

# As Ciências Biológicas e da Saúde e seus Parâmetros 2

Christiane Trevisan Slivinski  
(Organizadora)



**Atena**  
Editora

Ano 2018

**Christiane Trevisan Slivinski**

(Organizadora)

**As Ciências Biológicas e da Saúde  
e seus Parâmetros  
2**

Atena Editora  
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação e Edição de Arte:** Geraldo Alves e Natália Sandrini

**Revisão:** Os autores

#### Conselho Editorial

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

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

C569 As ciências biológicas e da saúde e seus parâmetros 2 [recurso eletrônico] / Organizadora Christiane Trevisan Slivinski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. – (As ciências biológicas e da saúde e seus parâmetros; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-74-1

DOI 10.22533/at.ed.741180511

1. Ciências biológicas. 2. Saúde. I. Slivinski. Christiane Trevisan.

CDD 620.8

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

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

2018

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

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

As Ciências Biológicas estão relacionadas a todo estudo que envolve os seres vivos, sejam eles micro-organismos, animais ou vegetais, bem como a maneira com que estes seres se relacionam entre si e com o ambiente. Quando se fala em Ciências da Saúde faz-se menção a toda área e estudo relacionada a vida, saúde e doença. Neste sentido, fazem parte das Ciências Biológicas e Saúde áreas como Biologia, Biomedicina, Ciências do Esporte, Educação Física, Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia, Fonoaudiologia, Medicina, Medicina Veterinária, Nutrição, Odontologia, Saúde Coletiva, Terapia Ocupacional, Zootecnia, entre outras.

A preservação do meio ambiente, a manutenção da vida e a saúde dos indivíduos é foco principal dos estudos relacionados as Ciências Biológicas, onde pode-se navegar por um campo bem abrangente de pesquisas que vai desde aspectos moleculares da composição química dos organismos vivos até termos médicos utilizados para compreensão de determinadas patologias.

Neste ebook é possível observar essa grande diversidade que envolve os aspectos da vida. A preocupação de profissionais e pesquisadores das grandes academias em investigar formas de viver em equilíbrio com o meio ambiente, bem como aproveitando da melhor forma possível os benefícios ofertados pelos seres vivos.

Inicialmente são apresentados artigos que discutem os cuidados de enfermagem com os seres humanos, desde acidentes com animais peçonhentos, cuidados com a dengue, preenchimento de prontuários, cuidados com a higiene, atendimento de urgência e emergência e primeiros socorros, doenças sexualmente transmissíveis e hemodiálise.

Em seguida são apresentados alguns estudos relacionados a intoxicação com drogas e álcool, bem como aspectos envolvendo a farmacologia. Caracterização bioquímica de enzimas e sua relação com infarto, insegurança alimentar e obesidade infantil.

Ainda podem ser observados artigos que relatam sobre aspectos antimicrobianos e antioxidantes de vegetais e micro-organismos. Presença de fungos plantas. Caracterização do solo e frutas. Doenças em plantas. E para terminar, você irá observar algumas discussões envolvendo a fisioterapia no desenvolvimento motor de crianças, os benefícios da caminhada, além de tratamentos estéticos para o controle de estrias.

Christiane Trevisan Slivinski

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
O IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA SEGURANÇA ALIMENTAR	
<i>Jakeline Luiz Corrêa</i>	
<i>Isabella Letícia Esteves Barros</i>	
<i>Flávia Franco Veiga</i>	
<i>Amanda Milene Malacrida</i>	
<i>Victor Hugo Cortez Dias</i>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>7</b>
ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA NO PREPARO DE MEDICAMENTOS E/OU COSMÉTICOS	
<i>Helena Teru Takahashi Mizuta</i>	
<i>Keitia Couto dos Santos</i>	
<i>Josueli Camila Timbola</i>	
<i>Rodrigo Hinojosa Valdez</i>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>15</b>
ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BASES GALÊNICAS DE DUAS FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	
<i>Helena Teru Takahashi Mizuta</i>	
<i>Keitia Couto dos Santos</i>	
<i>Josueli Camila Timbola</i>	
<i>Rodrigo Hinojosa Valdez</i>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>21</b>
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DOS EXTRATOS DE PELARGONIUM GRAVEOLENS L'HÉR. SOBRE BACTÉRIAS CAUSADORAS DA ACNE VULGAR	
<i>Jéssica Camile Favarin</i>	
<i>Marivane Lemos</i>	
<i>Juliângela Mariane Schröder Ribeiro dos Santos</i>	
<i>Talíze Foppa</i>	
<i>Zípora Morgana Quintero dos Santos</i>	
<i>Vilmair Zancanaro</i>	
<i>Emyr Hiago Bellaver</i>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>34</b>
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SORGO	
<i>Micaeli Silva Belgamazzi</i>	
<i>Larissa Tombini</i>	
<i>Letycia Lopes Ricardo</i>	
<i>Ricardo Andreola</i>	
<i>Graciene de Souza Bido</i>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>42</b>
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA EM XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI	
<i>Gabrielle Vieira</i>	
<i>Juliano Henrique Ferrarezi</i>	
<i>Daiane Cristina Sass</i>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>53</b>
ENDOPHYTIC FUNGI OF ARISTOLOCHIA TRIANGULARIS CHAM.: A MOLECULAR OVERVIEW	
<i>Andressa Katiski da Costa Stuart</i>	
<i>Rodrigo Makowiecky Stuart</i>	
<i>Ida Chapaval Pimentel</i>	

**CAPÍTULO 8 ..... 58**

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

*Rebeca Rocha Silva*  
*Valdiele de Jesus Salgado*  
*Tatiana Reis dos Santos Bastos*  
*Pâmela Beatriz Lima Oliveira*  
*Bruna Luiza Bedoni Italiano*  
*Gabriele Marisco da Silva*

**CAPÍTULO 9 ..... 69**

PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA AVIÁRIA MULTIRRESISTENTE ISOLADAS DE COLIBACILOSE EM AVESTRUZ

*Angela Hitomi Kimura*  
*Vanessa Lumi Koga*  
*Benito Guimarães de Brito*  
*Kelly Cristina Taglieri de Brito*  
*Gerson Nakazato*  
*Renata Katsuko Takayama Kobayashi*

**CAPÍTULO 10 ..... 80**

VÍRUS RÁBICO EM CÃES DOMÉSTICOS E SUA TRANSMISSÃO PARA O SER HUMANO

*Aline Mendes Balieiro Diniz*  
*Denise Santos Abelha*  
*Márcio de Moraes Pereira Rosa*  
*Sabrina Guimaraes Silva*

**CAPÍTULO 11 ..... 94**

AValiação DA UTILIZAÇÃO DE ADUBAÇÕES NITROGENADAS NO CULTIVO DE HORTELÃ VISANDO O APERFEIÇOAMENTO DE SEU SISTEMA PRODUTIVO

*Kleber Lopes Longhini*  
*Anny Rosi Mannigel*  
*Rafael Egea Sanches*  
*Sonia Tomie Tanimoto*

**CAPÍTULO 12 ..... 103**

AValiação ESPAÇO-TEMPORAL DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SOLO ALUVIAL ÀS MARGENS DO RIO UVU, CURITIBA-PR

*Victoria Stadler Tasca Ribeiro*  
*Silvia Schmidlin Keil*

**CAPÍTULO 13 ..... 118**

COMPOSIÇÃO PROXIMAL, MINERAL E LIPÍDICA DE FRUTAS NATIVAS E EXÓTICAS

*Antonio Eduardo Nicácio*  
*Joana Schuelter Boeing*  
*Érica Oliveira Barizão*  
*Carina Alexandra Rodrigues*  
*Jesuí Vergílio Visentainer*  
*Liane Maldaner*

**CAPÍTULO 14 ..... 130**

DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A INSETOS COLETADOS EM CULTIVO DE MORANGUEIRO

*Carolina Gracia Poitevin*  
*Mariana Vieira Porsani*  
*Alex Sandro Poltronieri*  
*Maria Aparecida Cassilha Zawadneak*  
*Ida Chapaval Pimentel*

**CAPÍTULO 15..... 138**

COMPARAÇÃO ENTRE O TESTE DA CAMINHADA DE SEIS MINUTOS E O INCREMENTAL SHUTTLE WALK TEST SOB AS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

*Valmir Ferreira da Silva Júnior*

*Gabriel Martins de Araújo*

*Catharinne Angélica Carvalho de Farias*

*Francisco Assis Vieira Lima Júnior*

*Rodrigo Augusto Xavier de Sousa Barros*

*Rêncio Bento Florêncio*

**CAPÍTULO 16..... 152**

EFEITOS DA INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA NO DESEMPENHO MOTOR DE ESCOLARES COM DESORDEM COORDENATIVA DESENVOLVIMENTAL

*Kátia Gama de Barros Machado*

*Giovana Flávia Manzotti*

*Siméia Palácio Gaspar*

**CAPÍTULO 17 ..... 159**

O MICROAGULHAMENTO ASSOCIADO AO PEELING QUÍMICO NO TRATAMENTO DE ESTRIAS CORPORAIS

*Isabela Mascarenhas de Oliveira*

*Hevellyn Mayara Fernandes Pereira*

*Renata Cappellazzo*

**SOBRE A ORGANIZADORA ..... 169**

## O IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA SEGURANÇA ALIMENTAR

### Jakeline Luiz Corrêa

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – PR

### Isabella Letícia Esteves Barros

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – PR

### Flávia Franco Veiga

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – PR

### Amanda Milene Malacrida

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – PR

### Victor Hugo Cortez Dias

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – PR

**RESUMO:** As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, dentre as quais destacam-se as aflatoxinas e ocratoxinas, que apresentam alta toxicidade tanto em humanos quanto em animais, mesmo quando ingeridos ou inalados em pequenas quantidades. Sendo assim, o objetivo da presente pesquisa foi realizar um levantamento bibliográfico para evidenciar a importância dos fungos produtores de micotoxinas e seu impacto na segurança alimentar. A presença de micotoxinas nos alimentos representam um amplo espectro de malefícios, podendo inclusive levar ao

desenvolvimento de câncer e nefropatias nos casos de intoxicações crônicas. Os principais fatores que propiciam o desenvolvimento dos fungos e conseqüentemente a possibilidade de desenvolvimento de micotoxinas são as condições as quais os alimentos são submetidos, como: alta umidade relativa do ar, teor de água do substrato, temperatura e armazenamento. Ainda que a presença de fungos e micotoxinas em alimentos representam sérios riscos à saúde, grande parte da população desconhece tais perigos, logo, programas de monitoramento para manter os alimentos dentro dos limites legais são de extrema importância para a saúde pública, pois diminui os riscos da exposição humana aos fungos e micotoxinas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungos; Contaminação; Toxinas; Toxinfecção alimentar.

**ABSTRACT:** Mycotoxins are secondary metabolites produced by a variety of fungi, especially by species of the genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, such as aflatoxins and ochratoxins, which present high toxicity both in humans and in animals, even when ingested or inhaled in small quantities. Therefore, the aim of the present research was to carry out a bibliographic survey to highlight the importance of mycotoxin-producing fungi and their impact on food safety. The presence of mycotoxins in

food represent a wide spectrum of maladies, and may even lead to the development of cancer and nephropathies in cases of chronic intoxication. The main factors that favor the development of fungi and consequently the possibility of developing mycotoxins are the conditions under which food is submitted, such as: high relative humidity, substrate water content, temperature and storage. However the presence of fungi and mycotoxins in foods pose serious health risks, a large part of the population is unaware of these dangers, so monitoring programs to keep food within legal limits are extremely important for public health because it reduces the risks of human exposure to fungi and mycotoxins.

**KEYWORDS:** Fungi; Contamination; Toxins; Food poisoning.

## 1 | INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Caracterizam-se por sua alta toxicidade tanto em humanos quanto em animais, mesmo quando ingeridos ou inalados em pequenas quantidades (BENTO et. al, 2012; IMAMURA et. al, 2014). Podem estar presentes em vários produtos alimentícios e muitas vezes são deglutidos involuntariamente quando produtos de origem vegetal contaminados são consumidos. Nesses casos, raramente são encontradas em quantidades suficientes para constituir um verdadeiro risco para a saúde, destacando-se dentre as mais relevantes: as aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), fumonisinas (FUM), zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON) (PITT; HOCKING, 2009).

Por serem contaminantes naturais, não é possível eliminar as toxinas fúngicas completamente dos alimentos, entretanto a redução de seus níveis faz-se necessária para que não representem riscos para a saúde pública. Por isso, a maior parte dos países seguem legislações pertinentes, que estabelecem limites máximos para a presença e detecção de certas micotoxinas em alimentos (BENNETT; KLICH, 2003).

Em 2011 foi publicada uma nova Resolução pela ANVISA, RDC nº 07, a qual estabelece que alimentos comercializados no Brasil deverão respeitar o limite máximo de detecção para a presença de micotoxinas. Contrariamente a essa resolução, estudos comprovam que muitos alimentos, rações e outros apresentam níveis de contaminação superiores ao permitido por esta legislação, bem como pela internacional (BRASIL, 2011). O Brasil tem encontrado dificuldades para implementar tais leis para controle de micotoxinas em produtos, em virtude de sua grande extensão territorial e variação climática, os quais propiciam o crescimento de fungos (BRASIL, 2011; MARINS, 2014).

As intoxicações alimentares apresentam um amplo espectro de malefícios gerados por microrganismos infectantes, causando desde uma simples indisposição ou urticária, no caso de intoxicação aguda, até o possível desenvolvimento de

câncer e nefropatias, no caso de intoxicações crônicas. Sendo assim, devido às suas propriedades tóxicas e estabilidade ao tratamento térmico, a presença de micotoxinas nos alimentos pode ser considerada um problema mundial (OLIVEIRA et. al, 2015). Diante deste contexto, o objetivo deste estudo consiste na realização um levantamento bibliográfico para evidenciar a importância dos fungos produtores de micotoxinas e seu impacto na segurança alimentar.

## 2 | METODOLOGIA

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica da literatura nacional e internacional em plataforma, PUBMED, Google Acadêmico e Legislação. Considerou-se 13 artigos na busca da literatura, desde 2007 até 04 de outubro de 2016. Os termos utilizados para pesquisa no PUBMED foram “*mycotoxins; foodborne diseases; fungi*”, os filtros aplicados foram “*10 years; abstract; english*”, foram excluídos artigos de revisão e a partir de então foi possível recuperar 48 artigos, porém 3 foram condizentes e selecionados para o estudo. Já no Google Acadêmico, o termo utilizado foi “Micotoxinas em alimentos”, propiciando a seleção de 10 artigos de interesse.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que podem entrar na cadeia alimentar humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta (BENTO et al, 2012). A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, uma vez que as micotoxinas ainda permanecerão no produto final (MAZIERO; BERSOT, 2010). Exemplo disso é que pode-se encontrar micotoxinas o qual foi utilizado como matéria-prima (TROMBETE et.al, 2013). A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, alimento ou ração, torna-se contaminado por fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010). Este caso é comumente descrito em rações, grãos de milho, amendoins, arroz, entre outros (BENTO et. al, 2012; CARDOSO FILHO, 2013; IMAMURA et. al, 2014).

Fatores que propiciam o desenvolvimento de fungos e conseqüentemente a possibilidade de desenvolvimento de micotoxinas são as condições às quais os alimentos são submetidos, sendo as principais: alta umidade relativa do ar, teor de água do substrato e temperatura de armazenamento. Neste contexto, é importante destacar que a colonização alimentar por fungos produtores de micotoxinas pode ocorrer durante os períodos de pré-colheita, colheita ou armazenamento, e a contaminação com micotoxinas pode ocorrer simultaneamente com a colonização fúngica, ou em uma fase posterior (BENTO et.al, 2012; MARINGE, et. al 2016).

O teor de umidade tanto quanto a temperatura influenciam no crescimento de fungos toxigênicos em mercadorias armazenadas, promovendo a produção de micotoxinas. No entanto, em estudo realizado por Taye et al, (2016), não houve correlação clara entre a temperatura, umidade relativa e armazenamento com a produção de micotoxinas, considerando que além das variações climáticas, a contaminação por toxinas pode ser atribuída também à variação genotípica dos fungos.

É possível perceber que dentre os fungos produtores de micotoxinas, os mais encontrados em alimentos são dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (BENTO et.al, 2012; MARQUES et.al, 2009) e observa-se também que estes se comportam de maneira diferenciada quando expostos a determinadas condições, por exemplo umidade nos grãos de milho. Entretanto a organização climática da colheita, seguida da secagem imediata das sementes pode assegurar a qualidade sanitária do produto e reduzir a probabilidade de contaminação fúngica e produção de toxinas (MARQUES et.al, 2009).

