladas de modo a ampliar sua aplicabilidade aos setores econômicos e sociais por meio de inovações tecnológicas. Neste volume encontram-se estudos com temáticas variadas, dentre elas: estratégias regionais de inovação, aprendizagem significativa, caracterização fitoquímica de plantas medicinais, gestão de riscos, acessibilidade, análises sensoriais e termodinâmicas, redes neurais e computacionais, entre outras, visando agregar informações e conhecimentos para a sociedade.

Os agradecimentos do Organizador e da Atena Editora aos estimados autores que empenharam-se em desenvolver os trabalhos de qualidade e consistência, visando potencializar o progresso da ciência, tecnologia e informação a fim de estabelecer estratégias e técnicas para as dificuldades dos diversos cenários mundiais.

Espera-se com esse livro incentivar alunos de redes do ensino básico, graduação e pós-graduação, bem como outros pesquisadores de instituições de ensino, pesquisa e extensão ao desenvolvimento estudos de casos e inovações científicas, contribuindo na aprendizagem significativa e desenvolvimento socioeconômico rumo à sustentabilidade e avanços tecnológicos.

Cleberton Correia Santos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
GEOPROCESSAMENTO APLICADO AO MAPEAMENTO DAS ÁREAS DE RISCOS DE INUNDAÇÃO PARA O MUNICÍPIO DE PONTE NOVA – MG	
Anderson Nascimento Milagres Gian Fonseca dos Santos Danilo Segall César Yann Freire Marques Costa Klinger Senra Rezende Alixandre Sanquetta Laporti Luppi Adonai Gomes Fineza	
DOI 10.22533/at.ed.2251911091	
CAPÍTULO 2	8
MUTAGÊNESE DA LEVEDURA <i>Candida viswanathii</i> PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS	
Luiz Renato Lima Silva Miranda Nayra Morgana Lima De Oliveira Erika Carolina Vieira Almeida Adriana Augusta Neto Alex Fernando De Almeida	
DOI 10.22533/at.ed.2251911092	
CAPÍTULO 3	19
A RELAÇÃO ENTRE PROGRAMAS DE DESENVOLVIMENTO DE LIDERANÇA E O CAPITAL SOCIAL NAS ORGANIZAÇÕES	
Bruno Henriques Watté Márcio Vieira de Souza	
DOI 10.22533/at.ed.2251911093	
CAPÍTULO 4	34
BRUNIMENTO FLEXÍVEL DE CILINDROS DE BLOCOS DE COMPRESSORES HERMÉTICOS: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GRANULOMETRIA E DO NÚMERO DE GOLPES DA FERRAMENTA NO PARÂMETRO DE RUGOSIDADE R_p	
Guilherme Henrique Caetano Barros Rosenda Valdés Arencibia Luciano José Arantes	
DOI 10.22533/at.ed.2251911094	
CAPÍTULO 5	41
ANÁLISE DA ACELERAÇÃO POR EXTRAPOLAÇÃO DA FONTE DE FISSÃO CONSIDERANDO A TEORIA DE DIFUSÃO DE NEUTRONS EM REATORES NUCLEARES	
Andrey Silva Pontes Henrique Matheus Ferreira da Silva Lenilson Moreira Araújo	
DOI 10.22533/at.ed.2251911095	

