

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2



Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)


Atena
Editora
Ano 2021

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2



Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Atena
Editora
Ano 2021

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. 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.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Fernando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Sidney Gonçalves de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Profª Drª Miraniide Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
Profª Drª Andrezza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa

Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
Prof. Me. Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Lúvia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembi Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

O fortalecimento intensivo das ciências biológicas e suas interfaces 2

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Camila Alves de Cremona
Correção: Flávia Roberta Barão
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F736 O fortalecimento intensivo das ciências biológicas e suas interfaces 2 / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-135-7
DOI 10.22533/at.ed.357212805

1. Ciências biológicas. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

O livro “O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2” é uma obra cujo foco principal está na interrelação das diferentes áreas das Ciências Biológicas e em suas interfaces com outras áreas na produção de conhecimento. O presente volume abordará em seus vinte capítulos o conhecimento interdisciplinar que compõe a grande área de Ciências Biológicas através de artigos científicos originais, pesquisas, relatos de casos e/ou revisões.

Cada um dos estudos selecionados foi desenvolvido em reconhecidas instituições de ensino e pesquisa do país, e aborda as diferentes áreas da Biologia e áreas correlatas, que possuem interface com ela - Parasitologia, Microbiologia, Farmacologia, Zoologia, Botânica, Medicina, Educação em Saúde, Biologia Celular e Molecular, Genética entre outras. É necessário destacar que mais que nunca, biólogos têm estado presentes cada vez mais em áreas de pesquisa antes consideradas específicas de outras profissões. Esta interdisciplinaridade é extremamente importante, pois pesquisas com olhares de diferentes profissionais tendem a ter mais êxito e gerar melhores frutos. Por isto, trabalhos diversos são aqui discutidos com a proposta de ampliar o conhecimento científico e acadêmico, assim como abordar temas atuais e de interesse direto também da comunidade em geral.

Acreditamos que esta obra será importante para a difusão do conhecimento e da ciência e, assim como todas as demais obras da Atena Editora, esta também passará por julgamento de um corpo editorial formado por mestres e doutores. Esperemos que que você faça bom proveito!

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

ANÁLISE DOS RISCOS DA AUTOMEDICAÇÃO E A PREVALÊNCIA DESSE HÁBITO ENTRE OS ACADÊMICOS DA FACULDADE UNICESUMAR CAMPUS PONTA GROSSA

Ryan da Silva do Prado

DOI 10.22533/at.ed.3572128051

CAPÍTULO 2..... 17

ANÁLISE COMPARATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS E DAS FIBRAS ELÁSTICAS DE CORONÁRIAS E CARÓTIDAS EM PACIENTES AUTOPSIADOS

Luciano Alves Matias da Silveira

Gabriela Ribeiro Juliano

Laura Sanches Aguiar

Guilherme Ribeiro Juliano

Bianca Gonçalves Silva Torquato

Mariana Silva Oliveira

Fernando Pimenta de Paula

Marina Guerra Rotelli

Isadora Ignácio Lourenço

Vicente de Paula Antunes Teixeira

Mara Lúcia da Fonseca Ferraz

DOI 10.22533/at.ed.3572128052

CAPÍTULO 3..... 43

AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Bursaphelenchus cocophilus*

Arinaldo Pereira da Silva

Josineide Rodrigues da Costa

DOI 10.22533/at.ed.3572128053

CAPÍTULO 4..... 49

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS WISTAR TRATADOS COM POMADA DE EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA MILLER (ORA – PRO- NÓBIS)

Ana Rosa Crisci

Cauê Aparecido de Jesus Cavé Lima

Rosilene Alves Rodrigues

Vanessa Digilio Vanzo

Jose Norberto Bazon

Wilson Roberto Malfará

Lucila Costa Zini Angelotti

DOI 10.22533/at.ed.3572128054

CAPÍTULO 5..... 62

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA VIOLÊNCIA OBSTÉTRICA

Monique Rafaela de Oliveira Silva Lopes

Kátia Zeny Assumpção Pedroso

DOI 10.22533/at.ed.3572128055

CAPÍTULO 6..... 79

***Baccharis milleflora* (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA**

Ana Lays Braga

Rafael Pereira da Cruz

Joara Nályda Pereira Carneiro

Antonia Thassya Lucas dos Santos

Débora Lima Sales

Victor Juno Alencar Fonseca

Luciene Ferreira de Lima

Henrique Douglas Melo Coutinho

Luiz Everson da Silva

Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga

Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues

DOI 10.22533/at.ed.3572128056

CAPÍTULO 7..... 94

CONTAMINAÇÃO NO CULTIVO CELULAR: BOAS PRÁTICAS NO LABORATÓRIO

Giulia Galani Martha

Susane Lopes

Marcelo Maraschin

DOI 10.22533/at.ed.3572128057

CAPÍTULO 8..... 108

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95 EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS EL LARGO CAMINO RECORRIDO EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA, PARA PREVENIR HIDATIDOSIS. DESDE LA INVESTIGACIÓN HASTA SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE CONTROL. (1927 - 2016)