Existem diversos tipos de micotoxinas, e dentre elas destacam-se aflatoxinas e ocratoxinas. A ocratoxina A é comumente encontrada em uvas, o que destaca o cuidado com o consumo direto dessa fruta, entretanto de acordo com o estudo realizado por Hoeltz et. al (2012) há uma baixa ocorrência dessa micotoxina nas amostras de vinhos analisadas, garantindo a qualidade dessa bebida e a saúde de seus consumidores. Em outra pesquisa realizada por Franco et. al (2014), foi possível detectar a presença de ocratoxina A em quatro de vinte amostras de café, por meio da técnica de enzimaímunoensaio (ELISA), destas apenas três encontraram-se acima dos limites máximos permitidos pela União Europeia, que é 5 µg/kg. Gherbawy et. al (2012), analisou tâmaras da Arábia Saudita e, ainda que em uma pequena amostra, também detectou presença de ocratoxina. Sendo assim, com estes estudos nota-se baixos níveis dessa micotoxina nos alimentos, garantindo a qualidade dos produtos e a saúde da população consumidora.

As aflatoxinas são comumente encontradas em diversos grãos, tendo destaque no amendoim. Quando comparando a presença dessa micotoxina em safras de amendoim de anos diferentes, Imamura et. al (2014) notou que não houve diferença significativa quanto a sua detecção. Cardoso Filho et. al (2013), analisou amostras de ração de peixe e detectou elevada presença de *Aspergillus flavus*, entretanto as cepas encontradas não eram produtoras de aflatoxinas, ou seja, a presença do fungo no alimento não necessariamente indica a presença de micotoxinas.

Franco et. al (2014) e Santos et. al (2014) avaliaram a presença de aflatoxinas em café e leite, respectivamente. Na análise do café, os níveis de aflatoxinas encontradas estavam abaixo do permitido pela União Europeia, e na do leite não houve detecção em nenhuma amostra, conseqüentemente, concluíram que os produtos apresentavam boas condições para o comércio e consumo. Diferente disso, Maringe et. al (2016) ao estudar alimentos produzidos por pequenos agricultores detectou altos níveis dessa micotoxina em leguminosas no período de pós-colheita. O mesmo ocorreu

com Gherbawy et. al (2012) quando estudou toxinas em tâmaras na Arábia Saudita, notando a necessidade de auxiliar esses agricultores a desenvolver estratégias de controle de colheita para reduzir a contaminação de aflatoxinas em alimentos.

A partir dessas informações, evidencia-se que os níveis de contaminação alimentar por estas micotoxinas devem ser baixos. Para isso, o controle de qualidade dos insumos, desenvolvimento de estratégias de controle de contaminação e produção de micotoxinas, além de ações governamentais na avaliação da qualidade destes produtos são indispensáveis para evitar riscos à saúde do consumidor e prejuízos econômicos. (SILVA et.al, 2013).

## 4 | CONCLUSÃO

Conclui-se que a presença de fungos e micotoxinas em alimentos representam sérios riscos à saúde, ainda assim, grande parte da população desconheça a natureza patogênica desse, o que é altamente prejudicial ao organismo humano e animal. Sendo assim, programas de monitoramento para manter os alimentos dentro dos limites legais são de extrema importância para a saúde pública e representam uma ferramenta fundamental para fornecer subsídios e informações aos órgãos do governo e setores envolvidos na implantação de ações corretivas, a fim de diminuir os riscos da exposição humana aos fungos e micotoxinas.

## REFERÊNCIAS

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**. v.16, p. 497-516, 2003.

BENTO, L.F.; CANEPPELE, M.A.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C. ANDRADE, P.J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44 - 49, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p. 72, fev. 2011.

CARDOSO FILHO, F.C.; CALVET, R.M.; ROSA, C.A.R.; PEREIRA, M.M.G.; COSTA, A.P.R.; MURATORI, M.C.S. Monitoramento de fungos toxigênicos e Aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciênc Anim bras**, v.14, n.3, p. 305-311, jul./set. 2013

FRANCO, H.; VEGA, A.; REYES, S; DE LEÓN, J.; BONILLA, A. Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**,v. 64, n.1, p. 42 - 49, 2014.

GHERBAWY, Y.A.; ELHARIRY, H.M.; BAHOBIAL, A.A.S. Mycobiota and Mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxin) Associated with Some Saudi Date Palm Fruits. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 9, n. 6, 2012.

HOELTZ, M.; MONEZZI, L.P.; MANFROI, V.; NOLL, I.B.; DOTTORI, H.A. Ocratoxina A: análise da qualidade de vinhos brasileiros e importados. **Braz J Food Technol**, IV SSA, 2012.

IMAMURA, K.B.; TONI, J.C.V.; BOCCHÉ, M.A.L.; SOUZA, D.A.; GIANNONI, J.A. Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 73, n. 2, p. 178 - 187, 2014.

MARINGE, D.T.; CHIDEWE, C.; BENHURA, M.A. MVUMI, B.M. MURASHIKI, T.C.; DEMBEDZA, M. P.; SIZIBA, L.; NYANGA, L.K. Natural postharvest aflatoxin occurrence in food legumes in the smallholder farming sector of Zimbabwe. **Food additives & contaminants: part b**, 2016, DOI: 10.1080/19393210.2016.1240245

MARINS, B.R.; TANCREDI, R.C.P.; GEMAL, A.L. Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: Reflexões e práticas. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2014.

MARQUES, O.J.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; PRICINOTTO, L.F.; MACHINSKI, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Sci Agron**, v. 31, n. 4, p. 667 - 675, 2009.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. DOS S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Rev Bras Prod Agroind**, vol. 12, n. 1, p. 89 - 99, 2010.

OLIVEIRA, F.; FRANÇA, P.M.; PIEROZAN, M.K.; OLIVEIRA, D.S.; RIBEIRO, T.; ALMEIDA, M.A.; FACCHIN, A. Principais micotoxinas que afetam a produção de alimentos. **RAMVI - Getúlio Vargas**. v. 02, n. 03, 2015.

PITT, J. I. HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3ª edição. Springer, New York, USA. 2009.

SANTOS, L.; BANDO, A.; MACHINSKI, M.J. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, 2014.

SILVA, R.A.; YAMAMOTO, I.T.; FERREIRA, L.O.; MARQUES, L.R.M. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília – SP, 2002 - 2009. **Alim Nutr = Braz J of Food Nutr**, v. 24, n. 1, p. 61-64, 2013.

TAYE, W.; AYALEW, A. CHALA, A.; DEJENE, M. Aflatoxin B1 and total fumonisin contamination and the producing fungi in fresh and stored sorghum grain in East Hararghe, Ethiopia. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 2016.

TROMBETE, F.M.; FRAGA, M.E.; SALDANHA, T. Contaminação de queijos por aflatoxina m1: uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Rev Inst Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.

## ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA NO PREPARO DE MEDICAMENTOS E/OU COSMÉTICOS

### **Helena Teru Takahashi Mizuta**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Keitia Couto dos Santos**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Josueli Camila Timbola**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Rodrigo Hinojosa Valdez**

Instituto Federal do Paraná  
Cascavel – Paraná

**RESUMO:** De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, cosméticos são preparações que consistem em substâncias naturais ou sintéticas, para uso externo em diferentes partes do corpo humano, com a finalidade de limpá-las, perfumar, mudar sua aparência e/ou corrigir odores corporais, proteger ou mantê-los saudáveis. Entre os vários testes de controle de qualidade, é realizada a análise microbiológica da água utilizada na fabricação desses produtos. Neste trabalho foram analisadas seis amostras de água potável e vinte e três de água purificada. Destas, quinze foram purificadas por osmose reversa e oito por troca iônica, no período de julho/2015 a maio/ 2016, coletadas de uma indústria de cosméticos e de duas farmácias

de manipulação localizada na Região Oeste do Paraná. Coliformes Totais e Termotolerantes foram contados para a determinação do número mais provável (NMP), pelo método de tubos múltiplos nas amostras de água potável, e a contagem de bactérias mesofílicas em água destilada e deionizada, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (2010). As amostras de água potável apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que estavam de acordo com os parâmetros microbiológicos estabelecidos e por apresentarem potabilidade, ou seja, ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL de água, ou seja inferior a 100 CFU/mL. No entanto, as amostras de água deionizada apresentaram resultados insatisfatórios, pois apresentaram um número de bactérias mesófilas variando de  $1,58 \times 10^2$  a  $8,21 \times 10^3$  UFC / mL, portanto, estavam acima do máximo recomendado pela Farmacopéia Brasileira (2010). As oito amostras de água purificada por deionização apresentaram resultados não-conformes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Saúde Pública, Contaminação, Microbiologia.

**ABSTRACT:** According to the National Agency of Sanitary Surveillance cosmetics are preparations consisting of natural or synthetic substances, to external use in different parts of the human body, with the purpose of cleaning

them, perfuming them, changing their appearance and or correcting body odors and or protecting or keep them healthy. Among the several quality control tests, microbiological analysis of the water used in the manufacture of these products is carried out. In this study six samples of potable water and twenty-three samples of purified water, from July / 2015 to May / 2016, harvested from a cosmetics industry and two compounding pharmacies located in the Western region of Paraná. Total and Thermotolerant Coliforms were counted for the determination of the most probable number (MPN), by the multiple tubes method in the potable water samples, and the Count of Mesophilic Bacteria in distilled and deionized water, as recommended by the Brazilian Pharmacopoeia (2010). The distilled water samples presented satisfactory results, once they were in agreement with the established microbiological parameters and because they presented potability, that is, absence of total and thermotolerant coliforms in 100 mL of water. However, the samples of purified deionized water presented unsatisfactory results because they had a number of mesophilic bacteria ranging from  $1.58 \times 10^2$  to  $8.21 \times 10^3$  CFU / mL, therefore, they were above the maximum recommended by the Brazilian Pharmacopoeia (2010). The eight samples of purified water by ion exchange presented nonconforming results.

**KEYWORDS:** Public Health, Contamination, Microbiology.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os produtos cosméticos são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano que têm o objetivo exclusivo ou principal de limpar, perfumar, alterar aparência, corrigir odores corporais e/ou proteger (BRASIL, 2015). Cosméticos são usados desde a antiguidade e, inicialmente as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais. No entanto, o avanço da tecnologia resultou na inclusão de muitas substâncias químicas sintéticas na formulação desses produtos. Atualmente, a variedade de produtos com diferentes finalidades de uso, principalmente produtos de higiene, é ampla e atinge um grupo populacional cada vez maior (LEONARDI, 2004).

A qualidade de um produto ou serviço ajuda a orientar, com eficácia, qualquer empresa que objetive crescimento de mercado e lucratividade, pois é um modo de gerenciar organizações, melhorando os negócios e as atividades técnicas. A eficiência das empresas nos negócios depende de seus produtos ou serviços, que devem ser confiáveis e consistentes (BORTOLOTTI; De SOUSA; De SOUSA JUNIOR, 2009). Sendo assim, os fabricantes de produtos cosméticos e de medicamentos vêm se preocupando com a contaminação e qualidade microbiológica (FIORENTINO et al., 2008), pois pode constituir risco para a saúde do consumidor, principalmente em se tratando de micro-organismos patogênicos (SOUZA, et al., 1994).

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de cosméticos exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas para evitar e prevenir os riscos na qualidade

e segurança dos produtos (YAMAMOTO et al., 2004). Para garantir que a qualidade final do produto ou a segurança do paciente não seja comprometida, é necessário um controle de qualidade onde a carga microbiológica seja identificada e quantificada (PINTO et al., 2010).

Atualmente, o controle microbiológico não é somente associado a produtos estéreis, pois se verificou a necessidade de realizá-lo em produtos não-estéreis (BUGNO; BUZZO; PEREIRA, 2003). A carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto, degradar o princípio ativo ou alterar o pH, o que pode resultar em faixas de coloração distintas do corante ou precipitações; produção de gases, provocando odor desagradável; ação enzimática promovendo degradação de tensoativos ou macromoléculas, levando à quebra de emulsões ou alterações da viscosidade de géis (PINTO et al., 2010).

Matérias-primas utilizadas na produção de medicamentos e/ou cosméticos podem tornar-se substrato para o crescimento microbiano, uma vez que podem ser utilizadas como fonte de carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, sais orgânicos, água, entre outros (PINTO et al., 2010). As matérias-primas podem ser de origem natural ou sintética, as de origem natural favorecem o desenvolvimento dos micro-organismos devido à capacidade de reter água (SILVA; SILVA, 2017).

A Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 48, de 25 de outubro de 2013, que aprova o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, define contaminação como sendo a introdução indesejada de impurezas de natureza física, química e/ou microbiológica na matéria-prima, material de embalagem/envase, produto intermediário, e/ou produto acabado durante a fabricação, estabelecendo o controle de qualidade para os produtos que tenham uma especificação microbiológica, em que a contagem total de micro-organismos deve estar em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2013).

Já a RDC nº 481 de 23 de setembro de 1999, estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Para produtos susceptíveis à contaminação microbiológica, o número de micro-organismos mesófilos aeróbios totais, não poderá estar acima de  $5,00 \times 10^3$  UFC/g ou mL. Também são exigidos: Ausência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *coliformes totais e fecais* em 1g ou mL e ausência de *Clostrídios* sulfito redutores em 1 g (exclusivamente para talcos) (BRASIL, 1999).

O armazenamento em condições adequadas é muito importante, pois minimiza a ocorrência de alterações no produto. Assim, é importante que o número de micro-organismos encontrados seja o menor possível, uma vez que, se as condições ambientais forem adequadas, eles podem se multiplicar e, posteriormente, causar alterações nas propriedades organolépticas, perda de estabilidade e a atividade do princípio ativo (DE LA ROSA; DEL ROSARIO; VIVAR, 1995).

A água provavelmente seja o principal insumo utilizado em indústrias de cosméticos e farmácias de manipulação. Para contribuir com uma reduzida

carga microbiana nos produtos cosméticos, a empresa deve definir claramente as especificações físico-químicas e microbiológicas da água utilizada na fabricação dos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, devendo atender no mínimo aos padrões microbiológicos de potabilidade. Somente a água dentro das especificações estabelecidas deve ser utilizada na fabricação dos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (BRASIL, 2013).

A água potável fornecida pelo abastecimento urbano apresenta moléculas orgânicas, íons inorgânicos, partículas, coloides, gases e bactérias (MENDES, et al., 2011) sendo assim, só pode ser usada na produção de cosméticos após passar pelo processo de purificação. A água purificada é obtida por uma combinação de sistemas de purificação, tais como múltipla destilação; troca iônica; osmose reversa; eletrodeionização; ultrafiltração, ou outro processo capaz de atender, com a eficiência desejada, aos limites especificados para os diversos contaminantes.

Segundo a Portaria do Ministério da Saúde N° 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, o conceito legal de água potável é "...que atenda ao padrão de potabilidade estabelecido nesta Portaria e que não ofereça riscos à saúde humana". Já o padrão de potabilidade é "o conjunto de valores permitidos como parâmetro da qualidade da água para consumo humano, conforme definido nesta Portaria...". (BRASIL, 2011).

Usualmente, as indústrias de cosméticos obtêm a água pura para seus processos de fabricação de diferentes maneiras, pode-se citar: a água deionizada, em que o processo de deionização geralmente é feito em coluna de troca iônica. Nestas colunas, há microesferas que ao entrarem em contato com a água, liberam íons de hidrogênio ( $H^+$ ), resina catiônica e hidroxilas ( $OH^-$ ), resina aniônica, ligados de forma instável, pelos íons mais carregados presentes na água, como íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ), íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) que se unem com mais firmeza às resinas. Resultando como consequência na remoção dos cátions e ânions dissociados na água. A água destilada é um processo bem conhecido e amplamente utilizado, e consiste em mudanças de fase da água por aquecimento, onde a partir de seu estado líquido a água é aquecida a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  evaporando e resfria ocorrendo uma condensação, tornando-a líquida novamente. Isso permite eliminar os contaminantes biológicos. A água obtida por osmose reversa ocorre de modo geral pela passagem através de membranas semipermeáveis, por meio de uma pressão gerada por bomba mecânica a água atravessa e é removido o material particulado, micro-organismos, material insolúvel e materiais orgânicos e inorgânicos em geral, é considerado atualmente o mais eficiente e talvez o mais utilizado (MENDES et al., 2011).

É importante verificar a condição de armazenamento da água imediatamente após a saída do destilador, pois, esta é uma etapa crítica para a contaminação da água após o processo de purificação.

Para o setor produtivo também é importante a questão dos custos. Nesse sentido,

cabe ao profissional responsável técnico pela instituição avaliar a relação custo/benefício de cada método, definindo o volume de água utilizado nas preparações.

Como descrito acima, o uso da água por indústrias de cosméticos e farmácias de manipulação exige cuidados de forma a evitar a contaminação química e microbiológica. Segundo a Farmacopéia Brasileira, os parâmetros microbiológicos críticos sugeridos são: Contagem total de bactérias < 100 UFC/mL e ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e outros patogênicos (BRASIL, 2010).