CAPÍTULO 6	51
ANÁLISE DE DESEMPENHO E AVALIAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE REDES DE SENSORES SEM FIO EM <i>SMART GRIDS</i>	
Álison De Oliveira Alves Felipe Denis Mendonça De Oliveira	
DOI 10.22533/at.ed.2251911096	
CAPÍTULO 7	64
SÍNTESE DE COMPOSTOS HÍBRIDOS PERILIL-DIHIDROPIRIMIDINONAS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE HUISGEN COM FORMAÇÃO DE ANÉIS 1,2,3-TRIAZÓLICOS	
Vinícius Vendrusculo Dennis Russowsky	
DOI 10.22533/at.ed.2251911097	
CAPÍTULO 8	74
ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICAS DA CASTANHOLA	
Jonas Soares de Mesquita Davi Pereira Araújo Maria Carolina Martins da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.2251911098	
CAPÍTULO 9	81
USO DE CATALISADORES DE NÍQUEL PARA A RESOLUÇÃO CINÉTICA DINÂMICA DE AMINAS PRIMÁRIAS	
Fernanda Amaral de Siqueira Natália Cavallaro Martins de Sousa Sania Maria de Lima	
DOI 10.22533/at.ed.2251911099	
CAPÍTULO 10	92
AVALIANDO EM MATEMÁTICA: UM ESTUDO DE CASO NO CENTRO-OESTE MINEIRO	
Patrícia Milagre de Freitas Leandro Teles Antunes dos Santos	
DOI 10.22533/at.ed.22519110910	
CAPÍTULO 11	102
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA NO TRABALHO EM TRABALHADORES DA CONSTRUÇÃO CIVIL	
Andre Luis Martins De Souza Renata Evangelista Alexandre Bueno Ronaldo Marques Serigne Ababacar Felipe Rogério Hudson Luis	
DOI 10.22533/at.ed.22519110911	

CAPÍTULO 12 111

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE UM SOLO RESIDUAL DE GNAISSE MADURO ESTABILIZADO COM LAMA DE CAL

Danilo Segall César
Yann Freire Marques Costa
Anderson Nascimento Milagres
Gian Fonseca dos Santos
Eduardo Souza Candido
Klinger Senra Rezende
Adonai Gomes Fineza

DOI 10.22533/at.ed.22519110912

CAPÍTULO 13 122

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE RESÍDUOS ELETRÔNICOS: ESTUDO DE CASO COM PILHAS ALCALINAS

Pedro Luiz Dias Barroso
Julia Santos Caetano
Jean Pierre Sayago
Joeci Ricardo Godoi
Rodrigo Souza Banegas
Letícia Flohr

DOI 10.22533/at.ed.22519110913

CAPÍTULO 14 132

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES DE PAADDA/PSS E PDDA/PSS PREPARADOS POR LAYER-BY-LAYER

Samanta Costa Machado Silva
Jorge Amim Júnior
Ana Lucia Shiguihara

DOI 10.22533/at.ed.22519110914

CAPÍTULO 15 144

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Simaba ferruginea*

Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira
Lucivania Rodrigues dos Santos
Adonias Almeida Carvalho
Renato Pinto de Sousa
Gerardo Magela Vieira Júnior
Ruth Raquel Soares de Farias
Mariana Helena Chaves

DOI 10.22533/at.ed.22519110915

CAPÍTULO 16 157

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS ALCALINAMENTE ATIVADOS PARA MITIGAÇÃO DA REAÇÃO ÁLCALI-AGREGADO: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS, FÍSICAS E QUÍMICAS

Jocélio Jairo Vieira Filho
Kelly Cristiane Gomes
Williamns Tadeu de Oliveira Lins Belo

DOI 10.22533/at.ed.22519110916

CAPÍTULO 17 183

ESTRUTURA AXIOMÁTICA DO ORIGAMI: UMA ABORDAGEM DOS POLIEDROS REGULARES NA FORMAÇÃO DE PROFESSORES DE MATEMÁTICA

Anita Lima Pimenta
Eliane Scheid Gazire

DOI 10.22533/at.ed.22519110917

CAPÍTULO 18 193

ESTUDO DO EFEITO DOS PARÂMETROS DE PROJETO DE BICOS EXTRUSORES EM BIOIMPRESSÃO UTILIZANDO FLUIDODINÂMICA COMPUTACIONAL

Patrícia Muniz de Oliveira
Isabela Poley
Estevam Barbosa Las Casas
Marina Spyer Las Casas
Janaina Dernowsek

DOI 10.22533/at.ed.22519110918

CAPÍTULO 19 205

IMPACTO DA RESOLUÇÃO HORIZONTAL NA SIMULAÇÃO DOS JATOS DE BAIXOS NÍVEIS NA AMÉRICA DO SUL USANDO O MODELO GLOBAL DO CPTEC