Jensen Oscar

Gertiser María Laura

DOI 10.22533/at.ed.3572128058

CAPÍTULO 9..... 134

DISPONIBILIDADE DE INFORMAÇÃO ORNITOLÓGICA DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ: PLANOS DE MANEJO

Adriana Barbosa Bussler

Vagner Cavarzere

DOI 10.22533/at.ed.3572128059

CAPÍTULO 10..... 147

ESTUDO DO FUNGO *Rhizopus stolonifer* CONHECIDO COMO BOLOR PRETO DO PÃO

Laryany Farias Vieira Fontenele

Aliny Lima de Sousa

Luana de Mikelle Rodrigues Pereira

DOI 10.22533/at.ed.35721280510

CAPÍTULO 11..... 155

O PROFESSOR “IDEAL” NA VISÃO DE ALUNOS DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA: UM ESTUDO DESCRITIVO

Edla Helena Salles de Brito
Débora Rosana Alves Braga
Dulce Maria de Lucena Aguiar
Maria Elisa Machado Ferreira Marcelo
Maria Viera de Lima Saintrain

DOI 10.22533/at.ed.35721280511

CAPÍTULO 12..... 163

NODULAÇÃO EM FEIJÃO GUANDU (*Cajanus cajan* L.) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE EXTRATO DE NÓDULOS

Simone Yasuda Fernandes
Glaucia Almeida de Moraes
Lucas Ortega Martins
Adriana da Silva Ribeiro
Vinicius Nunes Gomes
Daniela Fialho Duarte
Débora de Araújo

DOI 10.22533/at.ed.35721280512

CAPÍTULO 13..... 175

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM *Physalis* L.

André Pinto Lima
Hortência Kardec da Silva
Rafael Cruz Cordeiro
Maryelle Vanilla de Abreu Cerqueira
Jéssica Barros Andrade
Aparecida Gomes Feitosa
Joseane Inácio da Silva Moraes

DOI 10.22533/at.ed.35721280513

CAPÍTULO 14..... 183

PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO MÉDICO DE LA ECHINOCOCCOSIS QUÍSTICA. GENERACIÓN DE EVIDENCIA CLÍNICA EN SU UTILIZACIÓN PRE Y POST QUIRÚRGICA

Walner Daniel da Rosa Alvarez
Marcela Risso
Carlos Russi
Elisa Figueredo
Ana María Acuña

DOI 10.22533/at.ed.35721280514

CAPÍTULO 15..... 194

PARÂMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE

ÁGUA POTÁVEL

Junior Rodoi da Silva
Victor Abdiel de Souza de Brito
Arielly Neri de Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.35721280515

CAPÍTULO 16.....203

PROJETO DE EXTENSÃO CIENTISTA NA ESCOLA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

Tatiane do Nascimento Lima
Edihanne Gamarra Arguelho
Rogério Rodrigues Faria

DOI 10.22533/at.ed.35721280516

CAPÍTULO 17.....214

REPROGRAMAÇÕES METABÓLICAS EM MELANOMAS RESISTENTES AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Camila Kehl Dias
Ivi Juliana Bristot
Fábio Klamt

DOI 10.22533/at.ed.35721280517

CAPÍTULO 18.....229

RECURSOS AROMÁTICOS DA AMAZÔNIA: OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Edilene Carvalho Gomes Ribeiro
Denise Fernandes Coutinho

DOI 10.22533/at.ed.35721280518

CAPÍTULO 19.....245

TECNOLOGIA DO DNA: CLONAGEM DE DNA EM CÉLULAS VIVAS E PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Claudio Fernando Graciano Martins

DOI 10.22533/at.ed.35721280519

CAPÍTULO 20.....255

TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA ADAPTADOS PARA ÓLEOS ESSENCIAIS

Cristiane Mengue Feniman Moritz
Carolina Melchior Pereira
Nathália Righi Pessôa da Silva
Larissa Franciscatti Hoffmann
Adryelen Cassiano Martins
Giovanna Maísa Macanhan
Milene Ribeiro da Silva
Daniella Londero Silva Batisti
Lidaiane Mariáh Silva dos Santos Franciscato

DOI 10.22533/at.ed.35721280520

SOBRE A ORGANIZADORA.....	268
ÍNDICE REMISSIVO.....	269

CAPÍTULO 20

TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA ADAPTADOS PARA ÓLEOS ESSENCIAIS

Data de aceite: 26/05/2021

Data de submissão: 07/03/2021

Cristiane Mengue Feniman Moritz

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7906324507297720>

Carolina Melchior Pereira

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/9844378902447476>

Nathália Righi Pessôa da Silva

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/8067210990309163>

Larissa Franciscatti Hoffmann

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/2319887356290625>

Adryelen Cassiano Martins

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/5051872327705055>

Giovanna Maísa Macanhan

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/9347378720106366>

Milene Ribeiro da Silva

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/8409816220613721>

Daniella Londero Silva Batisti

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/6355093770594960>

Lidaiane Mariáh Silva dos Santos Franciscato

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/1328698701617650>

RESUMO: Para a condução dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos naturais, principalmente óleos essenciais, os métodos oficiais são adaptados para evitar interferências das características físicas e químicas dos compostos testados. Este artigo teve o objetivo de relacionar os principais ajustes de protocolos de atividade antimicrobiana com produtos naturais empregados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, com base nas pesquisas desenvolvidas, principalmente com óleos essenciais, entre os anos de 2010 a 2021. Foram descritos os ajustes para a solubilização dos óleos essenciais para o método da microdiluição em placas, para a leitura e interpretação dos resultados da Concentração Inibitória Mínima

(CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), além da possibilidade de se obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana, como alternativa para o ensaio de cinética de morte microbiana. Em relação aos métodos de difusão em ágar foram abordadas as possíveis desvantagens da utilização dessas técnicas para a investigação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, antimicrobianos naturais, testes de sensibilidade, microdiluição, difusão em ágar.

ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS ADAPTED TO ESSENTIAL OILS

ABSTRACT: For the conduct of sensitivity tests to natural antimicrobials, mainly essential oils, the official methods are adapted to avoid interferences of the physical and chemical characteristics of the tested compounds. This article aimed to relate the main adjustments of antimicrobial activity protocols with natural products used in the Microbiology Laboratory of the State University of Maringá - Campus Umuarama, based on the research developed, mainly with essential oils, between the years 2010 to 2021 Adjustments for the solubilization of essential oils for the microdilution plate method were described, for reading and interpreting the results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and possibility of obtaining the information of the time required that an essential oil, in different concentrations, requires to cause bacterial death, as an alternative to the microbial death kinetics assay. Regarding the agar diffusion methods, the possible disadvantages of using these techniques to investigate the antimicrobial activity of essential oils were addressed.

KEYWORDS: Essential oils, natural antimicrobials, sensitivity tests, microdilution, agar diffusion.

1 | INTRODUÇÃO

Nos estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ou outras substâncias antimicrobianas em estágio de desenvolvimento são empregados os Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) tendo como base as normas dos documentos disponibilizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EuCAST).

No Brasil, em 14 de dezembro de 2018, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 64 de 11/12/2018 que “Determina aos laboratórios de rede pública e rede privada, de todas as Unidades Federadas, a utilização das normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), tendo como base os documentos da versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, o BrCAST”, com prazo de 12 meses para adequação dos laboratórios de microbiologia das redes pública e privada.

Os protocolos de TSA são referentes aos agentes antimicrobianos aprovados pelas agências regularizadoras internacionais, já correlacionados com as características físico-

químicas de cada antimicrobiano. No entanto, quando se trata de pesquisa científica para a prospecção de novos ativos antimicrobianos é relevante considerar as interferências das características físicas e químicas desse ativo nos TSA, como a solubilidade em meio aquoso ou o solvente mais apropriado, a coloração do ativo, as concentrações mínimas a serem testadas, o grau de dispersão em ágar e outros fatores a serem considerados, por influenciar a leitura dos resultados qualitativos ou quantitativos.

Portanto, os TSA aplicados para compostos naturais, como extratos e óleos essenciais, necessitam de adaptações dos métodos oficiais. Os ajustes de protocolos são muitas vezes baseados nas capacidades laboratoriais dos centros de pesquisa, com base nos estudos científicos já publicados. De certa forma, as diferentes condições de análise pode ser um fator interferente nas distorções de resultados encontrados em diferentes pesquisas com os mesmos extratos ou compostos. Além das variáveis associadas à composição química dos produtos naturais, como por exemplo os óleos essenciais, a comparação de pesquisas científicas com ativos naturais da mesma espécie também sofre a possível dispersão de resultados em função da falta de padronização dos TSA utilizados na prospecção e desenvolvimento de antimicrobianos naturais.

O objetivo deste capítulo foi relacionar os principais ajustes de protocolos de atividade antimicrobiana com produtos naturais empregados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, com base nas pesquisas desenvolvidas, principalmente com óleos essenciais, entre os anos de 2010 a 2021.

21 SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM PLACAS

O método de microdiluição em placas é o mais empregado dentro dos métodos de diluição para os TSA. A leitura dessa técnica permite determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento microbiano visível.

Nos ensaios com óleos essenciais é fundamental garantir a máxima homogeneização da maior concentração a ser testada. Na rotina do laboratório de Microbiologia, da UEM – Campus Umuarama, tem-se como premissa testar o óleo essencial em questão na maior concentração de 25,6 mg mL⁻¹, equivalente a 2,56%. No entanto, essa concentração é preparada dupla (51,2 mg mL⁻¹) em caldo Mueller Hinton adicionado de 0,5% de Tween 80 (polissorbato 80), para ser adicionada no volume de 50 µL no poço da microplaca, o qual receberá posteriormente 50 µL de inóculo preparado também em caldo Mueller Hinton, na concentração de aproximadamente 1,0 x 10⁻⁶ UFC mL⁻¹. Após a adição do inóculo, a concentração final do poço com a maior concentração a ser testada será a estabelecida de 25,6 mg mL⁻¹ e a concentração do inóculo será de 0,5 x 10⁻⁶ UFC mL⁻¹.

A adição de Tween 80 no Caldo Mueller Hinton tem como objetivo emulsificar o óleo essencial, uma vez que o meio de cultura é preparado como uma solução aquosa

e o óleo essencial é imiscível em água. Para o preparo da concentração dupla de óleo essencial utiliza-se um tubo de ensaio, em que é adicionado o volume de óleo essencial correspondente ao peso necessário para a concentração que se deseja (considerando a densidade do óleo essencial) e segue a adição do mesmo volume de propilenoglicol, com a finalidade de aumentar a solubilização do óleo essencial. Após agitação em vórtex, adiciona-se o caldo Mueller Hinton no volume necessário para completar a solução.