O presente trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica de água potável e purificada, de uma indústria de cosméticos e de duas farmácias de manipulação da região Oeste do Paraná. Estes resultados servirão de subsídios para a melhoria contínua destas empresas, prevenindo prejuízos e garantindo a satisfação e segurança dos consumidores.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostragem**

Foram analisadas seis amostras de água potável e vinte e três de água purificada. Destas, quinze foram purificadas por osmose reversa e oito por troca iônica, no período de julho/2015 a maio/2016, coletadas de uma indústria de cosméticos e de duas farmácias de manipulação localizadas na Região Oeste do Paraná. Foi realizada a contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes para a determinação do número mais provável (NMP), pelo método dos tubos múltiplos nas amostras de água potável, e a Contagem de Bactérias Mesófilas em água potável e purificada, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

### **2.2 Análise Microbiológica da Água Potável**

As amostras foram coletadas ao longo do período de junho/2015 a julho/2016. No mínimo 200 mL de amostra foi coletada em frascos previamente esterilizados. A desinfecção das torneiras dos pontos de coleta foi realizada com solução de álcool a 70%, por meio de pulverização por dentro e por fora e deixando-se a água escorrer por alguns minutos. As amostras de água potável foram submetidas às análises: Contagem Total de Bactérias Mesófilas e Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes conforme descritos abaixo.

### **2.3 Contagem de Bactérias Mesófilas**

Foram transferidos 10 mL de amostra para 90 mL de solução salina a 0,9%. Foram preparadas mais duas diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente. Foram adicionados 1 mL das diluições em Placa de Petri e então vertidos 15 mL de

Agar Caseína Soja mantidos a 45-50 °C. Foram utilizadas duas placas para cada diluição. As placas foram então incubadas a 35-37 °C por 24-48 horas (BRASIL, 2010).

## 2.4 Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes

A determinação do número mais provável de coliformes pelo método dos tubos múltiplos foi realizada utilizando caldo Lauril Sulfato de Sódio (CLS) com tubos de Durham invertidos. A primeira série de tubos contendo 10 mL de CLS em concentração dupla, na segunda série, 9 mL e na terceira, 9,9 mL e adicionados 10; 1,0 e 0,1 mL de amostra, respectivamente. Os tubos foram incubados a 35-37 °C durante 24 e 48 h. Para a determinação de coliformes termotolerantes, uma alçada de cada tubo de CLS que apresentar crescimento e produção de gás são semeados em tubos contendo 10 mL de *Escherichia coli* (EC), com tubos de Durham invertidos. Estes forma incubados por 24 e 48 h a 45°C em banho-maria. A formação de gás nos tubos de CLS indica a presença de coliformes totais, sendo o resultado expresso em NMP de coliformes totais por mL de água. Os tubos positivos em caldo EC indicam a presença de coliformes termotolerantes. Para contagem de *E. coli*, os tubos de caldo EC com crescimento e gás foram repicados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (BEM) e incubadas a 35°C. Após 24 h, colônias negras com ou sem brilho metálico, suspeitas de serem *E. coli*, foram identificadas bioquimicamente. As placas de EMB positivas para *E. coli*, correspondentes aos tubos de EC positivos com gás, foram consideradas para o cálculo de *E. coli* por mL de água (APHA, 2005).

## 2.5 Análise Microbiológica da Água Purificada

Esta análise foi realizada mensalmente e as amostras foram coletadas logo após o processo de purificação. Foram coletadas no mínimo 200 mL de amostra em frascos estéreis. As amostras foram submetidas à contagem de bactérias mesófilas conforme já descrito.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de água potável apresentaram resultados satisfatórios, por estarem de acordo com os parâmetros microbiológicos estabelecidos e por apresentarem padrão de potabilidade, ou seja, ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL de água. As quinze amostras de água purificada por osmose reversa apresentaram resultados satisfatórios, sendo que os valores encontrados foram inferiores a 10,0 UFC/mL. Porém as oito amostras de água purificada deionizada apresentaram resultados insatisfatórios por apresentarem número de bactérias mesófilas entre  $1,58 \times 10^2$  á  $8,21 \times 10^3$  UFC/mL, portanto, estavam acima do limite máximo preconizado pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL,

2010) cuja contagem total de bactérias deve ser inferior à 100 UFC/mL. Quando os resultados indicavam condições não-adequadas para o uso, a empresa de onde foi feita a coleta da amostra era imediatamente informada para que as ações corretivas fossem aplicadas, corrigindo-se o desvio, além de a água não ser empregada nas preparações até que o problema da contaminação microbiana fosse resolvido.

## 4 | CONCLUSÃO

As oito amostras de água purificada por troca iônica utilizada pela indústria de cosméticos não estavam de acordo com os parâmetros microbiológicos, porém as demais amostras de água analisadas apresentaram resultados satisfatórios. As análises microbiológicas realizadas auxiliaram tanto a indústria quanto as farmácias de manipulação na melhoria contínua das etapas de produção, prevenindo prejuízos financeiros, como também colaborando com a saúde e satisfação de seus clientes. Os resultados são similares aos encontrados no estudo de Valentini e Vieira (2017).

Vale ressaltar que estudos adicionais e complementares são necessários para estudar mais este importante tema.

## REFERÊNCIAS

APHA, Water Environmental et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2005.**

BORTOLOTTI, S.L.V.; De SOUSA, R.A.; De SOUSA JUNIOR, A.F. **Análise da qualidade do produto final no processo de envase de azeitonas verdes.** In Anais do V Congresso Nacional de Excelência em Gestão - Gestão do conhecimento para a sustentabilidade. 2009. Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. 16 páginas.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 07 de 10 de fevereiro de 2015. **Dispõe sobre os requisitos técnicos para regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume e dá outras providências.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 48 de 25 outubro de 2013. **Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, e dá outras providências.** Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

**Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira.** 5. ed, Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 481 de 23 de setembro de 1999. **Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme anexo**

**dessa Resolução.** Brasília: Ministério da Saúde, 1999.

BUGNO, Adriana; BUZZO, Adriana Aparecida; PEREIRA, Tatiana Caldas. **Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, n. 3, p. 335-340, 2003.

DE LA ROSA, María del Carmen; DEL ROSARIO, María Medina; VIVAR, Carmen. **Microbiological quality of pharmaceutical raw materials.** Pharmaceutica Acta Helvetiae, v. 70, n. 3, p. 227-232, 1995.

FIORENTINO, F.A.M. et al. **Análise Microbiológica de Embalagens para o Acondicionamento de Medicamentos e Cosméticos.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, n. 5, p. 757-61, Buenos Aires, 2008.

LEONARDI, Gislaine Ricci. **Cosmetologia aplicada.** 1º ed. São Paulo (SP): Medfarma, 2004. 75-101p.

MENDES, Maria Elizabete, et al. **A importância da qualidade da água reagente no laboratório clínico.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47, n. 3, p. 217-223, 2011.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, p.184-242. 2010.

SILVA, Maila Fernanda da; SILVA, Lisiane Lange da. **Análise microbiológica de três formulações magistrais.** Cadernos da Escola de Saúde, v. 2, n. 6, 2017.

SOUZA, Marcia Regina Spuri Espinelli Lemes, et al. **Contaminação microbiana em emulsões cosméticas para aplicação dérmica.** Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v. 30, n. 1, p. 23-8, 1994.

VALENTINI, Sérgio Alexandre; VIEIRA, Luana De Jesus. **QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA PURIFICADA DAS FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO DA CIDADE DE CAMPO MOURÃO.** Revista Iniziare, v. 2, n. 1, 2017.

YAMAMOTO, Célia Hitomi, et al.. **Controle de Qualidade Microbiológica de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG.** In Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, Belo Horizonte, Minas gerais, Brasil. 2004.

## ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BASES GALÊNICAS DE DUAS FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

### **Helena Teru Takahashi Mizuta**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Keitia Couto dos Santos**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Josueli Camila Timbola**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel – Paraná

### **Rodrigo Hinojosa Valdez**

Instituto Federal do Paraná  
Cascavel – Paraná

**RESUMO:** De acordo com as Boas Práticas de Manipulação em farmácias, os medicamentos não-estéreis e cosméticos devem possuir qualidade conforme especificações determinadas por códigos oficiais nacionais, visando à segurança e eficácia do seu uso. Os contaminantes microbianos em medicamentos e/ou cosméticos podem resultar em alterações físico-químicas, além de poder influenciar na ação terapêutica, bem como a aceitação do mesmo pelo consumidor. O presente trabalho teve como objetivo realizar análises microbiológicas para verificar a qualidade de bases galênicas preparadas por duas farmácias de manipulação do município de Cascavel, uma localizada no centro e a outra na periferia do município. Foram coletadas dezoito

amostras contendo aproximadamente 30 g, entre o período de agosto/2015 a junho/2016. As análises microbiológicas consistiram em: Contagem Total de Bactérias Mesófilas e de Bolores e Leveduras e na pesquisa de microorganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* conforme descrito por Carturan e Hansen (2014). Das dezoito amostras analisadas, todas encontravam-se dentro dos limites da Farmacopeia Brasileira (2010) na qual determina: Até  $2,00 \times 10^3$  UFC/g para bactérias mesófilas e até  $2,0 \times 10^2$  UFC/g para bolores e leveduras. Os resultados encontrados tanto para bactérias mesófilas quanto para bolores e leveduras variaram entre  $< 30$  e  $6,00 \times 10^1$  UFC/g. Em relação à pesquisa de microorganismos patogênicos, estes não foram encontrados nas amostras analisadas. Os resultados obtidos foram satisfatórios para ambas as farmácias. Estas avaliações microbiológicas são de suma importância, pois indicam parâmetros quanto à qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos, garantindo assim a eficácia e segurança no uso pelos consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle de qualidade microbiológico, farmácia de manipulação, bases galênicas

**ABSTRACT:** According to the Good Practices

of Handling in pharmacies, non-sterile and cosmetic medicines must have quality according to specifications determined by official national codes, aiming at the safety and effectiveness of their use. Microbial contaminants in medicines and / or cosmetics can result in physico-chemical alterations, in addition to being able to influence in the therapeutic action, as well as the acceptance of the same by the consumer. The present work had as objective to carry out microbiological analyzes to verify the quality of galenic bases prepared by two pharmacies of manipulation of the municipality of Cascavel, one located in the center and the other in the periphery of the municipality. Eighteen samples containing approximately 30 g were collected between August / 2015 and June / 2016. Microbiological analyzes consisted of: Total Count of Mesophilic Bacteria and Mold and Yeast and in the research of pathogenic microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as described by Carturan and Hansen (2014). From the eighteen analyzed samples, all were within the limits of the Brazilian Pharmacopoeia (2010) in which it determines: Up to  $2.00 \times 10^3$  CFU/g for mesophilic bacteria and up to  $2.0 \times 10^2$  CFU/g for molds and yeasts. The results found for both mesophilic bacteria and for molds and yeasts ranged from  $> 30$  to  $6.00 \times 10^1$  CFU/g. Regarding the research of pathogenic microorganisms, these were not found in the analyzed samples. The results obtained were satisfactory for both pharmacies. These microbiological evaluations are of paramount importance, as they indicate parameters regarding the microbiological quality of pharmaceutical products, thus guaranteeing the efficacy and safety in the use by the consumers.

**KEYWORDS:** Microbiological Quality Control; pharmacy of manipulation; galenic bases

## 1 | INTRODUÇÃO

De acordo com a legislação nacional atual, considera-se como base galênica: "Preparação composta de uma ou mais matérias-primas, com fórmula definida, destinada a ser utilizada como veículo/excipiente de preparações farmacêuticas " (BRASIL, 2013); ou ainda são considerados como "veículos de natureza líquida ou semissólida destinados à incorporação de substâncias ativas" (BRASIL, 2012).

A farmácia magistral é considerada como um importante segmento do mercado brasileiro de medicamentos (BONFILIO et al., 2010). A vantagem de se adquirir produtos manipulados seria o custo bem menor quando comparado ao industrializado, porém, deve-se garantir sua qualidade microbiológica para que o consumo ocorra de forma segura (CARVALHO ; MARTINI; MICHELIN, 2011)

A Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº. 67, de 8 de outubro de 2007 estabelece as Boas Práticas de Manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias desde a manipulação, conservação e dispensação de preparações magistrais e oficinais, bem como para aquisição de matérias-primas e materiais de embalagem (BRASIL, 2007).

A adesão dos funcionários da farmácia magistral, às Boas Práticas de Manipulação,

juntamente com as especificações das matérias-primas e caracterização do produto durante o desenvolvimento, são considerados como os três fatores-chave para garantir a qualidade dos medicamentos ou cosméticos (HIYAMA, 2010).

A farmácia deve assegurar a qualidade físico-química e microbiológica de todos os produtos que são, de alguma maneira, manuseados antes da sua dispensação. (BRASIL, 2007).

Os medicamentos e cosméticos constituem-se como fontes de nutrientes e condições que favorecem o crescimento microbiano. Produtos que apresentam um alto teor de água na sua constituição seriam os mais críticos, já que a contaminação poderá vir das diferentes etapas do preparo e/ou das matérias-primas. (LUCENA, 2014).

Os limites microbianos estabelecidos para as bases galênicas são: Até  $2,00 \times 10^3$  UFC/g para a contagem total de bactérias mesófilas, até  $2,00 \times 10^2$  UFC/g para a contagem de bolores e leveduras e ausência dos patógenos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* em 1 g ou 1 mL e ausência de *Salmonella* spp. em 10 g ou 10 mL (BRASIL, 2010).

As farmácias magistrais devem se preocupar com a qualidade dos produtos estéreis, uma vez que os desvios da qualidade podem ter como consequências prejuízo ao usuário, podendo desenvolver patologias severas, dependendo do seu estado imunológico (MOTA; OSHIRO JÚNIOR; CHIARI-ANDRÉO, 2012).

O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade microbiológica de amostras de bases galênicas manipuladas por duas diferentes farmácias magistrais do município de Cascavel, PR.

## 2 | MATERIAIS E METODOS

### 2.1 Coleta das Amostras de Bases Galênicas

No período de julho de 2016 a agosto de 2017, foram coletadas dezoito amostras de bases galênicas proveniente de duas farmácias de manipulação localizadas no município de Cascavel, Paraná. Uma delas se localizava no centro e a outra, na periferia da cidade.

### 2.2 Análises Microbiológicas de Bases Galênicas

Foram analisados um total de dezoito amostras de bases galênicas. Foram coletados 30 g de cada amostra em frascos estéreis. As análises microbiológicas consistiram em: Contagem de Bactérias Mesófilas, Bolores e Leveduras conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) e pesquisa de micro-organismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* conforme descritos por Carturan e Hansen (2008).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas bases galênicas: Contagem de bactérias mesófilas aeróbias, contagem de Bolores e Leveduras e pesquisa de bactérias patogênicas: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* estão descritas abaixo (tabela 1).

Os resultados da contagem de bactérias mesófilas variaram de  $< 30$  UFC/g a  $6,00 \times 10^1$  UFC/g e a contagem de bolores e leveduras, de  $< 30$  a  $1,00 \times 10^2$  UFC/g. A pesquisa de micro-organismos patogênicos indicou ausência de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* em 1 g de todas as bases galênicas analisadas. Estes resultados demonstraram que, pelos parâmetros microbiológicos analisados, os produtos encontravam-se dentro dos limites estabelecidos por órgãos oficiais.

As formas farmacêuticas sólidas apresentam baixa atividade de água, que não favorecem a proliferação microbiana (VO; LOU; KUPIEC, 2014). Por outro lado, os produtos líquidos e semi-sólidos, por exemplo, as bases galênicas, por terem maiores valores de atividade de água, são mais críticos em relação ao controle microbiológico. Porém, apesar disso, o presente estudo demonstrou que a qualidade microbiológica das bases galênicas encontravam-se dentro dos parâmetros preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes resultados indicam que, provavelmente, as duas farmácias com manipulação, das quais foram coletadas as amostras, vem cumprindo com as normas de boas práticas de manipulação de medicamentos e/ou cosméticos, pois, conforme Vo, Lou e Kupiec (2015) o controle da contaminação é uma atividade preventiva que envolve adesão consciente dos colaboradores às Boas Práticas de Manipulação.