Dayana Castilho de Souza
Paulo Yoshio Kubota
Silvio Nilo Figueroa
Enver Manuel Amador Ramirez Gutierrez
Caio Augusto dos Santos Coelho

DOI 10.22533/at.ed.22519110919

CAPÍTULO 20 218

LESSON STUDY: UMA ADAPTAÇÃO PARA O BRASIL

Renata Camacho Bezerra
Maria Raquel Miotto Morelatti

DOI 10.22533/at.ed.22519110920

CAPÍTULO 21 226

MICROSCOPIA DE DESFOCALIZAÇÃO COMO UMA FERRAMENTA DE ESTUDO DE PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE ERITRÓCITOS

Paula M. S. Roma
Luiza C. Mourão
Marcelo P. Bemquerer
Erika M. Braga
Ubirajara Agero

DOI 10.22533/at.ed.22519110921

CAPÍTULO 22 232

PENSAMENTO ALGÉBRICO E SUA APLICAÇÃO EM EQUAÇÕES LINEARES

Fábio Mendes Ramos
Fabricia Gracielle Santos
Daniel Martins Nunes

DOI 10.22533/at.ed.22519110922

CAPÍTULO 23	243
ENSINO DE QUÍMICA VERSUS TICs: RETRATO DE PUBLICAÇÕES BRASILEIRAS	
Eleonora Celli Carioca Arenare	
DOI 10.22533/at.ed.22519110923	
CAPÍTULO 24	253
PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE BLENDS DE PHB/PC	
Francielle Schmitz	
Carolina de Andrade	
Ivonete Oliveira Barcellos	
DOI 10.22533/at.ed.22519110924	
CAPÍTULO 25	267
RESINAS DE POLIÉSTER INSATURADO E SUA APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE EMBARCAÇÕES EM FIBERGLASS	
Patricia Reis Pinto	
Sérgio da Silva Feitosa	
Alaíde de Sá Barreto	
DOI 10.22533/at.ed.22519110925	
CAPÍTULO 26	277
APLICAÇÃO DO MÉTODO DA PENALIZAÇÃO ROBUSTA PARA ANÁLISE DE PROBLEMAS DE OTIMIZAÇÃO MULTI-OBJETIVO	
Gustavo Barbosa Libotte	
Fran Sérgio Lobato	
Francisco Duarte Moura Neto	
Gustavo Mendes Platt	
DOI 10.22533/at.ed.22519110926	
CAPÍTULO 27	289
SÍNTESE DE FASE SÓLIDA HÍBRIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA PARA EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM AMOSTRAS ÁGUA SUPERFICIAL	
Fabiana Casarin	
Camila Santos Dourado	
Ana Cristi Basile Dias	
DOI 10.22533/at.ed.22519110927	
CAPÍTULO 28	302
SOLUÇÃO ANALÍTICA DE PROBLEMA BIDIMENSIONAL DE CONDUÇÃO DE CALOR UTILIZANDO FUNÇÕES DE GREEN	
José Aguiar dos Santos Junior	
José Ricardo Ferreira Oliveira	
Eduardo Peixoto de Oliveira	
Guilherme Ramalho Costa	
Jefferson Gomes Do Nascimento	
Alisson Augusto Azevedo Figueiredo	
Gilmar Guimarães	
DOI 10.22533/at.ed.22519110928	

CAPÍTULO 29 310

TAXAS DE FREQUÊNCIA E GRAVIDADE DOS ACIDENTES OCORRIDOS EM UM GRUPO DE PROPRIEDADES CAFEEIRAS CERTIFICADAS

Rafael Augusto Silva Souza
Geraldo Gomes de Oliveira Júnior
Armando Mendes Nogueira
Raphael Nogueira Rezende
Agda Silva Prado Oliveira
Adriano Bortolotti da Silva
Patrícia Ribeiro do Valle Coutinho

DOI 10.22533/at.ed.22519110929

CAPÍTULO 30 315

UM SISTEMA COLABORATIVO DE INCENTIVO A DOAÇÃO DE SANGUE

Alúcio José Pereira
Fábio Abrantes Diniz
Elder Gonçalves Pereira
Francisco Paulo de Freitas Neto
Elissandra Cheu Pereira do Nascimento