Utilizando somente o Caldo Mueller Hinton com 0,5% de Tween 80 no preparo da maior concentração, percebeu-se que minutos após a agitação em vórtex o óleo essencial separava-se da solução, o que não garantia a adição homogênea nos poços da maior concentração a ser testada, com interferência direta nos demais poços da diluição sequencial.

A adoção da etapa de adição de propilenoglicol facilitou a solubilização do óleo essencial no Caldo Mueller Hinton, mas ainda não é possível obter uma solubilização completa dependendo do tipo de óleo essencial que está sendo testado.

Espécie vegetal	Óleo essencial				Nanoemulsão			
	ATCC 29213		ATCC 25922		ATCC 29213		ATCC 25922	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Aroeira vermelha - sementes (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	> 25.6	> 25.6	12.8	> 25.6	> 25.6	> 25.6	< 0.05	0.2
Canela - cascas (<i>Cinnamomum cassia</i>)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.8	0.1	0.2
Tea tree - folhas (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	> 25.6	> 25.6	6.4	> 25.6	< 0.05	< 0.05	1.6	1.6

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais e suas respectivas nanoemulsões. Concentrações em mg mL⁻¹.

Em um experimento de rotina para comparar a atividade antibacteriana de três óleos essenciais e suas respectivas nanoemulsões, preparadas pelo método de baixa energia (rotação a 100 rpm) e mantendo o Tween 80 como emulsificante, obteve-se CIMs menores para as nanoemulsões em relação aos seus respectivos óleos essenciais, para os óleos essenciais de aroeira vermelha e tea tree (Tabela 1).

3 | LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CIM

A leitura dos resultados do teste de microdiluição em placas pode ser por meio da turbidez (densidade óptica) ou utilizando indicadores colorimétricos.

Na leitura do teste de microdiluição em placas utilizando a turbidez, há a necessidade da disponibilidade de equipamento de leitura de absorvância para microplacas, denominado leitora de microplacas. O crescimento microbiano nos poços contendo o antimicrobiano deve

ser comparado com os poços contendo meio de cultura sem o antimicrobiano, utilizados como controles negativos. De acordo com a norma do CLSI, deve-se ler o ponto final na concentração em que haja uma redução de 80% ou mais do crescimento microbiano, quando comparado com o controle. Essa tolerância foi estabelecida em consequência de um ligeiro crescimento bacteriano quando são testados os antimicrobianos convencionais trimetoprim e as sulfonamidas.

No caso de teste de microdiluição com produtos naturais, a leitura da absorbância pode ter o inconveniente de interferência na turbidez quando se trata de óleos essenciais microencapsulados (causam a turvação do meio) e com extratos aquosos ou hidroalcoólicos (com coloração característica da planta).

Na Tabela 2 está um exemplo dos valores de leitura de absorbância de uma microplaca em que foi testado um óleo essencial microencapsulado com ciclodextrina. Observa-se no poço B da coluna 1 (controles negativos) um valor superior aos demais valores. Isso ocorreu pois foi estabelecido como protocolo do laboratório reservar um poço da coluna 1 para o controle negativo da maior concentração e outro poço para o controle negativo da menor concentração (poço C da coluna 1).

	Controle negativo	Controle positivo	C1: 25,6 mg mL ⁻¹	C2: 12,8 mg mL ⁻¹	C3: 6,4 mg mL ⁻¹	C4: 3,2 mg mL ⁻¹	C5: 1,6 mg mL ⁻¹	C6: 0,8 mg mL ⁻¹	C7: 0,4 mg mL ⁻¹	C8: 0,2 mg mL ⁻¹	C9: 0,1 mg mL ⁻¹	C10: 0,05 mg mL ⁻¹
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,652	2,689	2,196	1,911	1,937	1,869	1,459	1,007	0,637	0,648	0,68
B	2,311	0,507	2,782	1,907	1,879	1,831	1,551	0,857	0,564	0,614	0,674	0,657
C	0,059	0,634	2,683	2,171	2,089	1,966	1,832	1,357	0,792	0,47	0,579	0,605
D	0,058	0,59	2,645	2,098	1,725	1,946	1,838	1,726	1,142	0,601	0,64	0,716
E	0,057	1,421	2,551	2,042	1,962	1,855	1,688	1,51	1,312	1,161	1,262	1,309
F	0,059	1,185	2,604	2,341	1,682	1,628	1,303	1,171	1,274	1,302	1,184	1,236
G	0,067	1,481	2,578	2,086	2,022	1,906	1,764	1,562	1,231	1,327	1,238	1,289
H	0,06	1,381	2,611	2,14	1,991	1,959	1,872	1,645	1,46	1,255	1,177	1,256

Tabela 2 – Absorbância obtida na leitora de microplacas para o teste de sensibilidade antimicrobiana de óleo essencial microencapsulado com ciclodextrina.