Amostras	Contagem Total de Bactérias Mesófilas Aeróbias (UFC/g)	Contagem de Bolores e Leveduras (UFC/g)	Pesquisa de Bactérias Patogênicas* em 1 g
Base Xalifin 15	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Crema Base com Adipol e Celulol	$< 30$	$6,00 \times 10^1$	Ausentes
Base 25 Polawax não-iônica	$3,00 \times 10^1$	$< 30$	Ausentes
Base 29 não-iônica	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Crema Hidratante de Aveia	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Base Aristoflex Gel	$3,00 \times 10^1$	$< 30$	Ausentes
Pomada Lano Vaselina	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Gel Aristoflex 1%	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Sabonete Líquido cremoso	$< 30$	$3,00 \times 10^1$	Ausentes
Base Hostacerin Saf Gel Crema	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Base 29 Crema não Iônico Hidroquinona	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Base Carbopol	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Base 42 Natrozol 2%	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Base 25 CR não-iônico Polawax	$< 30$	$< 30$	Ausentes
Crema Hidratante de Aveia	$6,00 \times 10^1$	$< 30$	Ausentes
Base Aristoflex gel	$< 30$	$< 30$	Ausentes

Base 25 Polawax não-iônico	< 30	< 30	Ausentes
Base 29 não-iônica	< 30	1,00 x 10 <sup>2</sup>	Ausentes

**Tabela 1** – Resultados das análises microbiológicas das bases galênicas

\**S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*

Na literatura, encontram-se poucos trabalhos relacionados e com resultados inadequados quanto ao controle microbiológico, quando comparados com os resultados obtidos no presente trabalho.

Carvalho, Martini e Michelin (2011), após analisarem sete amostras de filtro solar em gel adquiridas de farmácias de manipulação do município de Araras, SP, observaram que aos menos uma das sete amostras analisadas foi reprovada, devido ao crescimento de micro-organismos totais ser superior ao limite permitido e por apresentar patógenos.

Ao analisar uma amostra de creme hidratante manipulada por três diferentes farmácias magistrais do município de Palmas, TO, Santos (2015) verificou que uma das amostras encontrava-se inadequada para o consumo por estar contaminada por mesófilos totais acima do estabelecido pela legislação.

Conforme descrito no Guia de Controle de Qualidade de Cosméticos (BRASIL, 2008), a verificação da qualidade microbiológica para determinar os pontos críticos de contaminação e estabelecer normas constitui-se em um dos atributos essenciais para o desempenho adequado, segurança, eficácia e aceitabilidade dos produtos cosméticos ou medicamentos. A legislação atual preconiza que a avaliação da qualidade microbiológica de bases galênicas seja realizada por meio de monitoramento mensal de ao menos uma base e por rodízio considerando-se base e manipulador e todos os tipos de base devem ser analisados anualmente (BRASIL, 2007).

Estudos posteriores devem ser realizados envolvendo principalmente as análises de controle de qualidade microbiológico de produtos líquidos e semi-sólidos, para monitorar a qualidade e garantir a eficácia e a segurança dos consumidores.

## 4 | CONCLUSÃO

Das dezoito amostras de bases galênicas coletadas de duas farmácias de manipulação do município de Cascavel, PR, todas apresentavam-se dentro dos parâmetros microbiológicos estabelecidos pelos códigos oficiais nacionais. Estes resultados indicam que as normas de Boas Práticas de Manipulação estão sendo cumpridas garantindo eficácia, segurança e aceitabilidade dos produtos pelos seus consumidores.

## REFERÊNCIAS

BONFILIO, R. et al.. Farmácia magistral: Sua importância e seu perfil de qualidade. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n.3, p.653-664, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC no. 18, de 03 de abril de 2013. **Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da farmacopéia brasileira**. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. 224p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed, Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. 2.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC no. 67, de 8 de outubro de 2007. **Dispõe sobre boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias**. Brasília: Anvisa, 2007.

CARTURAN, G.;HANSEN, J.A. . **Guia ABC – Controle microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes; Parâmetros, Metodologias Analíticas e Orientações**. 4.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia. 2014. 180p.

CARVALHO, L.L.; MARTINI, P.C.; MICHELIN, D.C.. Avaliação da qualidade microbiológica de filtros solares manipulados em forma de gel. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.92, n.4, p.314-317, 2011.

HIYAMA, Y..Pharmaceutical product quality control and good manufacturing practices. **Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku**. v.128, p.1-16, 2010.

LUCENA, Kaio Lopes de. **Qualidade microbiológica de formulações farmacêuticas de uma farmácia magistral no município de João Pessoa-PB**. Monografia (Graduação em Farmácia. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba, 2014.

MOTA, V.A.M.; OSHIRO JÚNIOR, J.A.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.. O controle da contaminação microbiológica de produtos magistrais. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v.20, n.1, p.33-48, 2017.

SANTOS, H'menon Dias dos. **Análise microbiológica de hidratantes manipulados em três farmácias magistrais de Palmas - TO**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro Universitário Luterano de Palmas.Palmas/TO, 2015.

VO, N.; LOU, J.R.; KUPIEC, T.C.. Quality control: Microbial limit tests for nonsterile pharmaceuticals, part 2. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.18, n.4, p.305-310, 2014.

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE *PELARGONIUM GRAVEOLENS L'HÉR.* SOBRE BACTÉRIAS CAUSADORAS DA ACNE VULGAR

### **Jéssica Camile Favarin**

Bacharel em Farmácia pela Universidade Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199. E-mail: je\_favarin@hotmail.com

### **Marivane Lemos**

Bacharel em Farmácia. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo. Departamento do Curso de Farmácia. Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199.

### **Juliângela Mariane**

#### **Schröder Ribeiro dos Santos**

Bacharel em Farmácia. Especialista em Farmacologia Básica e Clínica pela Universidade do Oeste de Santa Catarina. Departamento do Curso de Farmácia. Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199

### **Talize Foppa**

Bacharel em Farmácia. Mestre em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento do Curso de Farmácia. Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199

### **Zípora Morgana Quinteiro dos Santos**

Graduada em Estética e Cosmética. Mestre em Ciência e Biotecnologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina. Departamento de Estética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha – IFFar. RS 218 – Km 5

– Indubras, Santo Ângelo – RS. CEP 98806-700.

### **Vilmair Zancanaro**

Bacharel em Farmácia. Mestre em Ciência e Biotecnologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina. Departamento do Curso de Farmácia. Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199.

### **Emyr Hiago Bellaver**

Bacharel em Biomedicina. Mestre em Ciência e Biotecnologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina. Núcleo de Ciências da Saúde. Departamento do Curso de Farmácia. Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP. Rua Victor Baptista Adami, 800, Centro. Caçador- SC. CEP 89500-199.

**RESUMO:** A acne vulgar é uma doença dermatológica bastante comum, caracterizada por comedões abertos ou fechados e por pápulas inflamatórias, pústulas e nódulos, resultantes de processo inflamatório associado a processo infeccioso causado principalmente pelas bactérias *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. *Pelargonium graveolens* é conhecida popularmente como “malva” e possui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias descritas popularmente e reportadas na literatura. Este trabalho buscou avaliar a capacidade *in vitro* dos extratos de *P. graveolens* na inibição de bactérias causadoras

da acne vulgar, *P. acnes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Foram realizados extratos da planta em cinco solventes diferentes: etanol 100%, etanol 50%, etanol 70%, metanol 100% e acetona 100%. Os extratos foram dissolvidos em 25, 50 e 100µL em suspensão bacterianas em caldo nutriente e tríptico de soja 5%. Todas as amostras foram incubadas por um período de 24 a 48 horas e depois analisadas em espectrofotômetro na absorvância de 546nm. Através da análise em cromatografia de camada delgada foi possível observar a presença de terpenos, principal classe de metabólitos secundários ativos nessas plantas. Além disso, é possível observar a presença de outras substâncias no extrato acetônico, sugestivo de taninos, saponinas, glicosídeos e/ou antraquinonas. O extrato mais ativo é o acetônico, com inibição máxima de 27% para *S. aureus*, 56% para o *S. epidermidis* e 82% para o *P. acnes*, principal agente causal da acne vulgar. Estudos de químicos, de toxicidade e a segurança dessa planta são necessários para a confirmação das identidades químicas presentes e determinação da segurança no uso dermatológico do extrato de *P. graveolens*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pelargonium graveolens*. *Propionibacterium acnes*. *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus*. Acne vulgar.

**ABSTRACT:** *Acne vulgaris* is a common dermatological disease characterized by open or closed comedones and inflammatory papules, pustules and nodules, resulting from an inflammatory process associated with an infectious process caused mainly by the bacteria *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Pelargonium graveolens* is popularly known as “Rose Geranium” and it has antimicrobial and anti-inflammatory properties, popularly described and reported in the literature. This work aimed to evaluate the *in vitro* inhibition of acne vulgaris on *P. acnes*, *S. aureus* and *S. epidermidis*, by *P. graveolens* extracts. Extracts were made in five different solvents: 100% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol, 100% methanol and 100% acetone. Extracts were dissolved in 25, 50 and 100 µL in bacterial suspension in nutrient broth and 5% soybean triptych. All samples were incubated for a period of 24 to 48 hours and analyzed in a spectrophotometer at the absorbance of 546 nm. Through the analysis in thin layer chromatography it was possible to observe the presence of terpenes, major class of active secondary metabolites in these plants. In addition, it is possible to observe the presence of other substances in the acetone extract, suggestive of tannins, saponins, glycosides and / or anthraquinones. The most active extract is acetone, with a maximum inhibition of 27% for *S. aureus*, 56% for *S. epidermidis* and 82% for *P. acnes*, the main causative agent of acne vulgaris. Chemical, toxicity and safety studies of this plant are necessary for the confirmation of the chemical identities present and determination of the safety in the dermatological use of the extract of *P. graveolens*.

**KEYWORDS:** *Pelargonium graveolens*. *Propionibacterium acnes*. *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus*. Acne vulgaris.

## 1 | INTRODUÇÃO

A acne vulgar é uma patologia crônica muito comum que acomete a pele, principalmente de jovens e adultos, e por apresentar uma grande influência estética, aumenta a procura por diversos tratamentos (BHATE; WILLIAMS, 2013). A patologia cursa com o acometimento dos folículos pilosebáceos unicelulares, caracterizada por seborreia, lesões inflamatórias e não inflamatórias e diferentes graus de reparo e cicatrização (WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012). Estas alterações podem ser mediadas por andrógenos, o que explicaria a prevalência em jovens e adolescentes, hiperqueratinização folicular, desequilíbrio, inflamação e infecção bacteriana externa (VORA; SRIVASTAVA; MODI, 2018).

A acne vulgar é resultante da interação de vários fatores patogênicos, principalmente a produção excessiva de sebo folicular resultante das mudanças hormonais, alterações da microbiota da pele, fatores imunológicos e inflamatórios (DEGITZ et al., 2007). O aumento da queratinização mediada pelo acúmulo de sebo resulta em um ambiente favorável para o supercrescimento de propionibactérias, pertencentes à flora cutânea, e que em circunstâncias normais não se apresentam patogênicas. O metabolismo bacteriano resulta em substâncias distintas, tais como o ácido propiônico, que atua como agente quimiotático, levando à formação de lesões papulopustosas (GOLLNICK; DRENO, 2015).

O *Propionibacterium acnes* é o fator causal central no desenvolvimento da acne vulgar, porém existem numerosas observações e inconsistências nesses processos. Trata-se de um bastonete Gram positivo, anaeróbio, fermentador de açúcar e produtor de ácido propiônico como resposta final do seu metabolismo (NAKATSUJI et al., 2009). Além deste, existem outros microrganismos associados a patologia, tais como *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur* (HASSANZADEH; BAHMANI; MEHRABANI, 2008).

O *Staphylococcus epidermidis* é um coco Gram positivo, anaeróbio facultativo e que apresenta biofilme como fator de virulência. É uma bactéria comensal que em determinadas condições pode apresentar-se como oportunista, causando infecções de pele, correlacionada gravemente com infecções hospitalares (MACK et al., 2013).

Outro microrganismo oportunista que apresenta evidências patogênicas na acne vulgar é o *Staphylococcus aureus*, onde cerca de 43% dos pacientes com a doença apresentam coinfeção com *S. aureus* (KHORVASH et al., 2012). Este microrganismo é uma bactéria Gram positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa e que se torna facilmente resistente a antibióticos, o que seria um dos motivos da preocupação para o tratamento dos pacientes (FANELLI et al., 2011).

A triagem de substâncias com capacidade antimicrobiana representa um problema de saúde emergente, devido à alta capacidade adaptativa e mutagênica de bactérias frente à antimicrobianos (LUEPKE et al., 2017; SPELLBERG, 2014). Pesquisas demonstram que nos últimos 30 anos foram descobertas cerca de 118

moléculas com potenciais aplicações antibióticas (NEWMAN; CRAGG, 2012), porém poucos medicamentos antimicrobianos foram inseridos no mercado, sendo necessárias novas abordagens investigando produtos naturais para a ampliação e otimização do processo de triagem antimicrobiana (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

A planta *Pelargonium graveolens* L'Hér. é conhecida popularmente no Brasil como malva, ou ainda malva-cheirosa-roxa pertence à família Geraniaceae. Esta apresenta cerca de 800 representantes, sendo que o gênero *Pelargonium* é responsável pela composição aproximada de 280 espécies (BAKKER et al., 2004; PRICE; JEFFREY D. PALMER, 1993).

Nativas da África do Sul, porém disseminadas no mundo todo (BAKKER et al., 2004), são utilizadas na fabricação de fragrâncias, condimentos e conservantes de alimentos (LIS-BALCHIN, 2002). Etnofarmacologicamente, são utilizadas para o tratamento de inflamações, feridas, abscessos, febre, cólica, entre outras ações (SARASWATHI et al., 2011). Apresentam atividades cicatrizantes e antimicrobianas tópicas, frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* (LALLI et al., 2008).

Do ponto de vista fitoquímico, apresenta cerca de 120 terpenos, sendo o linalol (6,54%), citronelol (27,53%), geraniol (25,85%), Formiato de citronelila (8,75%) e  $\Delta$ -Selinene (8,15%) os constituintes majoritários (HSOUNA; HAMDY, 2012; SARASWATHI et al., 2011), porém podem ser encontrados flavonoides, substâncias fenólicas, taninos, saponinas, glicosídeos e antraquinonas (PRADEEPA; KALIDAS; GEETHA, 2016).

De acordo com os dados presentes na literatura e conhecimentos etnofarmacológicos a respeito de *P. graveolens*, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes extratos sobre microrganismos causadores da acne vulgar, correlacionando com os resultados obtidos a respeito do perfil fitoquímico obtido por cromatografia de camada delgada.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Processamento do material vegetal

As folhas de *Pelargonium graveolens* foram coletadas no horto municipal de Caçador – SC (26°44'14.64"S, 50°59'45.45"O), sendo posteriormente lavadas em água corrente e secas em estufa de ar circulante 40±5 °C, durante quatro dias.

Ao cumprir as exigências do Herbário do Instituto de Biociências (ICN) da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (UFRGS) uma exsicata foi depositada sob o *voucher* número 186053.

Após secagem, foram preparados extratos a partir de 30 g das folhas trituradas e distribuídas em 500 mL de diferentes solventes: Etanol 100% (EtOH 100%), Etanol 50% (EtOH 50%), Etanol 70% (EtOH 70%), Metanol 100% (MeOH 100%) e Acetona 100% (ACO 100%). Os extratos então foram protegidos da luz, mantendo-se a temperatura  $6\pm 2$  °C durante sete dias. Foram filtrados e o solvente retirado através de pressão reduzida com auxílio de rotaevaporador.

## 2.2 Perfil fitoquímico em cromatografia de camada delgada

O rastreamento de terpenos deu-se através de cromatografia em camada delgada sendo utilizado para isso placas de DC Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck & Co., Inc. Kenilworth, EUA). Volumes iguais (5  $\mu$ L) dos extratos dissolvidos em metanol foram aplicados em placa de CCD. As placas foram eluídas com diclorometano, secas e observadas em câmara de luz UV no comprimento curto e longo (254/365nm), sendo posteriormente reveladas através da exposição com vapores de iodo. Posteriormente, após reversão dos complexos com iodo, as placas foram reveladas utilizando-se vanilina sulfúrica, observando-se as manchas características para a detecção de terpenos, classe em que os princípios ativos geraniol e citronelol são encontrados. Para cada etapa os índices de retenção (*R<sub>f</sub>*s) foram calculados (SILVA et al., 2009).

## 2.3 Delineamento experimental

### 2.3.1 Preparo do inóculo

N preparo da suspensão bacteriana utilizou-se caldo nutriente e caldo tríptico de soja 5% previamente esterilizados, até obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Verificou-se em leitura espectrofotométrica (625 nm) para confirmação da concentração de micro-organismos ( $ABS = 0,08 - 0,1$ ) (CLSI, 2012). Como controle negativo foram utilizadas o meio de cultura contendo somente a bactéria, e como controle positivo para inibição do crescimento, ciprofloxacino na concentração de 5  $\mu$ g/mL. Para o experimento, 25, 50 e 100  $\mu$ g/mL dos extratos nas respectivas concentrações finais foram diluídos em 250  $\mu$ L da suspensão bacteriana.