DOI 10.22533/at.ed.22519110930

CAPÍTULO 31 329

UMA PROPOSTA DIDÁTICA PARA O ENSINO DE NÚMEROS DECIMAIS NO 5º ANO DO ENSINO FUNDAMENTAL

Cristiana Monique Feltes Sivert
Cassiano Scott Puhl

DOI 10.22533/at.ed.22519110931

CAPÍTULO 32 339

ESTUDO DA VIABILIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA COMPUTACIONAL DE BAIXO CUSTO PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA EM CULTIVOS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS: APLICAÇÃO INICIAL EM VIVEIROS ESCAVADOS

Wilmar Borges Leal Junior
Fabiano Medeiros Tavares
Ítalo Cordeiro Silva Lima
Delfim Dias Bonfim
Lucyano Campos Martins
Nailson Martins Dantas Landim
Haryson Huan Arruda da Silva Santos
Douglas Ferreira Chaves

DOI 10.22533/at.ed.22519110932

CAPÍTULO 33 349

REGRESSÃO POLINOMIAL E REDES NEURAS ARTIFICIAIS NA AVALIAÇÃO DE IMÓVEIS

Carlos Augusto Zilli
Luiz Fernando Palin Droubi
Norberto Hochheim

DOI 10.22533/at.ed.22519110933

CAPÍTULO 34 363

ANALISE DE RECALQUES NO CONTORNO RODOVIÁRIO DA GRANDE FLORIANÓPOLIS

Wagner de Sousa Santos
Amanda Morlos

DOI 10.22533/at.ed.22519110934

CAPÍTULO 35	376
SIMULAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UM TÚNEL EM MACIÇO ROCHOSO	
Yann Freire Marques Costa	
Danilo Segall César	
Gian Fonseca dos Santos	
Anderson Nascimento Milagres	
Klinger Senra Rezende	
Adonai Gomes Fineza	
DOI 10.22533/at.ed.22519110935	
SOBRE O ORGANIZADOR.....	387
ÍNDICE REMISSIVO	388

MICROSCOPIA DE DESFOCALIZAÇÃO COMO UMA FERRAMENTA DE ESTUDO DE PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE ERITRÓCITOS

Paula M. S. Roma

Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais

Luiza C. Mourão

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Marcelo P. Bemquerer

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
paulamagda@ufmg.br

Erika M. Braga

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Ubirajara Agero

Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO: A microscopia de desfocalização (MD) é uma ferramenta de microscopia óptica que tem sido empregada com sucesso para a avaliação de parâmetros morfológicos, químicos e mecânicos de objetos transparentes como os eritrócitos. Nesse sentido, já foi demonstrado, por meio dessa técnica, que proteínas de citoesqueleto de eritrócitos como a actina, as espectrinas e a proteína transmembranar banda 3 (um transportador do tipo antiporte de cloreto e bicarbonato) são possíveis alvos de tais anticorpos. Resultados de MD evidenciaram

que a adição de IgG anti-banda 3 e também de anticorpos presentes em plasmas de pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax* promoveram uma diminuição significativa da amplitude média de flutuações, em nanoescala, em altura (*urms*) de membranas de eritrócitos. A redução de amplitude foi mais pronunciada em indivíduos anêmicos com malária quando comparados a pacientes não anêmicos. Deste modo, a microscopia de desfocalização é uma ferramenta diagnóstica de alterações morfológicas e mecânicas de eritrócitos, que pode ser empregada em investigação de efeitos de nanoestruturas sobre eritrócitos, podendo contribuir para a avaliação de segurança de nanoprodutos.

PALAVRAS-CHAVE: Microscopia de desfocalização; Flutuações nanométricas de membrana; Eritrócitos; Malária; Nanotoxicidade.