Antes da implantação da leitura da absorbância para os testes de microdiluição em placas no Laboratório de Microbiologia da UEM – Campus Umuarama, era adotada apenas a leitura do teste com o indicador de óxido-redução resazurina, o qual adquire coloração rosa no caso de crescimento microbiano e permanece com coloração azul nos poços em que houve inibição microbiana. Os métodos colorimétricos para determinar a CIM são

considerados rápidos e de baixo custo, pois não necessitam de equipamento. No entanto, a mesma dificuldade de observação do resultado positivo ou negativo permanece quando se trata um extrato aquoso ou hidroalcoólico com coloração. Na Figura 1 observa-se essa interferência por conta da coloração do extrato aquoso testado, o que pode gerar um resultado falso-positivo. No poço B2 ocorreu uma coloração intensa do controle negativo, contendo a maior concentração testada. Para o analista, nesse caso ocorre a dúvida principalmente em relação às colunas 3 a 6, se a coloração é em função do crescimento microbiano ou do próprio extrato testado.

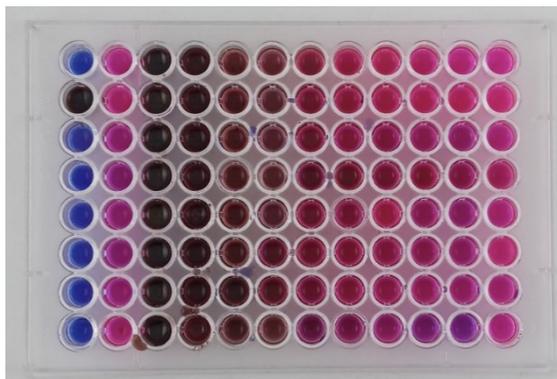


Figura 1 – Microplaca para leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o indicador resazurina.

O método de microdiluição proposto por Mann e Markham (1998), para a determinação da CIM de óleos essenciais, baseou-se na comparação da leitura visual e fotométrica das microplacas e demonstrou que os resultados da microdiluição podem ser avaliados sem instrumentação.

A resazurina é um indicador de óxido-redução que foi extensivamente utilizada na investigação da qualidade do leite. Para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* o método em placa por microdiluição proposto por Palomino *et al.* (2002), utilizando a resazurina foi denominado como REMA (Resazurin Microtiter Assay).

No entanto, a leitura da microplaca com o indicador resazurina passa a ser subjetiva e dependente a percepção do analista. Em determinadas situações, conforme o óleo essencial que está sendo testado, a diferenciação de cor entre o azul e o rosa fica comprometida e causa incerteza na leitura de crescimento microbiano positivo ou negativo.

Visando a possibilidade da utilização de uma técnica mais precisa para a realização da leitura CIM de óleos essenciais pelo método do indicador resazurina, utilizou-se o software ImageJ (disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>) para obter a diferenciação dos poços positivos e negativos quanto ao crescimento microbiano. O princípio baseia-se na leitura colorimétrica por meio da inversão de cores, para fins de comparação da leitura

dos resultados pelas fotografias originais. Na Figura 2A observa-se a imagem de uma microplaca tratada pelo método indicador resazurina e na Figura 2B, a imagem analisada pelo software.

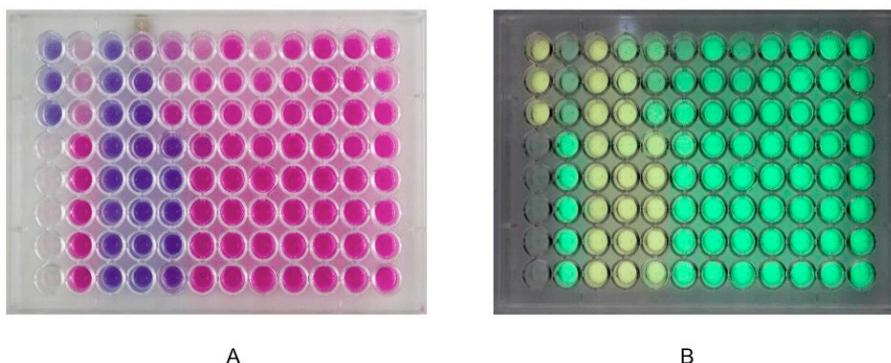


Figura 2 – Microplaca do método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): imagem tratada pelo Software ImageJ.

A primeira coluna de poços microplaca foi reservada como referência os poços de controle negativo, em que não foi adicionada a cultura microbiana. No poço A1 foi adicionado apenas o meio de cultura Caldo Mueller Hinton, no poço B1 foi adicionada o meio de cultura com a maior concentração de óleo essencial e no poço C1 continha o meio de cultura com a menor concentração de óleo essencial.

Os poços da segunda coluna da microplaca foram reservados para os controles positivos dos microrganismos em teste, constituindo-se apenas dos inóculos em meio de cultura (ausência de antimicrobiano).

Na leitura visual do resultado, nos poços de coloração rosa entendeu-se que houve redução do indicador, pela reação com o meio de cultura reduzido em função do metabolismo microbiano, ou seja, que não houve inibição da cultura (resultado positivo). Nos poços de coloração azul houve inibição microbiana (resultado negativo).

Nos poços da linha 1, colunas 4 e 5, observou-se que as cores apresentadas não foram semelhantes as cores tomadas como padrão positivo ou negativo, o que gerou dúvida e não se pode afirmar se houve ou não inibição do crescimento microbiano. Observando a Figura 2B, foi possível verificar com clareza o resultado dos poços citados anteriormente, sendo que para ambos os casos não houve inibição do crescimento microbiano (indicação da coloração verde). A inversão das cores disponível no software permitiu uma maior visibilidade dos resultados, uma vez que o comando inverte todas as cores e valores de brilho dos pixels da camada ativa da imagem, tornando áreas claras em áreas escuras. Os resultados da comparação foram expostos similarmente como mostra a Figura 3, na qual

os símbolos (+), (-) e (+/-) representam se houve crescimento microbiano, se não houve crescimento microbiano e incerteza do resultado, respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D		+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
E		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
F		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H		+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
F		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

B

Figura 3 – Representação da leitura dos resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): analisando imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): analisando a imagem tratada pelo Software ImageJ. (+): crescimento microbiano. (-) inibição microbiana. (+/-) incerteza do resultado.