### 2.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada de acordo com a metodologia descrita na norma M07-A09 do *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (CLSI, 2012) para as bactérias aeróbicas.

Os tubos contendo o caldo (5mL), o microrganismo (250 $\mu$ L) e os extratos (25, 50 e 100  $\mu$ g/mL) foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e 48 horas para o *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Ao término do tempo, o conteúdo do tubo foi semeado em placa contendo Ágar Mueller Hinton para confirmação da ausência de crescimento e determinação da concentração bactericida mínima (CBM) conforme proposto por, Ostrosky et al., 2008, com algumas modificações. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e validados após a revelação do controle positivo e negativo para ambos os patógenos.

## 2.4 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e significância  $p < 0,05$ , analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, sendo utilizado como pós-teste o método de Tukey (ZAR, 2010), utilizando-se o *software* “Statistica® para sistema operacional Windows 10 (64 bits)”, 2011, versão 10 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). As estruturas químicas foram delineadas através do download dos arquivos \*.mol no site ChemSpider (2007), com edição no *software* MarvinSketch® para sistema operacional Windows 10 (64 bits), 2018, versão 18 (ChemAxon, Budapest, HU).

## 3 | RESULTADOS

Para determinação qualitativa da classe dos terpenos, foi realizado o estudo dos extratos através cromatografia em camada delgada. Após eluição da placa em diclorometano, observou-se, em diferentes reveladores (vapores de iodo, luz UV e vanilina sulfúrica), manchas características da presença de substâncias terpenóides, sendo que no extrato ACO 100% foi possível observar um maior número de manchas características, índice de retenção calculado foi de 0,75 para a mancha violeta. Ainda é possível observar que no extrato acetônico diferentes substâncias foram extraídas, de acordo com as diferentes colorações apresentadas na CCD (**Figura 1**).

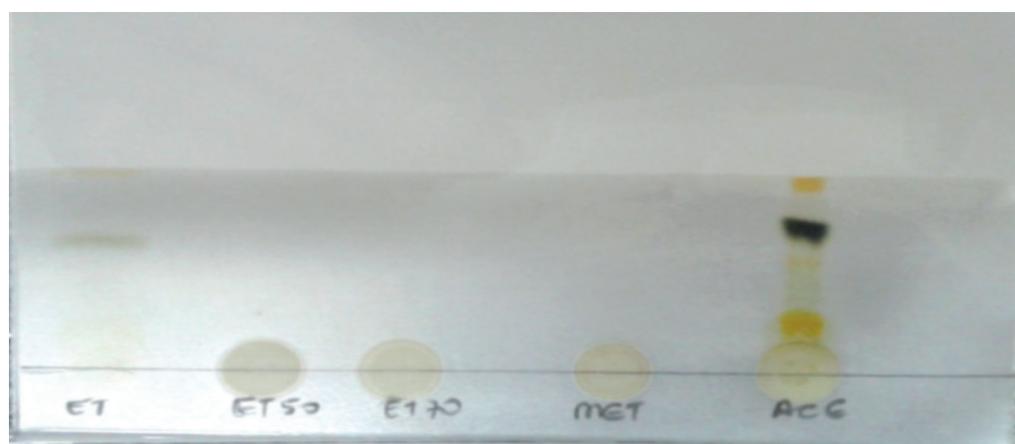


Figura 1. Cromatografia em camada delgada de extratos de *P. graveolens* visualizados em luz visível

Fonte: Os autores

Os resultados obtidos foram calculados para determinação da concentração inibitória mínima em porcentagens (**Tabela 1**).

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
EtOH 100% - 25µL	-	-	40%
EtOH 100% - 50µL	-	6%	38%
EtOH 100% - 100µL	-	19%	36%
EtOH 50% - 25µL	-	13%	50%
EtOH 50% - 50µL	-	16%	58%
EtOH 50% - 100µL	-	-	39%
EtOH 70% - 25µL	-	6%	51%
EtOH 70% - 50µL	-	13%	59%
EtOH 70% - 100µL	-	-	46%
ACO 100 % - 25µL	-	7%	59%
ACO 100% - 50µL	25%	36%	77%
ACO 100% - 100µL	27%	56%	82%
MeOH 100% - 25µL	-	-	52%
MeOH 100% - 50µL	-	-	59%
MeOH 100% - 100µL	-	-	66%

Tabela 1. Porcentagens da concentração inibitória mínima dos extratos da planta *P. graveolens*

(-): Não houve inibição do crescimento dos microrganismos.

MIC%: Concentração inibitória mínima em relação extratos X microrganismos.

Para o microrganismo *Staphylococcus aureus*, apenas os extratos de acetona 50µL e 100µL mostraram-se capazes de inibir 25% e 27% das bactérias respectivamente. As outras amostras que se apresentaram superior ao branco foram consideradas insignificantes, pois não desenvolveram inibição do crescimento bacteriano.

Já para o patógeno *Staphylococcus epidermidis* a quantidade de extratos capazes de inibir o crescimento bacteriano foi maior. O solvente etanol variou a inativação das bactérias de 6% da concentração de 50µL a 18% para o etanol 100µL. O EtOH 50% obteve uma variação de 12% a 15% de inibição para as concentrações de 25µL e 50µL respectivamente. O EtOH 70% mostrou essa capacidade com 6% a 13% de inibição bacteriana para os extratos de 25µL e 50µL.

A acetona foi o extrato com maior capacidade de inibição do *S. epidermidis*. As concentrações de 50µL e 100µL apresentaram uma capacidade de inativação do crescimento microbiano de 36% e 56% respectivamente, sendo que em ambas as concentrações de metanol não se mostraram capazes de exercer tal função.

Em relação à *P. acnes*, principal patógeno causador da acne vulgar, os extratos mostraram-se mais eficientes, sendo que houve inibição do desenvolvimento do microrganismo por parte de todos os extratos testados.

A acetona, como nos outros patógenos também foi o extrato que apresentou maior índice de inibição que variou entre 59%, 77% e 82% para as concentrações de

25µL, 50µL e 100µL respectivamente.

De uma maneira geral, avaliando a relevância da inibição dos extratos através da análise de variância, com *post test* de Tukey, em relação a cada microrganismo testado e desconsiderando as concentrações utilizadas (Tabela 2) obtém-se que para o *S. aureus* os extratos EtOH 100%, 70 % e 50%, e MeOH 100% mostraram-se com o mesmo grau de significância na inibição, diferindo apenas da ACO 100%.

Para o *S. epidermidis* os extratos que apresentaram o mesmo efeito foram EtOH 100%, 70 % e 50%, diferentemente do MeOH 100% e da ACO 100% sendo que esta última se apresentou com maior relevância de inibição (33%).

Com relação à *P. acne* os únicos extratos que tiveram a mesma significância na capacidade de inibição foram EtOH 70% e EtOH 50%, os outros (EtOH 100% e MeOH 100%) inibiram quantidades diferentes, sendo que a ACO 100% obteve uma média de inibição de 72,66%, sendo o extrato mais relevante.

Extrato	Bactéria	 Inibição (%)
EtOH 100%	<i>P. acnes</i>	38,00 <sup>e</sup>
EtOH 100%	<i>S. aureus</i>	0,00 <sup>a</sup>
EtOH 100%	<i>S. epidermidis</i>	8,33 <sup>b</sup>
EtOH 50%	<i>P. acnes</i>	50,66 <sup>f</sup>
EtOH 50%	<i>S. aureus</i>	0,00 <sup>a</sup>
EtOH 50%	<i>S. epidermidis</i>	9,66 <sup>b</sup>
EtOH 70%	<i>P. acnes</i>	52,00 <sup>f</sup>
EtOH 70%	<i>S. aureus</i>	0,00 <sup>a</sup>
EtOH 70%	<i>S. epidermidis</i>	6,33 <sup>b</sup>
ACO 100%	<i>P. acnes</i>	72,66 <sup>h</sup>
ACO 100%	<i>S. aureus</i>	17,33 <sup>c</sup>
ACO 100%	<i>S. epidermidis</i>	33,00 <sup>d</sup>
MeOH 100%	<i>P. acnes</i>	59,00 <sup>g</sup>
MeOH 100%	<i>S. aureus</i>	0,00 <sup>a</sup>
MeOH 100%	<i>S. epidermidis</i>	0,00 <sup>a</sup>

Tabela 2. Análise da capacidade de inibição bacteriana desconsiderando a concentração de extrato

Variacão da Inibição (%) (Bactérias) Grupos homogneos desconsiderando a concentração empregada.  $\alpha = 0,05$   $df = 105,00$ .

## 4 | DISCUSSÃO

Dentre os principais patógenos envolvidos na progressão e estabelecimento da acne vulgar encontram-se *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Estes agentes patogênicos atuam por acentuarem lesões em folículos pilosebceos, o processo seborreico, inflamação e diminuir os processos de reparo tecidual (BHATE; WILLIAMS, 2013; VORA; SRIVASTAVA; MODI, 2018).

A presença de leucócitos circundantes dos folículos, especialmente os linfócitos T (CD3+ e CD4+) são os responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório através da produção de citocinas, principalmente IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  (KISTOWSKA et al., 2014). Mediadores lipídicos derivados de neutrófilos, tais como o LTB<sub>4</sub>, realizam *up regulation* do metabolismo lipídico na pele e ligam-se a receptores proliferadores peroxissomais, aumentando ainda mais o acúmulo de sebo e inflamação (DEGITZ et al., 2007). Mais recentemente, foi descoberta a participação de receptor Toll-like 2, na ativação de AP-1, resultando na cascata jusante de macrófagos e neutrófilos através da liberação de IL-10 (GOLLNICK; DRENO, 2015).

Ainda, em resposta a agentes patogênicos, ocorre a ativação de receptor ativado por proteases (PPAR-2) nos queratinócitos, que podem resultar no aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\alpha$ , IL-18 e TNF- $\alpha$ , bem como metaloproteínases e LL-37, que é o gene que codifica o único membro da família da catelicidina humana (TANGHETTI, 2013).

Os extratos obtidos por diferentes solventes apresentaram diferenças no perfil de substâncias extraídas. É possível observar que os extratos EtOH 50%, 70%, 100% e MeOH 100% extraíram as substâncias de interesse, os terpenos, porém em menor grau que o extrato ACO 100%. Ainda, com base nos achados fitoquímicos, é possível concluir que as substâncias extraídas em EtOH 50%, 70%, 100% e MeOH 100% apresentam de média a alta polaridade, tendo em vista que não interagiram com o solvente apolar (diclometano) utilizado como fase móvel. Além disso, o extrato ACO 100% apresenta maior complexidade de substâncias extraídas, principalmente de baixa e média polaridade.

É possível afirmar que as manchas violetas presentes são pertencentes a substâncias da classe dos terpenos, tendo em vista que atingiu o mesmo R<sub>f</sub> de 0,75, obtido em estudos anteriores (SILVA et al., 2009) na investigação da presença de terpenos. As demais manchas são sugestivas da presença de substâncias de média polaridade, tais como flavonoides, porém necessitam de maiores investigações para a confirmação de sua presença (PRADEEPA; KALIDAS; GEETHA, 2016).

Estas informações sugerem que os extratos apresentem componentes com atividades antimicrobianas, tais como o citronelol e geraniol (HSOUNA; HAMDY, 2012; LALLI et al., 2008) (**Figura 2**).

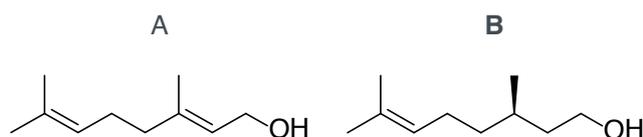


Figura 2. Representação estrutural 2D dos terpenos (A) citronelol e (B) geraniol, constituintes majoritários encontrados em *P. graveolens*

Fonte: adaptado de chemspider.com com o uso do software MarvinSchetck

A presença de outras substâncias, tais como as observadas no extrato ACO 100%, demonstram que efeitos sinérgicos são benéficos na resolução de processos infecciosos, associados a atividades anti-inflamatórias e antioxidantes apresentadas pelas substâncias presentes no extrato de *P. graveolens* (ÇAVAR; MAKSIMOVIC, 2012; KALEMBA; KUNICKA, 2003; LIS-BALCHIN et al., 1998; NAZEMIYEH; LOTFIPOOR; DELAZAR, 2011).

Além dos monoterpenos citronelol e geraniol, são descritos os sesquiterpenos pineno, felandreno, mirceno, limoneno, germacreno, cariofileno entre outras substâncias orgânicas, principalmente substâncias fenólicas, tais como ácido clorogênico, cafeico e *p*-cumárico (LIS-BALCHIN, 2002; LIS-BALCHIN et al., 1998). Outras classes como flavonoides, taninos, cumarinas e substâncias glicosiladas estão presentes (SARASWATHI et al., 2011).

Dos métodos de investigação da atividade antimicrobiana, a determinação do CIM e CBM é válido devido à fácil implementação da técnica (BONA et al., 2014). As substâncias químicas presentes em *P. graveolens*, contidas em diferentes extratos foram capazes de inibir o crescimento microbiano no experimento, confirmando com dados presentes na literatura (LALLI et al., 2008; LIS-BALCHIN et al., 1998; PRADEEPA; KALIDAS; GEETHA, 2016; VORA; SRIVASTAVA; MODI, 2018).

Portanto, substâncias fenólicas tais como ácidos orgânicos, flavonoides e taninos podem apresentar outras ações, tais como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias que resultam em ações sinérgicas diminuindo o processo inflamatório originado pela infecção das bactérias envolvidas na acne vulgar (PRADEEPA; KALIDAS; GEETHA, 2016).

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência antimicrobiana e o aumento de cepas multirresistentes são alguns dos fatores que levam a realização de muitos estudos na investigação de novos tratamentos antibacterianos.

Neste trabalho, o extrato acetônico de *P. graveolens* demonstrou maior atividade antibacteriana frente aos microrganismos *P. acnes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, patógenos envolvidos no estabelecimento da acne vulgar. Esta inibição ocorreu de forma concentração dependente, e demonstrando-se promissor para o tratamento da doença acne vulgar que atualmente atinge milhares de jovens e adultos.

Estes dados em correlação com a literatura sugerem que metabólitos da classe dos terpenos, flavonoides e taninos sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Ainda, essa atividade pode ser associada a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios que podem contribuir para a diminuição da formação das lesões.

Estudos conclusivos sobre a segurança e eficácia, bem como quanto a identidade estrutural das substâncias presentes no extrato acetônico estão sendo conduzidos

em nossos laboratórios, afim de promover o uso de *P. graveolens* como possível dermocosmético no tratamento da acne vulgar.

## 6 | AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz pelo fornecimento da cepa padrão do microrganismo *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, a empresa NewProv - Produtos para Laboratório pelo fornecimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e ao Herbário do Instituto de Biociências (ICN), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (UFRGS) na pessoa da Curadora Prof. Dra<sup>a</sup> Mara Rejane Ritter.

## REFERÊNCIAS

BAKKER, F. T.; CULHAM, A.; HETTIARACHI, P.; TOULOUMENIDOU, T.; GIBBY, M. Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. **Taxon**, v. 53, n. 1, p. 17–28, 2004.

BHATE, K.; WILLIAMS, H. C. Epidemiology of acne vulgaris. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 3, p. 474–485, 2013.

BONA, E. A. M. DE; PINTO, F. G. DA S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. DE. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

ĆAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 263–267, 2012.

CHEMSPIDER. **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

CLSI. **M07-A9 - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. v. 32

DEGITZ, K.; PLACZEK, M.; BORELLI, C.; PLEWIG, G. Pathophysiology of acne. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 5, n. 4, p. 316–323, 2007.

FANELLI, M.; KUPPERMAN, E.; LAUTENBACH, E.; EDELSTEIN, P. H.; MARGOLIS, D. J. Antibiotics, acne, and *Staphylococcus aureus* colonization. **Archives of Dermatology**, v. 147, n. 8, p. 917–921, 2011.

GOLLNICK, H. P. M.; DRENO, B. Pathophysiology and management of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. S4, p. 1–2, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HASSANZADEH, P.; BAHMANI, M.; MEHRABANI, D. Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: an *in vitro* study. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 122–124, 2008.

HSOUNA, A.; HAMDI, N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 167, 2012.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.

KHORVASH, F.; ABDI, F.; KASHANI, H. H.; NAEINI, F. F.; NARIMANI, T. *Staphylococcus aureus* in acne pathogenesis: A case-control study. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 573–576, 2012.

KISTOWSKA, M.; GEHRKE, S.; JANKOVIC, D.; KERL, K.; FETTELSCHOSS, A.; FELDMEYER, L.; FENINI, G.; KOLIOS, A.; NAVARINI, A.; GANCEVICIENE, R.; SCHAUBER, J.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. IL-1 $\beta$  drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 3, p. 677–685, 2014.