DEFOCUSING MICROSCOPY AS A TOOL TO INVESTIGATE THE MORPHOLOGY AND MEMBRANE FLUCTUATIONS OF RED-BLOOD CELLS

ABSTRACT: Defocusing microscopy (DM) is an optical microscopy tool that furnish morphological and mechanical parameters of transparent objects (pure phase objects) like the red-blood cell. Proteins imbibed in and associated to red-

blood cell membrane has been investigating as targets for IgG antibodies present in patients with malaria. Immunoproteomic data revealed that cytoskeletal proteins such as spectrin and actin, and the transmembrane chloride/bicarbonate anion exchanger protein (band 3) are possible targets of those antibodies. DM results showed that both anti-band 3 IgG and an anti-erythrocyte polyclonal antibody and antibodies present in the plasma of patients with malaria, either anemic or non-anemic, led to significant diminution of mean square intensity contrast fluctuation in the membrane. The reduction of membrane fluctuations was more pronounced for anemic patients than for those with malaria but non-anemic. Thus, one can use defocusing microscopy as a diagnostic tool for morphological and mechanical parameters of red-blood cells, including nanotoxicity studies.

KEYWORDS: Defocusing microscopy; Nanoscale membrane fluctuations; Red-blood cells; Malaria; Nanotoxicity

1 | INTRODUÇÃO

A microscopia de desfocalização é uma técnica de obtenção e análise de imagem que pode ser aplicada para objetos transparentes. Eritrócitos são objetos bastante apropriados para a análise por microscopia de desfocalização, fornecendo parâmetros morfológicos como o aspecto tridimensional, volume e área superficial e parâmetros mecânicos como a amplitude média da flutuação de membrana. Eritrócitos humanos submetidos a osmolaridades diferentes tornam-se esféricos em meios hipotônicos, sendo que o grau de esfericidade diminui gradativamente com o aumento da osmolaridade. As flutuações de membrana que existem em uma escala manométrica são reduzidas em qualquer condição de estresse osmótico, seja por aumento ou por diminuição da quantidade de água na célula (ROMA et al., 2016). A associação entre a malária e a anemia é uma área importante de investigação, uma vez que modificações na membrana do eritrócito não infectado podem ocorrer devido à ligação de anticorpos IgG produzidos durante a infecção. Investigações de imunoproteômica podem revelar as proteínas que se ligam a esses anticorpos, após a separação proteica em eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massa (MOURÃO et al., 2016). Em um estudo realizado com pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, a principal espécie causadora de malária no Brasil, verificamos que imunoglobulinas G purificadas de pacientes promoveram uma diminuição na amplitude média de flutuação de membrana de eritrócitos de indivíduo sadio. A diminuição foi mais pronunciada para os plasmas de pacientes anêmicos quando comparados aos pacientes que não desenvolveram essa manifestação clínica (MOURÃO et al., 2016). Eritrócitos são ainda empregados como células modelo para o ensaio de toxicidade de nanoestruturas. Estudos na área de nanotoxicidade mostraram que grafeno e óxido de grafeno promovem hemólise com a liberação de hemoglobina. Ensaio clássico de viabilidade celular

por meio do monitoramento óptico da redução do brometo de metilthiazolildifenil-tetrazólio (MTT) não puderam ser conduzidos devido às propriedades redutoras do grafeno e do óxido de grafeno (LIAO et al., 2016). Deste modo, a microscopia de desfocalização constitui uma ferramenta física promissora para a investigação do efeito de nanoestruturas sobre os eritrócitos, permitindo a avaliação de diversos parâmetros morfológicos e mecânicos em células individuais.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Imunoproteômica