A resazurina é um indicador químico, que durante a sua redução há alteração de cor. No leite e em solução aquosa, a resazurina é azul e se reduz para resorufina, de coloração rosa. A resorufina pode ser reduzida ainda à hidrorresorufina, um composto incolor. A reação para resorufina é irreversível, enquanto que a redução para hidrorresorufina é reversível (ERB; EHLERS, 1950). O que explica que alguns poços do controle positivo (segunda coluna da Figura 2A) tenham ficado incolores.

A resazurina, também referenciada como Alamar Blue, é azul e não fluorescente. Quando reduzida pela atividade celular, provavelmente pelo consumo de oxigênio no metabolismo microbiano, passa a ter coloração rosa fluorescente (O'BRIEN, 2000). Essa fluorescência pode ser fotografada em fotodocumentador para géis de eletroforese. Na Figura 4 estão as imagens da microplaca com o teste de microdiluição de um óleo essencial, fotografadas por câmera de celular (A) e por fotodocumentador (B).

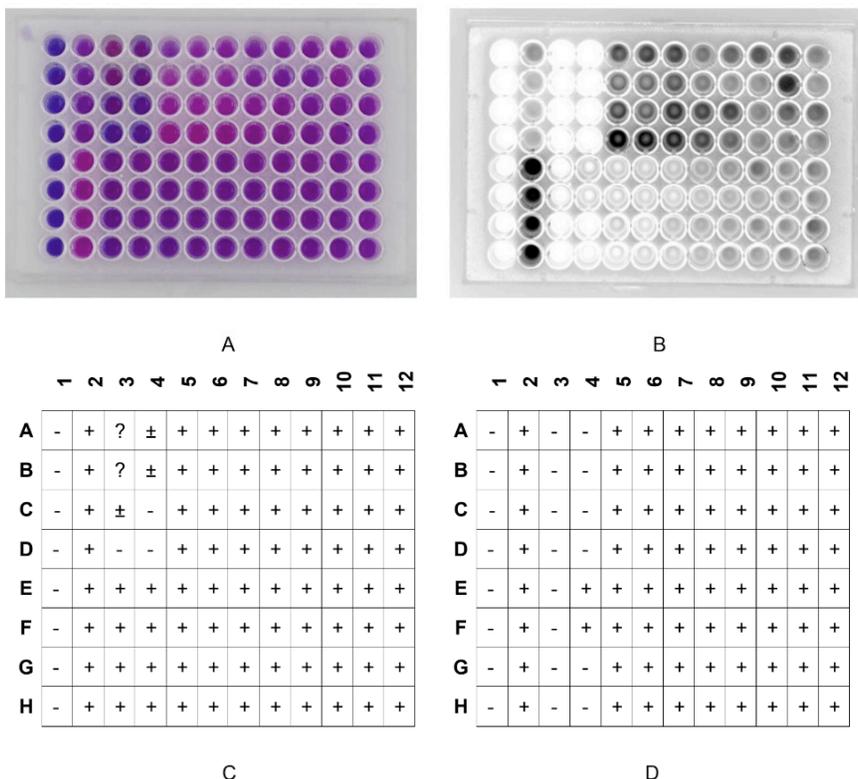


Figura 4 – Microplaca do método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): imagem fotografada por câmera de celular. (B): imagem obtida em fotodocumentador. (C): representação da leitura dos resultados observando (A). (D): representação da leitura dos resultados observando (B). (+): crescimento microbiano. (-) inibição microbiana. (+/-) incerteza do resultado. (?): sem parâmetro.

Foi estabelecido como protocolo no teste de microdiluição em placas a utilização do indicador resazurina para a leitura do resultado da CIM, de forma que é adicionado o indicador após a incubação com o inóculo. A microplaca permanece overnight sob refrigeração, com a leitura do resultado no dia posterior. Esse tempo se faz necessário para que haja a completa redução do indicador nos poços em que ocorreu crescimento microbiano. No entanto, mesmo após esse tempo pode ocorrer dificuldades na leitura, como observado na Figura 4A. Desse modo, a imagem por fotodocumentador tornou-se fundamental para evitar as incertezas nos resultados e a dependência dos referenciais de cor de cada analista.

É nítida a diferença dos poços com crescimento microbiano dos poços em que ocorreu inibição (Figura 4B). Esse fato traz um conforto ao analista para expressar os resultados sem dúvidas e incertezas. No entanto, os registros das microplacas utilizados fotografias com câmeras convencionais continuam sendo realizados no laboratório.

4 | CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Realizando o repique de cada poço da microplaca após a incubação, utilizada no método de microdiluição para a determinação da CIM, em meio de cultura solidificado é possível determinar qual a concentração necessária do óleo essencial em estudo para promover a morte celular, ou seja, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para bactérias ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) para leveduras e fungos filamentosos.