LALLI, J. Y. Y.; VAN ZYL, R. L.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. In vitro biological activities of South African *Pelargonium* (Geraniaceae) species. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 153–157, 2008.

LIS-BALCHIN, M. **Geranium and Pelargonium: The genera *Geranium* and *Pelargonium***. London: Taylor & Francis e-Library, 2002.

LIS-BALCHIN, M.; BUCHBAUER, G.; RIBISCH, K.; WENGER, M. T. Comparative antibacterial effects of novel *Pelargonium* essential oils and solvent extracts. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 135–141, 1998.

LUEPKE, K. H.; SUDA, K. J.; BOUCHER, H.; RUSSO, R. L.; BONNEY, M. W.; HUNT, T. D.; MOHR, J. F. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy**, v. 37, n. 1, p. 71–84, 2017.

MACK, D.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G.; JEEVES, R.; PASCOE, B.; KNOBLOCH, J. K.-M.; ROHDE, H.; WILKINSON, T. S. *Staphylococcus epidermidis* in Biomaterial-Associated Infections. In: MORIARTY, T. F.; ZAAT, S. A. J.; BUSSCHER, H. J. (Eds.). **Biomaterials Associated Infection**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 25–56.

MARVINSKETCH. **MarvinSketch - calculation module developed by ChemAxon**. Budapest: ChemAxon Ltd., 2018.

NAKATSUJI, T.; KAO, M. C.; FANG, J. Y.; ZOUBOULIS, C. C.; ZHANG, L.; GALLO, R. L.; HUANG, C. M. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 10, p. 2480–2488, 2009.

NAZEMIYEH, H.; LOTFIPOOR, F.; DELAZAR, A. Chemical composition, and antibacterial and free-radical-scavenging activities of the essential oils of a citronellol producing new chemotype of *Thymus*. **Records of Natural Products**, v. 5, n. 3, p. 184–192, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, jun. 2008.

PRADEEPA, M.; KALIDAS, V.; GEETHA, N. Qualitative and quantitative phytochemical analysis and bactericidal activity of *Pelargonium graveolens* L'Her. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 7–11, 2016.

PRICE, R. A.; JEFFREY D. PALMER. Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales

from rbcL sequence comparisons. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 80, n. 3, p. 661–671, 1993.

SARASWATHI, J.; VENKATESH, K.; BABURAO, N.; HILAL, M. H.; RANI, A. R. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, p. 2587–2598, 2011.

SILVA, R. S.; RIBEIRO, C. M. R.; BORGES, M. N.; BLOIS, G. S. O. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234–2237, 2009.

SPELLBERG, B. The future of antibiotics. **Critical Care**, v. 18, n. 3, p. 1–7, 2014.

STATISTICA. **Statistica - data analysis software system**. Tulsa: StatSoft Inc., 2011.

TANGHETTI, E. A. The role of inflammation in the pathology of acne. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 6, n. 9, p. 27–35, 2013.

VORA, J.; SRIVASTAVA, A.; MODI, H. Antibacterial and antioxidant strategies for acne treatment through plant extracts. **Informatics in Medicine Unlocked**, n. June, p. 1–5, 2018.

WILLIAMS, H. C.; DELLAVALLE, R. P.; GARNER, S. Acne vulgaris. **The Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 361–372, 2012.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall, 2010.

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SORGO

### **Micaeli Silva Belgamazzi**

Centro Universitário Cesumar–UNICESUMAR,  
Maringá, Paraná

### **Larissa Tombini**

Centro Universitário Cesumar–UNICESUMAR,  
Maringá, Paraná

### **Letycia Lopes Ricardo**

Universidade Estadual de Maringá– UEM,  
Maringá, Paraná

### **Ricardo Andreola**

Centro Universitário Cesumar–UNICESUMAR,  
Maringá, Paraná

### **Graciene de Souza Bido**

Centro Universitário Cesumar–UNICESUMAR,  
Maringá, Paraná

**RESUMO:** O Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é utilizado na produção de farinha para panificação, amido e álcool. A palhada formada pelos restos culturais do sorgo é usada como cobertura verde e além de contribuir na melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo, manutenção da temperatura e umidade do mesmo, também possui uma alta capacidade antioxidante. Pode ser um importante instrumento para auxiliar no controle das plantas invasoras. O sorgo apresenta elevada concentração de compostos fenólicos como, por exemplo, os ácidos fenólicos,

antocianinas e taninos. Esses compostos presentes nas diversas partes do sorgo podem apresentar atividade antioxidante, o que pode diminuir o estresse oxidativo de outras plantas utilizadas em consorcio ou rotação de culturas. O objetivo desse trabalho foi analisar a atividade antioxidante do sorgo. Sendo assim, os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacognosia da Unicesumar utilizando espectrofotômetro, com o intuito de determinar a relação entre o teor de polifenóis e a capacidade antioxidante nas frações líquido-líquido do sorgo. Os resultados mais expressivos foram observados com as frações acetato de etila e diclorometano, verificando CI50 igual a  $74,55 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $85,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. **PALAVRAS-CHAVE:** DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), Polifenóis, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

**ABSTRACT:** Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] is used in the production of flour for baking, starch and alcohol. The sorghum is used as a green cover and in addition to contributing to the improvement of the physical, chemical and biological characteristics of the soil, maintaining its temperature and humidity, it also has a high antioxidant capacity. It can be an important tool to aid in the control of invasive plants. Sorghum has a high concentration of phenolic compounds, such as phenolic

acids, anthocyanins and tannins. These compounds present in different parts of the sorghum may have antioxidant activity, which may reduce the oxidative stress of other plants used in a consortium or crop rotation. The objective of this work was to analyze the antioxidant activity of sorghum. Thus, the experiments were carried out in the Unicesumar Pharmacognosy laboratory using a spectrophotometer, in order to determine the relationship between the polyphenol content and the antioxidant capacity in the liquid-liquid fractions of sorghum. The most significant results were observed with ethyl acetate and dichloromethane fractions, with an IC<sub>50</sub> of 74.55 µg mL<sup>-1</sup> and 85.08 µg mL<sup>-1</sup> respectively.

**KEYWORDS:** DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Polyphenols, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

## 1 | INTRODUÇÃO

Radicais livres são moléculas produzidas endogenamente, as quais apresentam um ou mais elétrons não pareados, isto é, estão desestabilizados eletricamente. As ininterruptas tentativas de estabilidade molecular fazem com que os radicais livres se tornem instáveis. (BERGEROT; BERGEROT, 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Para o controle desses radicais livres, todo organismo possui mecanismos de defesa antioxidantes, inibindo ou reduzindo os danos que eles podem causar (BARBOSA et al., 2010). Os antioxidantes são compostos capazes de retardar ou bloquear a oxidação de moléculas, evitando assim o início ou até mesmo o desenvolvimento das reações em cadeia de oxidação, e são classificados em antioxidantes naturais e sintéticos. Os antioxidantes sintéticos são aqueles produzidos artificialmente para diminuir a etapa de proliferação de reação de oxidação. Enquanto que os naturais são produzidos e extraídos de plantas. (ANTUNES e CANHOS, 1984; BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; ZHENG e WANG, 2001; FENNEMA, 1993; SIMÃO, 1985).

Os antioxidantes são divididos em dois grupos: sistema enzimático e não-enzimático. No sistema antioxidante enzimático, a ação enzimática ocorre através de mecanismos preventivos, limitando ou impedindo a formação de radicais livres, com o intuito de diminuir a ocorrência de lesões oxidativas (BARBOSA et al. 2010). O sistema não-enzimático é composto por antioxidantes fornecidas pela alimentação. (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Há vários cereais com alta taxa de capacidade antioxidante, entre eles o Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], o qual se destaca como o quinto cereal de maior produção no mundo e o quarto no ranking de produção brasileira (FAOSTAT, 2010; IBGE, 2010). É utilizado como principal fonte de alimento em grande parte dos países da África, Sul da Ásia e América Central e importante componente da alimentação animal nos Estados Unidos, Austrália e América do Sul. Os grãos, também, podem ser utilizados na produção de farinha para panificação, amido industrial, álcool e sua

palhada é utilizada como forragem ou cobertura de solo (TARDIN, 2016).

Essa cobertura do solo é fundamental pois diminui o uso indiscriminado de agrotóxicos que favorece os impactos ambientais devido à contaminação dos recursos naturais e atingem de forma direta e/ou indireta na saúde humana causando diversos efeitos negativos. Além de contribuir na melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo e na manutenção da temperatura e da umidade do mesmo, pode ser um importante instrumento para auxiliar no controle das plantas invasoras (NOCE et al., 2008).

O sorgo apresenta-se com uma elevada concentração de compostos fenólicos como, por exemplo, os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos (AWIKA et al., 2005). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos provenientes do sorgo tem sido comprovada em diversos estudos *in vitro* (AWIKA et al., 2009; GULÇIN et al., 2010), porém, ainda não tenha sido elucidada na literatura por modelos experimentais *in vivo*.

Os compostos fenólicos do Sorgo, correspondem a produtos secundários do metabolismo das plantas ou integram o metabolismo celular. Além disso, o conteúdo de fotoquímicos presente nesse cereal vem despertando o interesse de pesquisadores por exercerem atividade antioxidante nos organismos, como por exemplo, contribuindo para doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, entre outras (AWIKA e ROONEY, 2004; BRALLEY et al., 2008; DYKES et al., 2009).

Os principais fenólicos encontrados nos cultivares do sorgo são os derivados do ácido hidrobenzoico e do ácido hidrocínamico e os flavonoides, englobando as antocianinas e os taninos (AWIKA e ROONEY, 2004).

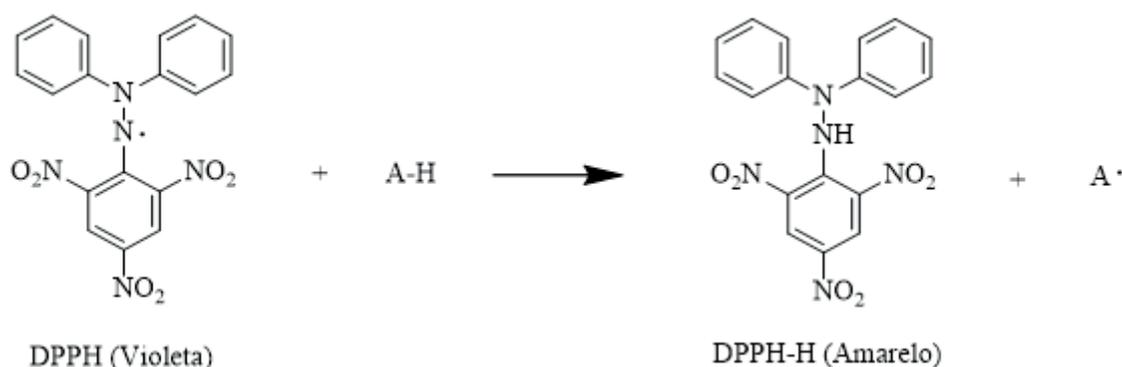
O ácido fenólico hidrobenzoico é derivado do ácido benzóico, que inclui o ácido gálico, p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico e o ácido protocatequínico, entre outros. Esses ácidos fenólicos presentes no sorgo auxiliam as plantas na defesa contra pragas e fitopatógenos. Geralmente, os níveis de ácidos fenólicos do sorgo são compatíveis com os dos demais cereais (AWIKA e ROONEY, 2004) e podem ser encontrados no sorgo na forma livre ou em associação com outros componentes (DYKES e ROONEY, 2006).

A concentração de compostos fenólicos do sorgo é determinada por fatores genéticos, porém métodos de processamento da matéria-prima pode alterar suas concentrações (AWIKA et al., 2003; AWIKA e ROONEY, 2004). Estudos relataram que pode haver destruição de fenólicos antioxidantes em altas temperaturas. O processamento térmico pode liberar esses compostos fenólicos associados com o rompimento dos constituintes celulares (DEWANTO et al., 2002).

Diante do que foi apresentado, este trabalho teve por objetivo avaliar e determinar a atividade antioxidante do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Sendo que substâncias antioxidantes são encontradas e distribuídas em concentrações variadas em diferentes partes da planta e durante seu ciclo de vida. Desse modo, este projeto investigou o potencial antioxidante de frações (extrato bruto, hexânico, diclorometano, acetato de etila, butanólico, hidrometanólico) obtidas pela partição líquido-líquido do sorgo.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada pelo teste DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) segundo Brand-Williams (1995), com algumas modificações. Primeiramente foi realizada a partição líquido-líquido da palhada de *Sorghum bicolor* (L.) Moench e obtido o extrato bruto e as frações (extrato bruto, hexânico, diclorometano, acetato de etila, butanólico, hidrometanólico) de sorgo. Cada amostra foi preparada na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> e então foi pipetado em cubetas descartáveis vários volumes em µL (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300), de modo a obter-se diferentes concentrações. Em seguida adicionou-se 2 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,397 mmol L<sup>-1</sup>), sendo as cubetas protegidas da luz por 30 min. A coloração roxa do DPPH é alterada na presença de um antioxidante tornando-se amarela (Figura 1), alterando assim a absorvância, a qual foi monitorada espectrofotometricamente a 515,5 nm. Utilizou-se como branco uma cubeta com metanol e uma cubeta com a solução metanólica de DPPH como controle negativo. Todo o experimento foi realizado em triplicata.



**Figura 1:** Reação do DPPH em contato com um antioxidante.

A atividade antioxidante foi calculada por meio da porcentagem de inibição do DPPH, usando a equação (1):

$$I\% = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde: I% = porcentagem de inibição, A<sub>0</sub> = absorvância média da solução de DPPH (controle negativo) no fim da reação e A<sub>x</sub> = absorvância média da solução de DPPH com as amostras testadas no fim da reação.

A concentração na qual ocorre cinquenta por cento de inibição, CI50, foi calculada através do gráfico de inibição (%) versus concentração (mg mL<sup>-1</sup>)

A baixa absorvância e o aumento da porcentagem de inibição indicam atividade sequestrante de radicais livres.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada para o extrato bruto (E. Bruto) e as frações: hexano (F. Hex), diclorometano (F. DM.), acetato de etila (F.A.E.), butanólica (F.H.M.) e hidrometanólica (F.H.M.).

Os resultados mais expressivos foram observados para as frações acetato de etila e diclorometano, com  $CI_{50}$  igual a  $74,55 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $85,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, apresentando uma atividade antioxidante moderada. Já as frações hexânica e butanólica com  $CI_{50}$  de  $182,63 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $103,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente apresentaram uma atividade considerada fraca. O extrato bruto e a fração hidrometanólica apresentaram um  $CI_{50}$  superior a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo considerados, portanto, inativas (Tabela 1).

Frações	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
E. BRUTO	$598,90 \pm 0,8014$
F. HEX.	$182,63 \pm 1,1954$
F. DM.	$85,08 \pm 1,7674$
F. A.E.	$74,55 \pm 1,9702$
F. B.	$103,47 \pm 1,4851$
F. HM.	$649,19 \pm 0,3052$
BHT	$18,452 \pm 0,782$
Ácido Ascórbico	$6,480 \pm 1,968$
Rutina	$11,584 \pm 0,955$

**Tabela 1:** Valores de  $CI_{50}$  da atividade antioxidante para o extrato bruto e frações do sorgo. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão.

Cultivares de sorgo apresentam compostos fenólicos que correspondem a produtos secundários do metabolismo das plantas ou integram os componentes celulares. O conteúdo de fitoquímicos no sorgo tem despertado interesse de profissionais de diversas áreas por exercerem atividade antioxidante (QUEIROZ e SCHAFFERT, 2011).

Pantelidis et al. (2007) também avaliaram a capacidade antioxidante do sorgo, analisando várias partes da planta que apresentam compostos fenólicos com ação antioxidante. Este cereal apresentou excelente atividade antioxidante proveniente de ácidos fenólicos, antocianinas e taninos.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na do processo oxidativo. (SOUSA et al., 2007)

Estes compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade),

mas também em relação a fatores internos incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese. (AHERNE e O'BRIEN, 2002).

Nesta perspectiva, existe um grande estímulo relacionado à busca por novas substâncias obtidas de plantas com potencial antioxidante. Além disto, o interesse pela avaliação do potencial antioxidante da fração de acetato de etila e diclorometano com alto potencial oxidativo. A atividade proporcionada por estes metabólitos secundários ocorre pela capacidade que estes compostos apresentam de neutralizar ou eliminar os radicais livres (GARG et al., 2012)

Andrade et al. (2007) realizaram estudos com o extrato etanólico bruto e as frações diclorometano e acetato de etila, obtidos das flores de *Acacia podalyriifolia*, os dados obtidos demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado nas frações de diclorometano e acetato de etila, o que explicaria a maior ação antioxidante, demonstrada pela atividade captadora de radical.