Para a focalização isoeétrica, 100 µg do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas não infectadas do tipo O+ foram dissolvidos em 125 µL de solução de reidratação (ureia a 8 mol.L⁻¹, tiourea a 2 mol.L⁻¹, detergente CHAPS a 4% em massa, azul de bromofenol a 0,0025 % em massa, ditiotreitol a 65 mmol.L⁻¹ e anfólitos Bio-Lyte 3-10 buffer BioRad 1X). As amostras foram incubadas, sob agitação, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e então centrifugadas, a 16.000 g, durante 30 minutos, a 22 °C. A focalização isoeétrica consistiu nas seguintes etapas: 500 V por 30 minutos, 1.000 V por 30 minutos, 4.000 V por uma hora e 4.000 V até 16.000 V/hora. Após a focalização isoeétrica, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A migração das proteínas foi realizada em um sistema do tipo Mini-Protean II (BioRad, Hercules, CA, EUA), a 50 V, por 30 minutos, e a 100 V até o final da corrida. Os géis foram transferidos para uma membrana de PVDF (Immun-Blot TM PVDF Membrane for Protein Blotting, 0,2 µm, BioRad), em tampão Tris a 25 mmol.L⁻¹, glicina 0,2 mol.L⁻¹, metanol 20% v/v, pH 8,5), por 2 h a 100 V. Os géis foram tratados com anticorpos de pacientes com malária, anêmicos e não anêmicos por 12 h, a 4 °C, sob agitação. Após o tratamento com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase, a revelação das membranas foi feita utilizando-se 2 mL de *Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore-Merck, Bilerica, MA, EUA). Procedida a análise de imagens, a digestão tripsínica das bandas proteicas correspondentes às proteínas reconhecidas pelos soros dos pacientes foi conduzida em uma solução contendo ACN (10% v/v) e NH₄HCO₃ 40 mol.L⁻¹, pH 8,0, durante 17 h a 37 °C. Os peptídeos obtidos foram identificados por sequenciamento de aminoácidos por espectrometria de massa (MALDI-ToF MS/MS, Autoflex, Bilerica, MA, EUA).

2.2 Microscopia de desfocalização

Os experimentos de microscopia de desfocalização foram conduzidos em um microscópio invertido modelo Nikon Eclipse TI, contendo um filtro que permitia a passagem de luz com comprimento de onda maior que 610 nm (NA 1.3, Nikon, Tokyo, Japan) e uma câmara ambiental (Chamlide ICCU:109, Live Instrument, Nowangu,

Coreia do Sul), mantida a 37 °C. As imagens das hemácias foram capturadas com uma câmera CMOS (CMOS, Silicon Video® 642M, Epix), utilizando-se uma taxa de captura fixada em 300 *frames* por segundo, durante 10 segundos. A distância focal foi controlada pelo equipamento *Nikon Perfect Focus System* (Nikon, Tokyo, Japan). Para o experimento, um volume de 0,5 µL de sangue fresco, retirado de indivíduo não anêmico e que não contraiu malária, foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato a pH 7,4, contendo NaCl a 150 mmol.L⁻¹) e albumina de soro bovino 1,0 mg.mL⁻¹. Esta solução tem um índice de refração de 1,333 ± 0,001 e representa uma solução isotônica. A deposição dos eritrócitos no porta-amostras do microscópio foi conduzida a 37°C por 15 minutos. Então, imagens individuais de eritrócitos (dez células) foram registradas por 10 s. Imunoglobulinas G de plasmas de pacientes com malária, anêmicos e não anêmicos foram enriquecidos por cromatografia de afinidade (HiTrap™ Protein Column, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA). Foi ainda utilizado um anticorpo policlonal anti-hemácia [IgG *Anti human red blood cell (RBC) antibody* ABIN238043; antibodies online.com], cujo imunógeno consiste em hemácias humanas lavadas. Um anticorpo obtido contra um peptídeo sintético derivado da proteína transmembranal banda 3 foi obtido comercialmente. Um anticorpo que se liga a um antígeno de bacteriófago foi utilizado como controle negativo. Os anticorpos foram incubados com a suspensão de eritrócitos durante 30 minutos a 37 °C. A mesma célula foi analisada individualmente no microscópio invertido durante 10 s. A análise de dados foi conduzida com o programa computacional ImageJ *Plugins*, que forneceu os valores de flutuação quadrática média, antes e após a adição dos anticorpos. Medidas de flutuação de altura da membrana plasmática foram conduzidas a partir da equação que descreve a flutuação de contraste de intensidade quadrática média (ROMA *et al.*, 2016).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de imunoproteômica evidenciaram que os plasmas de pacientes com malária, anêmicos ou não anêmicos, reconheceram um número maior de proteínas na membrana do eritrócito quando comparados aos anticorpos de indivíduos controle, sem malária. Determinadas proteínas foram reconhecidas exclusivamente pelos anticorpos dos indivíduos com malária, tais como anquirina, dematina, proteína banda 7 e proteína 4.2. Verificou-se, ainda, que grande parte das bandas detectadas nos grupos com malária corresponderam às proteínas de citoesqueleto espectrina e actina (principalmente a beta), e à proteína transmembranal denominada de banda 3. A banda 3 é uma proteína presente na membrana do eritrócito que atua como catalisador de um transporte do tipo antiporte dos íons cloreto e bicarbonato. A banda 3 possui quatorze hélices que atravessam a membrana e regiões de ligação de anticorpos (REITHMEIER *et al.*, 2016). A evidência de que os anticorpos anti-banda