No entanto, o repique para a CBM utilizando o ponto final de incubação para a determinação de CIM não permite uma visão sobre o processo de morte que ocorre durante o período de incubação de 24 horas na presença do agente antimicrobiano. Além da CIM, informações confiáveis sobre a propriedade microbicida de um agente antimicrobiano é essencial para o sucesso do tratamento de infecções (HAMOUD *et al.*, 2012) ou o tempo necessário para exercer um efeito conservante eficaz em produtos alimentícios ou cosméticos.

O ensaio de curva de morte microbiana é um método refinado e preciso para os estudos de mecanismo de ação de substâncias antimicrobianas (ALBANO *et al.*, 2016). A curva de morte é normalmente executada com a determinação de células viáveis, sendo um método dispendioso quanto à demanda de materiais necessários para o plaqueamento das diluições requeridas, para alcançar valores seguros nas contagens de colônias.

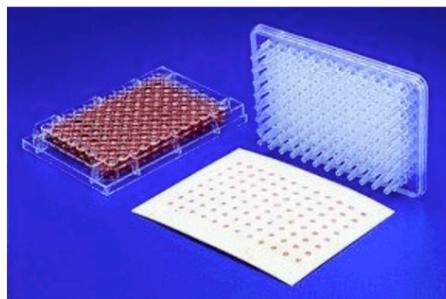
Diante do elevado custo e mão de obra intensa para executar diversas diluições e plaqueamentos em curtos intervalos de tempo, buscou-se uma alternativa para obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana.

Como protocolo para determinar a CBM em diferentes tempos de interação dos óleos essenciais com as bactérias alvo, estabeleceu-se as etapas de repique das microplacas nos tempos de 3, 6, 9 e 24 horas de incubação, antes da adição da resazurina para a leitura da CIM.

Para o repique das microplacas é utilizado um replicador de 96 poços estéril (Scienceware® - Figura 5A), com volume de 10 μL de cada poço. O replicador é utilizado como um “carimbador” em placas de Petri (150 mm) contendo Ágar Mueller Hinton (MHA). As placas de MHA são então incubadas em condições de aerobiose a 37 °C por 24 horas, para a observação de crescimento bacteriano e determinação da CBM. O não surgimento de colônias indica a morte bacteriana (Figura 5B).



A



B*

Figura 5 – (A) Leitura da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de um óleo essencial, com o repique da microplaca realizado 24 horas após a incubação. (B) Imagem do replicador. *Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z370819?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 17 set. 2020.

O replicador utilizado é autoclavável e permite o repique de todos os poços em um único movimento. Na Tabela 3 encontram-se os valores de CBM para três diferentes óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação das microplacas.

Óleo essencial	CBM ($\mu\text{L mL}^{-1}$) <i>Escherichia coli</i> (25922)				CBM ($\mu\text{L mL}^{-1}$) <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosembach (ATCC 29213)			
	3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
1	>25,6	6,4	3,2	3,2	12,8	12,8	12,8	12,8
2	12,8	12,8	6,4	3,2	6,4	6,4	3,2	3,2
3	>25,6	>25,6	25,6	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8

Tabela 3 – Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) em $\mu\text{L mL}^{-1}$ dos óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação, contra *Escherichia coli* (25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Foi possível observar que nas primeiras três horas de contato com as células de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach (Gram positiva) já houve a ação efetiva dos óleos essenciais de (1) e (3) na CBM final ($12,8 \mu\text{L mL}^{-1}$). Para o óleo essencial (2) foram necessárias nove horas de contato para a ação da CBM final ($12,8 \mu\text{L mL}^{-1}$). Já para a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* a ação efetiva da CBM dos óleos essenciais (2) e (3) foi alcançada com somente 24 horas de incubação, provavelmente por terem uma ação mais lenta dos óleos essenciais em efetivamente matar as bactérias Gram negativas, pela possibilidade de interação dos compostos químicos dos óleos essenciais com os lipopolissacarídeos da membrana externa, retardando o alcance dos mesmos na membrana celular, principal alvo de ação dos componentes dos óleos essenciais.

5 | MÉTODOS DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Muitas pesquisas científicas com óleos essenciais são publicadas apresentando resultados de CIM a partir de estudos que utilizaram as técnicas de difusão em ágar, principalmente o método de difusão em disco. O halo de inibição formado é medido no final do período de incubação.

Esse método pode utilizar o papel de filtro estéril, cilindros de aço colocado no meio de cultura ou orifícios perfurados no meio de cultura. Para extratos aquosos é possível considerar que irá ocorrer a difusão dos compostos ativos, pois os mesmos são solúveis no meio de cultura (preparado como uma solução aquosa). No entanto, o método torna-se inapropriado para amostras não polares ou que não se difundem facilmente no ágar. De modo geral, a potência antimicrobiana de amostras ainda em prospecção nem sempre pode ser comparada com os antibióticos convencionais, principalmente por causa das diferenças e desconhecidas propriedades físicas, como solubilidade, volatilidade e difusão em ágar (COS *et al.*, 2006).