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI et al., 2005; BARREIROS et al., 2006). No que se refere aos cereais, o sorgo tem sido mencionado como fonte de compostos fenólicos, sendo que todas as espécies de sorgo contêm ácidos fenólicos e a maioria contém flavonoides, com sua atividade antioxidante, evitando a produção de radicais livres. (DYKES; ROONEY, 2006).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compostos fenólicos presentes nas diversas partes do sorgo podem apresentar atividade antioxidante, o que pode diminuir o estresse oxidativo de outras plantas utilizados em consorcio ou rotação de culturas combinado com o sorgo.

Essa atividade antioxidante pode evitar a produção de radicais livres que quando em excesso na planta causa a morte celular, a necrose de raiz e caule e aumentam a produtividade, podendo favorecer a cultura seguinte.

#### REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism.** Nutrition. New York: v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ANDRADE, A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A. **Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2007; 17(2): 231-235.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. **Aditivos em Alimentos.** Campinas: Editora da UNICAMP, 1984.

- ATOUI, A.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. **Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile.** *Food Chem.*, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.
- AWIKA J. M.; ROONEY L. W.; WU X.; PRIOR R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS L. **Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(23):6657–6662. 2003.
- AWIKA, J. M.; McDONOUGH, C. M.; ROONEY. **Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 53, n. 16, p. 6230-6234, 2005.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. **Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties.** *Food Chemistry*, London, v. 90, n. 1-2, p. 293-301. 2004.
- AWIKA, J. M.; YANG, L.; BROWNING, J. D.; FARAJ, A. **Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties.** *LWT - Food Science and Technology*, London, v. 42, n. 6, p. 1041-1046, 2009.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BERGEROT, C.; BERGEROT, P. G. **Câncer o Poder da Alimentação na Prevenção e Tratamento.** São Paulo: Cultrix. 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Rev. Nutr.* [online]. 1999, vol.12, n.2, pp.123-130. ISSN 1678-9865.
- BRALLEY, E.; GREENSPAN, P.; HARGROVE, J. L.; HARTLE, D. K. **Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans.** *Journal of Medicinal Food*, 11, 307–312. 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.* 28, 25-30, 1995.
- BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. **Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines.** *J. Agric. Food Chemistry.* Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001.
- DEWANTO, V.; WU, X. Z.; KAFUI, K. A.; LIU, R. H. **Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity.** *J. Agric. Food Chem.* 50 (10), 3010-3014. 2002.
- DYKES, L.; ROONEY, L. W. **Sorghum and millet phenols and antioxidants.** *Journal of Cereal Science*, London, v. 44, n. 3, p. 236-251, 2006.
- DYKES, L.; SEITZ, L. M.; ROONEY, W. L.; ROONEY, L. R., 2009. **Flavonoid composition of red sorghum genotypes.** *Food Chem.* v. 1, 33–317. 2009.
- FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO.** 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en> p. 2007. Acesso 27/04/2016.
- FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos.** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.
- GARG, D., SHAIKH, A.; MULEY, A.; MARAR, T. **In-vitro antioxidant activity and phytochemical**

**analysis in extracts of Hibiscus rosa-sinensis stem and leaves.** Free Rad Antiox. 2012; 2(3):41-6.

GÜLÇİN, I.; BURSAL, E.; ŞEHITOĞLU, H. M.; BILSEL, M.; GÖREN, C. A. **Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey.** Food Chem Toxicol. 48(8-9):2227–2238. 2010.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa\\_201001\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201001_5.shtm)>. Acesso 27/04/2016.

NOCE, R.; CANTO, J. L.; OLIVEIRA, J. M.; CARVALHO, R. M. M. A.; BRAGA, M. J.; SILVA, M. L.; MENDES, L. M. **Choque de preço no mercado de carvão vegetal: 1997/2005.** Cerne, Lavras, v.14, n.1, p.17-22, 2008.

PANTELIDIS, G. E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G. A.; DIAMANTIDIS, G. **Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries.** Food Chem., v. 102, n. 3, p. 777-783, 2007.

QUEIROZ, V.; SCHAFFERT, R. **Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [Sorghum bicolor (L.) MOENCH], para alimentação Humana.** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.10, n.3, p. 180-195, 2011 Versão impressa ISSN 1676-689X / Versão on line ISSN 1980-6477 - <http://www.abms.org.br>.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico.** RBME. 2004; 10(10):308-13.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico.** São Paulo: Nobel, 1985.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; CRUZ, M.; BARROS, D. S.; CHAVES, M. H. **Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais.** Quim. Nova, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

TARDIN, D. F. **Melhoramento genético do Sorgo e as potencialidades da cultura para o estado do Mato Grosso.** Embrapa 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46279/1/Melhoramento-genetico.pdf>>. Acesso 27/04/2016.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. **Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.** J. Agric. Food Chemistry. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA EM *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI*

### **Gabrielle Vieira**

Mestre em Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP.

e-mail: gabriellevieir@gmail.com

### **Juliano Henrique Ferrarezi**

Graduado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP

e-mail: julianoferrarezi@hotmail.com

### **Daiane Cristina Sass**

Professora do Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP.

e-mail: daiane\_sass@rc.unesp.br

**RESUMO:** O Brasil possui grande destaque na produção de laranja em escala mundial, entretanto, todos os anos registram-se perdas consideráveis relacionadas a doenças e pragas nos pomares. Uma das principais doenças que atacam citros é o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Atualmente o combate ao cancro cítrico é feito principalmente com o uso de defensivos agrícolas químicos a base de cobre. Tendo em vista o impacto ambiental envolvido no uso de metais pesados, é fundamental a busca por alternativas sustentáveis de combate à doença. Novas pesquisas apontam o potencial de metabólitos secundários para fins fitossanitários, principalmente metabólitos originados de microrganismos em condições extremas, como

é o caso da Antártica. Esse trabalho avaliou a atividade antibacteriana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de 24 extratos produzidos por 12 fungos isolados de solo antártico. Dez dos isolados produziram extratos que inibiram em pelo menos 85% o crescimento do fitopatógeno. Os resultados indicam o potencial de produção de compostos bioativos por fungos oriundos da Antártica para o combate ao cancro cítrico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citros, Antártica, cancro cítrico, fungos, metabólitos secundários.

**ABSTRACT:** Brazil has great importance in the world production of citrus, however, every year there are considerable losses related to plant diseases and pests in the orchards. One of the main diseases that attack citrus is citrus canker caused by the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Currently citrus canker disease control is done mainly with the use of copper based chemical pesticides. In view of the environmental impact involved in the use of heavy metals it is essential to search for sustainable alternatives to combat the pathology. Recent research indicates the potential of secondary metabolites for phytosanitary purposes, mainly metabolites originating from microorganisms under extreme conditions, such as Antarctica. This study evaluated the antibacterial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* of 24 extracts produced by 12 fungi isolated from Antarctic

soil. Ten of the isolates produced extracts that inhibited phytopathogen growth by at least 85%. The results indicate the potential for the production of bioactive compounds by fungi from Antarctica to combat citrus canker.

**KEYWORDS:** Citrus, Antarctic, citrus canker, fungi, secondary metabolites.

## 1 | INTRODUÇÃO

Desde a década de 60 o Brasil tem se tornado destaque na agricultura em escala mundial, principalmente após uma série de incentivos na área de ciência e tecnologia agrícola que permitiu melhor aproveitamento de sua extensão territorial. Na década de 80 o país se tornou potência na citricultura, principalmente por conta de suas condições climáticas favoráveis ao plantio de citros. A produção ainda hoje é a maior do mundo, segundo dados do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) a safra 2017/2018 de laranja foi de aproximadamente 398,35mi de caixas, ou seja, mais de 16mi de toneladas da fruta, safra 62% maior que a produção 2016/2017.

Infelizmente, a citricultura, assim como outras culturas de interesse econômico, é constantemente afetada por doenças e pragas que diminuem a produtividade dos pomares (SANCHES et al., 2014) e causam impactos tanto na rentabilidade para o produtor quanto na economia do país como um todo. No Brasil, um dos problemas fitossanitários relacionados à citricultura é o cancro cítrico (SANCHES et al., 2014; CABI, 2017; EPPO, 2017), doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 1).



Figura 1. Lesão eruptiva causada pelo Cancro Cítrico na laranja (Fonte: FUNDECITRUS)

A primeira detecção no estado de São Paulo ocorreu em 1957 e desde então há um esforço para a contenção da doença. Sua disseminação ocorre de forma natural por meio de sementes contaminadas, chuva, vento, insetos, podas, nebulização de canteiros, além da manipulação de mudas e equipamentos contaminados. A entrada da bactéria na planta hospedeira ocorre através de aberturas naturais dos tecidos, sejam estômatos, hidatódios ou ferimentos (GOTTWALD et al., 2002), e a multiplicação ocorre em espaços intercelulares (JACOB, 2009) como mesofilo e parênquima.

As lesões causadas pelo cancro cítrico são circulares, corticosas, salientes, de coloração castanha e aspecto eruptivo/necrótico (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 1981; ROSSETTI, 1993; NAMEKATA, 1991) (Figura 1). As feridas ocorrem apenas no local de inserção da bactéria no hospedeiro, e podem ocorrer nos mais diversos tecidos vegetais como folhas, ramos e frutos (AMARAL, 2003). Há relatos de contaminação via ferimentos de raízes, por espécies de *Xanthomonas* que sobrevivem no solo em associação com material vegetal morto (RYAN et al., 2011)

A bactéria causadora do cancro cítrico pertence ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “xantus” = amarelo, “monas” = unidade) que são bactérias aeróbicas obrigatórias, possuem formato de bastonete, um único flagelo polar (TESSMANN, 2002) e não formam esporos. Além disso, são bactérias Gram negativas, ou seja, suas paredes celulares são mais delgadas e apresentam uma membrana de lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolipídios que lhes confere maior complexidade e seletividade de captação de recursos externos, de modo a serem mais resistentes a antibióticos e defensivos químicos (TORTORA et al., 2012).

Em 2016 a legislação brasileira referente ao cancro cítrico foi alterada e as áreas de cultivo passaram a ser categorizadas em relação à incidência da doença. Atualmente as medidas contra o cancro cítrico incluem o uso de mudas sadias, uso de quebra vento, uso de espécies e variedades menos suscetíveis, além de aplicação de defensivos agrícolas com base de cobre durante o manejo.

O cobre, bem como outros metais pesados, é altamente tóxico e se acumula facilmente ao longo de cadeias tróficas (ROCHA e AZEVEDO, 2017), afetando sistema nervoso central, sistema hepático, renal e até esquelético (SEGURA-MUÑOZ, 2002) dos seres vivos. Tendo em vista o impacto ambiental que agroquímicos de base cúprica podem causar torna-se extremamente necessária a busca por medidas alternativas e sustentáveis de combater o cancro cítrico.

Uma alternativa ao uso de agrodefensivos e produtos químicos atualmente utilizados no combate aos fitopatógenos, principalmente os de interesse econômico, são os produtos naturais. Essas substâncias, produzidas por diversos organismos como animais, plantas e micro-organismos, apresentam um menor impacto em relação aos bactericidas químicos sintéticos, sendo mais facilmente degradáveis além de não se acumularem no ambiente e oferecerem um menor risco para o desenvolvimento de fitopatógenos resistentes (PEIXOTO NETO et al., 2002; DAYAN et al., 2009). Neste sentido surgem novas pesquisas na área da biotecnologia com uso de micro-organismos.

Conhecidos produtores de compostos com atividade antimicrobiana, os fungos filamentosos tem sido alvo de estudos frequentes desde a descoberta da penicilina e são considerados uma importante fonte de novos compostos antimicrobianos devido à grande diversidade de espécies e diversificação das estruturas químicas dos metabólitos secundários produzidos (NIGAM e SINGH, 2014).

Dentre esses micro-organismos os extremófilos constituem um grupo

relativamente pouco explorado, mas no qual o interesse como fonte de metabólitos secundários tem aumentado, pois são fortes potenciais para produzirem compostos bioativos com estruturas químicas únicas (FURBINO et al., 2014; CHEUNG et al., 2014, TIAN et al., 2017). Estudos prévios em organismos provenientes da região Antártica revelaram diversos compostos bioativos produzidos pelos isolados como alcaloides, ácidos, ésteres e actinomicinas (GONÇALVES et al., 2015; SVAHN et al., 2015; IVANOVA, 2007).

Bactérias isoladas na região demonstraram atividade antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (ROJAS et al., 2009; SHEKH et al., 2011).

Os fungos filamentosos oriundos da Antártica também tem mostrado potencial como nova fonte de compostos e moléculas com propriedades antimicrobianas (DE OLIVEIRA et al., 2011; GONÇALVES, et al., 2015; HENRÍQUEZ, et al., 2014). Em 2015, Gonçalves e colaboradores produziram extratos etanólicos de fungos filamentosos isolados de solo da Antártica que apresentaram atividade antifúngica e antimicrobiana. Em outro estudo, extratos fúngicos produzidos por 101 isolados foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano e mais de 50% dos extratos apresentaram bioatividade (HENRÍQUEZ, et al., 2014)

Recentemente tem sido relatada atividade de metabólitos produzidos por micro-organismos do ambiente antártico contra diferentes espécies do gênero (*X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*). (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015; HENRÍQUEZ et al., 2014; SILBER, et al., 2013)..

Em 2002, Moncheva e colaboradores relataram atividade de actinobactérias isoladas de solo antártico em *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseol*, causadoras de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão, respectivamente (MONCHEVA et al., 2002). A atividade de fungos associados a esponjas coletadas na Antártica contra *X. campestris* foi constatada por Henríquez et al. (2014). Estudos conduzidos em 2014 e 2015 apontam atividade de extratos brutos produzidos por micro-organismos de solo antártico contra as espécies *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*, responsáveis pela mancha-bacteriana nas culturas de tomate e pimentão (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

Tendo em vista a substituição de produtos cúpricos para minimização de danos ao ambiente e considerando a necessidade de medidas alternativas para o controle de fitopatógenos como *X.citri* subsp. *citri*, o trabalho contribui para a busca de compostos bioativos produzidos por fungos isolados da Antártica no combate ao cancro cítrico em frutas cítricas. Para tal, extratos produzidos pelos isolados foram avaliados em triagem quanto à atividade antibacteriana contra *X. citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Recursos Microbianos

Os fungos filamentosos utilizados nesse estudo (12) foram cedidos pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro), tendo sido coletados na Ilha Deception na Antártica e isolados de solos abaixo de madeira podre durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS). Os isolados atualmente fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

O fitopatógeno causador do cancro cítrico, *X. citri* subsp. *citri*, linhagem selvagem 306, foi disponibilizado pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da UNESP de Rio Claro.

### 2.2. Extratos metabólicos brutos

Para a produção dos metabólitos secundários os fungos foram cultivados em meio de cultura ágar malte 2% à 15°C por 7 dias. Após crescimento discos de aproximadamente 5 mm contendo ágar e micélio foram inoculados em erlenmeyers contendo meio de cultura malte 2% líquido e colocados sob agitação à 15°C e 150 rpm por 20 dias.

Após separação entre biomassa e fase líquida por filtração à vácuo, os metabólitos secundários foram extraídos do meio extracelular com acetato de etila por extração líquido-líquido e do meio intracelular via rompimento celular em almofariz na presença de metanol, As frações orgânicas obtidas foram concentradas em evaporador rotativo.

### 2.3. Atividade antibacteriana dos extratos

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foi feita pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) que se baseia na redução da resazurina (corante azul), quando há metabolismo celular, para a substância resorufina, que apresenta cor rosa e é altamente fluorescente (SILVA et al., 2013).

Os extratos brutos secos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% para concentração final de 30 mg/mL e em seguida diluídos para 2,1 mg/mL em meio de cultivo NYG (0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona bacteriológica e 2% de glicerol). A partir dessa concentração partiu-se a microdiluição seriada em microplaca de 96 poços até 0,016 mg/mL.

O ensaio seguiu o protocolo de Silva et al. (2013) com algumas modificações. Para controle positivo (CP) do teste foi utilizado uma solução de canamicina a 20 µg/mL em NYG preparada a partir de solução estoque a 20 mg/mL. Uma solução de DMSO 1% preparada em meio NYG foi usada como controle do veículo (CV). O controle negativo (CN) foi feito diretamente na microplaca.

O inóculo bacteriano foi cultivado em meio NYG líquido a 29 °C e 200 rpm

overnight até densidade óptica ( $D.O_{600}$ ) de 0,8 ( $10^7$  UFC/mL) e então diluído 1:10 em meio NYG e 10  $\mu$ L foram adicionados em cada poço ( $10^5$  UFC/poço). A microplaca foi incubada a 29 °C por 18h, em seguida 15  $\mu$ L de uma solução de resazurina 0,01% (w/v) foi adicionada e a placa novamente levada para incubação à 29 °C por 1 h e trinta minutos.