3 estavam aumentados nos plasmas de pacientes anêmicos, aliada ao fato de que essas imunoglobulinas têm sido associadas à remoção de hemácias senescentes em diferentes estudos (LUTZ et al., 2012), levou-nos a utilizar um anticorpo monoclonal comercial anti-banda 3 nos ensaios de microscopia de desfocalização. Utilizamos, ainda, um anticorpo policlonal comercial anti-hemácia e os soros de pacientes anêmicos e não anêmicos. Diferenças significativas foram ainda observadas quando comparamos as amplitudes médias das flutuações nanométricas (*urms*) das superfícies das hemácias antes e após a adição de anticorpos anti-banda 3 e anti-hemácia (Figura 1). Houve uma redução na *urms* após a adição do anticorpo IgG anti-banda-3 (*urms* antes: $21,33 \pm 3,75$ versus *urms* depois: $18,54 \pm 2,27$; $p = 0,0103$), o que também ocorreu em relação à adição do anticorpo IgG anti-hemácia (*urms* antes: $18,80 \pm 2,12$ versus *urms* depois: $11,39 \pm 4,71$; $p = 0,0078$). A adição de anticorpos purificados do plasma de pacientes não anêmicos e de pacientes anêmicos promoveu uma redução da flutuação de 11% (*urms* de $25,50 \pm 3,35$ para $22,66 \pm 2,80$ nm; $p = 0,0331$) e de 21% (*urms* de $24,01 \pm 5,16$ para $18,95 \pm 7,34$ nm; $p = 0,0007$), respectivamente. Em contrapartida, os anticorpos inespecíficos não causaram mudanças significativas nos parâmetros morfológicos e mecânicos dos eritrócitos.

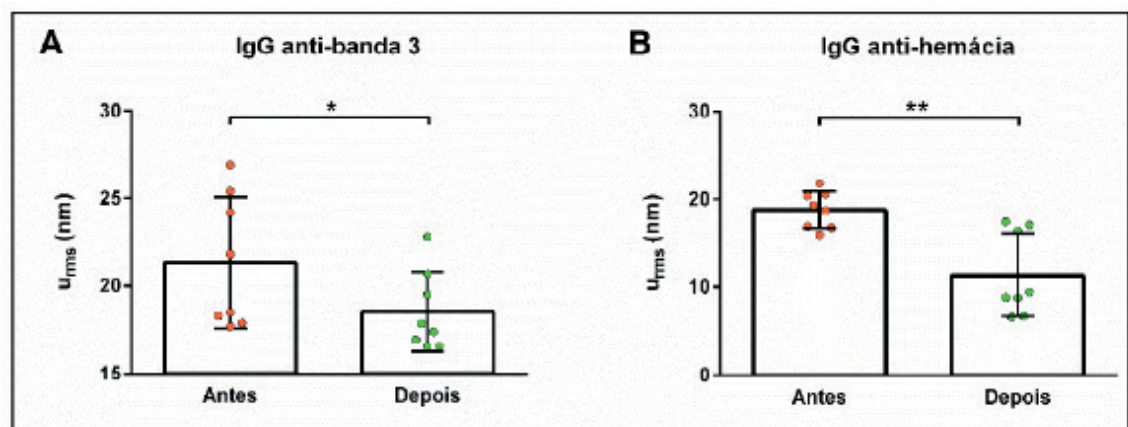


Figura 1. Avaliação dos efeitos dos anticorpos anti-banda 3 e anti-hemácia sobre a amplitude média de flutuações (*urms*) de membranas de eritrócitos. Os valores representam média e desvio padrão de medidas de oito células. $p^* = 0,0103$, $p^{**} = 0,0078$