6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de microdiluição em placas é o mais indicado para a pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, por ser de baixo custo em relação ao material necessário e a quantidade de amostra. A leitura do método de microdiluição utilizando o indicador resazurina facilita o desenvolvimento de estudos com antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, justamente por não necessitar de instrumentação como ocorre na leitura por turbidez. No entanto, a subjetividade na leitura dos diversos tons entre o azul e o rosa pode ser um fator limitante, quando não há parâmetros de coloração para antimicrobianos ainda não estabelecidos. Dessa forma, a utilização de um tratamento de imagem, favorecido pela utilização da resazurina, que se reduz a um composto fluorescente para os resultados positivos, permite aplicar ferramentas como o software ImageJ ou o fotodocumentador, proporcionando maior segurança e confiabilidade nos resultados a serem gerados com o método da microdiluição em placas.

Com o auxílio de um replicador é possível obter de forma prática e acessível o repique de todos os poços da microplaca utilizada para determinar a CIM, obtendo-se também a leitura da CBM ou CFM. O estudo do tempo de morte microbiano, em que repiques da microplaca são realizados ao longo do tempo de incubação, ainda pode fornecer informações importantes para a cinética de morte microbiana.

REFERÊNCIAS

ALBANO, M.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T. BARBOSA, L. N. PEREIRA, A. F. M. CUNHA, M. L. R. S. RALL, V. L. M. FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, part A, p. 83-90, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 64, de 11 de dezembro de 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55217765/do1-2018-12-14-portaria-n-64-de-11-de-dezembro-de-2018-55217696. Acesso em: 05 mar. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE / NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: CLSI/NCCLS document M7-A8, 2009.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.

ERB, R. E.; EHLERS, M. H. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 12, p. 853-864, 1950.

HAMOUD, R.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antimicrobial activity of a traditionally used complex essential oil distillate (Olbas® Tropfen) in comparison to its individual essential oil ingredients. **Phytomedicine**, v. 19, p. 969–976, 2012.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. GUERRA, J. SWINGS, J. PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

SOBRE A ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez Pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Ainda em 2007 trabalhou como professora substituta na Disciplina de Laboratório Clínico para Biomedicina e na disciplina de Imunologia para os cursos de Nutrição, Biomedicina e Medicina na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, até 2009. Após, trabalhou na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) – *Campus* Chapecó (2010 a 2013) e na Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) (2010 a 2014), para os cursos de Zootecnia, Agronomia, Ciências Biológicas, Psicologia, Engenharia Florestal, ministrando disciplinas como: Parasitologia, Zoologia, Microbiologia, Imunologia, Farmacologia entre outras. Atualmente é professora Adjunta III e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem - PPGEnf-UFPI. Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Amazônia 174, 229, 230, 231, 232, 240, 242
Análise de água potável 194
Antimicrobianos naturais 255, 256, 257, 266
Artérias carótidas 17, 18, 22, 27, 35, 36, 37, 38
Automedicação 1, 2, 3, 4, 5, 7, 15, 16
Avaliação histopatológica 49
Avifauna 134, 135, 138, 141, 142, 143, 146

B

Baccharis milleflora 79, 80, 82, 85, 86, 90, 92
Bolor preto do pão 147, 149, 150
Bursaphelenchus cocophilus 43, 45, 46, 48

C

Cajanus cajan L. 163, 164, 167, 170
Células vivas 99, 245, 246
Cicatrização de pele 49
Clonagem de DNA 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253
Cultivo celular 94, 95, 105

D

Difusão em ágar 256, 266
Distância genética 43, 44, 45, 46
DNA genômico 175, 177, 179, 180, 181, 182, 247
Docentes 155, 156, 160, 162

E

Echinococose cística (*Echinococcus quística*) 108, 109, 183, 184, 187, 190
Educação superior 155, 161
Estações ecológicas 134, 143
Extrato de nódulos 163, 168, 171, 173, 174

F

Fator de virulência 79, 80

Feijão guandu 163, 167, 168, 169, 171, 172, 173

Fungos oportunistas 79

G

Gestação 62, 63, 65, 73, 75, 78

H

Hospedeiros intermediários (*Hospederos intermediarios*) 108, 110, 111, 123, 132

M

Medicamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 50, 52, 60, 61, 63, 88, 215, 230, 231, 239, 241

Melanomas 214, 215, 216, 218, 228

Microdiluição 79, 83, 84, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 266

O

Odontologia 155, 156, 157, 158, 160, 161, 162

Óleos essenciais 79, 81, 87, 89, 92, 93, 229, 231, 232, 233, 234, 236, 240, 241, 242, 243, 244, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266

P

Parâmetros físicos-químicos 194

Parâmetros microbiológicos 196

Pereskia aculeata Miller 49, 50, 51, 59, 60, 61

Physalis L. 175, 176, 179, 180, 181

Projeto de extensão 203, 204, 206, 211, 212

Proteção integral 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 144

R

Ratos Wistar 49

Reprogramações metabólicas 214

Rhizopus stolonifer 147, 149, 152, 153

T

Testes de sensibilidade antimicrobiana 255

Tratamento médico (tratamiento médico) 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193

V

Vacina recombinante (vacuna recombinante) 108, 113, 114, 115, 116, 118, 122, 123, 125, 126, 127, 131, 132

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2



 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

 Atena
Editora

Ano 2021

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2



🌐 www.atenaeditora.com.br

✉ contato@atenaeditora.com.br

📷 @atenaeditora

📘 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora

Ano 2021