4 | CONCLUSÃO

Os resultados de imunoproteômica e de microscopia de desfocalização convergem para sugerir que a proteína banda 3 possa ser um dos alvos de anticorpos nos plasmas de pacientes com malária, sendo que ambas as metodologias sugerem efeitos mais pronunciados em indivíduos anêmicos quando comparados com o grupo de pacientes anêmicos. O efeito dos anticorpos sobre o transporte antiporte de cloreto e bicarbonato no eritrócito está sendo investigado. Os resultados evidenciam que a microscopia de desfocalização é uma ferramenta de diagnóstico

de alterações celulares, que pode também ser empregada para a avaliação do efeito de nanoestruturas sobre objetos transparentes como os eritrócitos.

AGRADECIMENTOS

Embrapa, Capes, CNPq, FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

LIAO, K.H et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 3, n. 7, pp. 2607-2615, 2011.

LUTZ, H.U. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v.39, n. 5, p.321-327, 2012.

MOURÃO, L.C. et al. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malaria Journal*, v. 15, article number 397, 2016.

REITHMEIER, R.A.F. et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, n. 7, pp. 1507-1532, 2016

ROMA, P.M.S. et al. Profiling of individual human red blood cells under osmotic stress using defocusing microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 21, n. 9, article number 090505, 2016.

SOBRE O ORGANIZADOR

CLEBERTON CORREIA SANTOS- Graduado em Tecnologia em Agroecologia, mestre e doutor em Agronomia (Produção Vegetal). Tem experiência nas seguintes áreas: agricultura familiar, indicadores de sustentabilidade de agroecossistemas, uso e manejo de resíduos orgânicos, propagação de plantas, manejo e tratamentos culturais em horticultura geral, plantas medicinais exóticas e nativas, respostas morfofisiológicas de plantas ao estresse ambiental, nutrição de plantas e planejamento e análises de experimentos agropecuários.

(E-mail: cleber_frs@yahoo.com.br) – ORCID: 0000-0001-6741-2622

ÍNDICE REMISSIVO

A

Acidentes 109, 310, 311, 312, 313, 314

Aminas primárias 81, 84, 85

Atividade antioxidante 144, 146, 151, 152, 153, 155, 156

B

Bioimpressão 193, 194, 195, 196, 199

C

Castanhola 74, 75, 79

Compostos multifuncionais 64, 67

Compressores Herméticos 34, 35, 36, 39, 40

Construção Civil 102, 105, 112, 113, 157, 179, 363

CPTEC 205, 206, 207, 208, 217

E

Equações lineares 45, 233, 236, 237, 238, 239, 240, 353

Estrutura axiomática 183, 186, 189

F

Fonte de fissão 41, 42, 44, 45, 47, 48, 49

G

Geoprocessamento 1, 2

H

Hemocentro 317, 322, 323, 324, 326

Hibridização 64, 65, 67, 68, 69, 71

L

Lesson Study 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225

Leveduras 8

M

Mapeamento 1, 2, 3, 4, 6, 7, 181, 280

Mecânicas de eritrócitos 226

Multi-objetivo 277, 278, 279, 281, 282, 283, 284, 287

Mutagênese 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18

P

PHB/PC 253, 254, 257, 261, 262, 264

Protocolos de redes 52

R

Redes neurais 349, 350, 351, 354, 356, 358, 359, 360, 361, 362

Risco de inundação 1, 3, 4, 5, 6, 7

S

Smart Grids 51, 52, 53, 61

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-622-5