Após o período de incubação a fluorescência apresentada foi mensurada a 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) usando um espectrômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD. A porcentagem de inibição (%) de cada extrato foi determinada pela fórmula abaixo, onde UF são as Unidades de Fluorescência.

$$\frac{[(Média UF de CN) - (UF do extrato)]}{Média UF de CN} \times 100$$

Consideraram-se efetivas as amostras cuja porcentagem de inibição foi igual ou superior a média do controle positivo, 87%.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito anteriormente, 12 fungos foram avaliados quanto à produção de metabólitos secundários com ação antibacteriana. Esses isolados deram origem a 24 extratos, 12 extratos extracelulares e 12 extratos intracelulares, os quais foram testados quanto à atividade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A Tabela 1 apresenta a média de inibição dos extratos avaliados em 2,1 mg/mL.

Isolado	Extrato*	Média** de Inibição (%)
3MP	i	92,00
	e	89,00
5MP	i	93,00
	e	00,00
6MP	i	85,00
	e	93,00
9MP	i	00,00
	e	00,00
10MP	i	92,00
	e	00,00
10.1MP	i	90,00
	e	00,00
10.4MP	i	93,00
	e	90,00
10.5MP	i	92,00
	e	00,00
10.7MP	i	00,00
	e	00,00
10.8MP	i	89,00
	e	00,00
CMP	i	93,00
	e	95,00
FMP	i	00,00
	e	89,00
Controles		
CP	Canamicina 20 µg/mL	87,00
CV	DMSO 1%	0,00
CN	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	0,00

Tabela 1 – Média de inibição do crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por extratos produzidos por fungos filamentosos de solo antártico

\* i: intracelular e: extracelular. \*\*Média de triplicata.

Como mostra a Tabela 1, 10 isolados produziram pelo menos um extrato com atividade antimicrobiana em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Dentre os 24 extratos, 10 inibiram em 90% ou mais o crescimento bacteriano, 4 extratos apresentaram inibição entre 85 e 89% e 10 extratos não inibiram o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Treze dos 24 extratos testados apresentaram inibição superior ao controle positivo (87%), sendo 8 extratos de origem extracelular e 5 extratos intracelulares.

O extrato extracelular produzido por CMP apresentou a maior inibição do fitopatógenos, 95%, seguido do extrato extracelular produzido pelo isolado 6MP e dos extratos intracelulares obtidos do cultivo de 5MP, 10.4MPi e CMPi, todos com 93% de inibição.

A atividade inibitória de extratos extracelulares condiz com resultados de estudos anteriores em extratos orgânicos de fungos da Antártica. Em 2014, Furbino

e colaboradores relataram atividade de extratos de fungos associados a macroalgas em *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cladosporium sphaerosperum*. Outros estudos denotam atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de fungos isolados de solo e outros substratos (GONÇALVES et al., 2015; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

Embora grande parte das pesquisas em atividade antimicrobiana seja centralizada em moléculas encontradas no meio extracelular devido à facilidade do acesso a esses compostos sem a necessidade de quebra da parede celular, a atividade antimicrobiana não se restringe aos compostos excretados, englobando também moléculas não secretadas, como evidenciam os extratos intracelulares ativos em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

A triagem de extratos bioativos iniciada nesse trabalho teve continuidade para comprovação dos resultados em estudo posterior envolvendo isolados de solo e sedimentos marinhos da região da Antártica e outros fitopatógenos de interesse agroeconômico como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas euvesicatoria* em adição aos testes envolvendo *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, sendo que estes resultados foram recentemente publicados (VIEIRA, et al., 2018; PURIC, et al., 2018).

#### 4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico dos fungos de ambientes extremos como fonte de moléculas naturais com propriedades bioativas assim como a capacidade dos fungos de solo antártico de produzirem compostos capazes de inibir o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, fitopatógeno causador do cancro cítrico.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/20629-6), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 401230/2016-3) e Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP pelos suportes financeiros que possibilitaram a execução deste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. M. do. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 5p. (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 86).
- BITANCOURT, A. A. **Cancro cítrico**. *Biológico*, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.
- CABI, 2017. ***Xanthomonas citri* subsp. *citri***. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. [www.cabi.org/isc](http://www.cabi.org/isc). 2017. Disponível em <[www.cabi.org/isc](http://www.cabi.org/isc)>. Acesso em: 26 de dez. 2017.
- CHEUNG, R. C. F. et al.. **Antifungal and antiviral products of marine organisms**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 8, p. 3475–3494, 2014.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n.12, p. 4022-4034, 2009.
- DE OLIVEIRA, A. G. et al.. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain**. *Biological Control*, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.
- ENCHEVA-MALINOVA, M. et al.. **Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils**. *Biotechnology & Biotechnological Equipments*, v. 28, n. 4, p. 721-727, 2014.
- ENCHEVA-MALINOVA, M. et al.. **Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents**. *First National Conference of Biotechnology - Sofia*. v. 100, p. 216-222, 2015.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), online. **EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System**. 2017. Disponível em: <<http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>> Acesso em 25 set. 2017.
- FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>
- FURBINO, L. E. et al.. **Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula**. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.
- GONÇALVES, V. N. et al.. **Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica**. *Polar Biology*, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.
- GOTTWALD, T.R. et al.. **Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida**. *Phytopathology*, v.92, p.361-377, 2002.
- HENRÍQUEZ, M. et al.. **Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 65–76, 2014.
- IVANOVA, V. et al.. **Microbiaeratin, a new natural indole alkaloid from a *Microbispora aerata* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica**. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. v. 37, n. 2, p. 161-168, 2007.
- JACOB, T. R. **Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante**. Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal), 2009.

- MONCHEVA, P. et al.. **Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica**. Journal of Culture Collections, v. 3, p. 3-14, 2002.
- NAMEKATA, T. **O Cancro cítrico**. In: RODRIGUEZ O, VIÈGAS F, POMPEU JÚNIOR J, AMARO AA. (Ed.). Citricultura brasileira. 2 ed., p.775-786, 1991.
- NIGAM, P.; SINGH, A. **Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites – Fungi**. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Ed.). Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier Ltd, Academic Press, v. 2, p. 570–578, 2014.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Microrganismos endofíticos**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n. 29, p. 62-77, 2002.
- PURIC, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L.B. et al. **Activity of antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria**. Lett. Appl. Microbiol., v. 66, n. 6, p. 530-536, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12875>.
- ROCHA, C. H. B. et al.. **Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus**, Juíz de Fora (MG), Brasil. Revista Espinhaço, p.33-44, 2017.
- ROJAS, J. L. et al.. **Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites**. Marine Genomics, v. 2, n. 1, p. 33–41, 2009.
- ROSSETTI, V. **Identificação do Cancro cítrico**. O Biológico, v.47, p.145-153, 1981.
- ROSSETTI, V. et al.. **Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus**. Fundação Cargill, p. 84, 1993.
- RYAN, R. P et al.. **Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions**. Nature Reviews Microbiology, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.
- SANCHES, A. R. L. et al.. **Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo**. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 52, n. 3, p. 549-566, 2014.
- SEGURA-MUÑOZ, S. I. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesados**. 131p. Tese (Pós-Graduação de Enfermagem em Saúde 43 Pública - Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- SHEKH, R. M. et al.. **Antifungal activity of Arctic and Antarctic bacteria isolates**. Polar Biology, v. 34, n. 1, p. 139–143, 2011.
- SILBER, J. et al. **Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a Calcarisporium Strain**. Marine Drugs, v. 11, n. 9, p. 3309-3323, 2013.
- SILVA, I. C. et al.. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Journal of Bacteriology, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.
- SVAHN, K. S. et al.. **Penicillium nalgioense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B**. Fungal Biology and Biotechnology. v. 2, p. 1-8, 2015.
- TESSMANN, C. **Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição**

**química da xantana.** Pelotas. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.

TIAN, Y. et al. **Secondary Metabolites from Polar Organisms**, Mar. Drugs, v. 15, p. 28, 2017.

TORTORA, G. J. et al.. **Microbiologia**, 10ed, Porto Alegre, 2012.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORÃO, L.G et al. **Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Lett. Appl. Microbiol., v. 67, n. 1, p. 64-71, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12890>.

## ENDOPHYTIC FUNGI OF *ARISTOLOCHIA TRIANGULARIS* CHAM.: A MOLECULAR OVERVIEW

**Andressa Katiski da Costa Stuart**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba - Paraná

**Rodrigo Makowiecky Stuart**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba - Paraná

**Ida Chapaval Pimentel**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba – Paraná

**KEYWORDS:** Endophytes, ARDRA, Diversity, Isolation, Atlantic Forest.

### 1 | INTRODUCTION

Endophytic fungi are endosymbionts that live within plants for at least part of their life cycle without causing apparent disease. These microorganisms have been widely studied due their ability to produce bioactive metabolites with several applications on industry, agriculture and medicine (Strobel *et al.*, 2004). Those compounds may be alkaloids, terpenoids and sterols (Joseph and Priya, 2011), as well antibiotics as penicillin, cephalosporin (Miller *et al.*, 2012), anticancer compounds as taxol, among others (Strobel *et al.*, 2004). They are also able to produce similar metabolites

produced by their plants hosts (Abrahão *et al.*, 2013). For this reason, the knowledge about this type of fungal community is very important, even more on plants with medicinal properties.

*Aristolochia triangularis* vine is largely used in Brazilian folk medicine due its anti-inflammatory, antiseptic, emmenagogue and antipyretic properties. This plant is used to treat diseases as rheumatism, wounds, skin diseases, among others (Correa & Biasi, 2003). Therefore, to evaluate the molecular diversity of endophytic fungi present on this plant, the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) technique was used.

ARDRA is widely used to molecularly group microorganisms, due to its efficacy, simple methodology and because it is cheaper than other methodologies (LV *et al.*, 2015). Microbial diversity of several sources may be evaluated by ARDRA, and this technique is considered valuable to group and characterize fungi and bacteria (Redecker *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 2016). Thus, in this work, we evaluated the molecular diversity of endophytic fungi isolated from *A. triangularis* grown at Atlantic Forest region (Almirante Tamandaré, PR, Brazil).

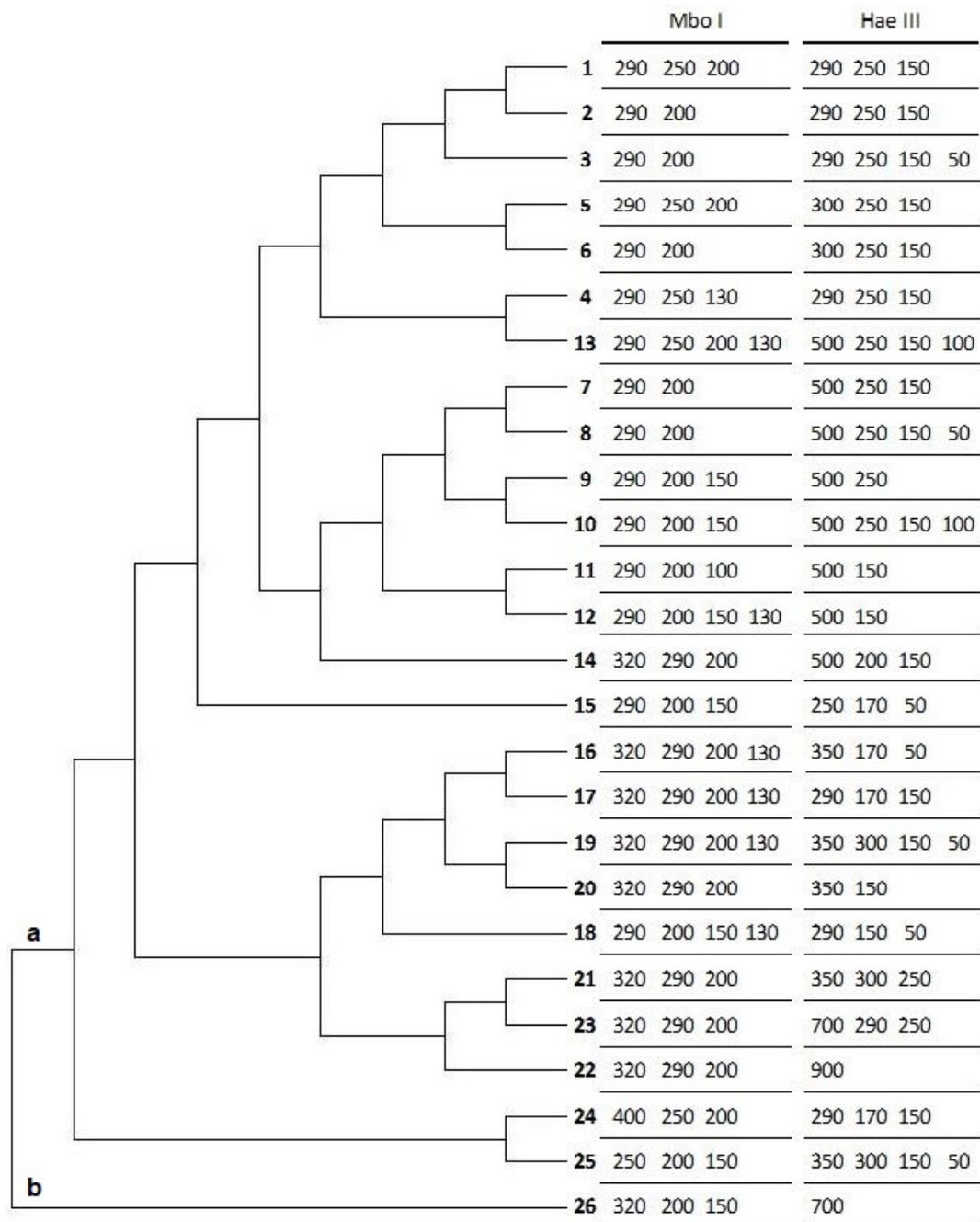
## 2 | MATERIAL AND METHODS

First, we proceeded the isolation of culturable fungal endophytes from different plant tissues like vine, fruit, stem, adult and young leaves. We obtained two hundred and sixty two isolates which were submitted to DNA extraction and PCR targeting the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA (V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA; LS266-R: GCATTCCCAAACAACACTCGACTC). ARDRA was proceeded using *Mbo I* and *Hae III* enzymes. Fungal isolates who presented equal profile in both enzymatic analyses were grouped together.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

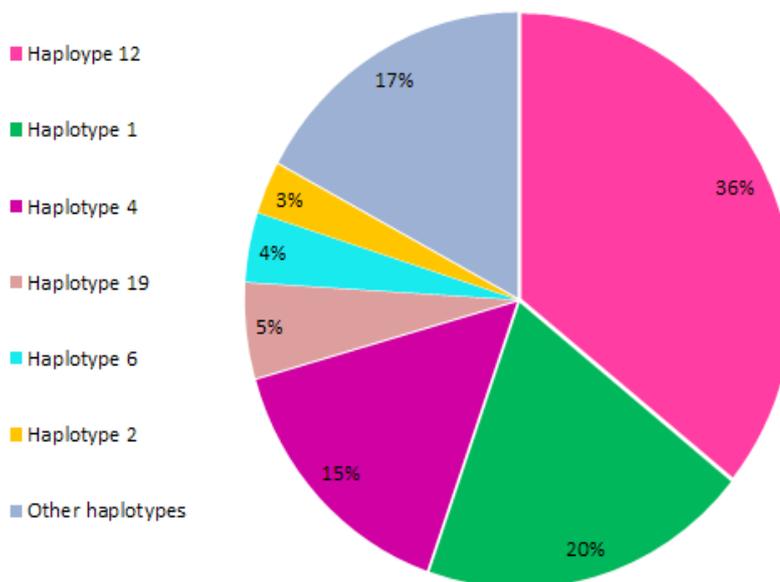
ARDRA identified 26 different fungal haplotypes isolated from *A. triangularis*, named 1 – 26 (Fig 1).

These results show important diversity of endophytes isolates from *A. triangularis*, significantly more than found by Stuart *et al.* (2010). They founded 14 different haplotypes in endophytes isolated from sugar cane. This difference may be associated with kind of culture (monoculture in this case), local of collection, soil chemistry, humidity (Giauque & Hawkes, 2016) and agrochemical application (Bale *et al.*, 2008).



**Fig. 1** Dendrogram of haplotypes obtained with ARDRA and its different molecular weights after ITS gene restriction with *Mbo I* and *Hae III* enzymes.

The most representative haplotypes were 12, with 36% of the isolates, haplotype 1 with 20%, 4 with 15%, 19 with 5%, 6 with 4% and 2 with 3%. Other haplotypes, together, represents 17% of the isolates (Fig 2.).



**Fig 2.** Representative haplotypes obtained with ARDRA. In “Other haplotypes” are the haplotypes 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25 and 26 that were individually responsible for 0 – 2% of the isolates.

Based on the identified haplotypes, Shannon diversity index ( $H'$ ) was calculated, for the fungal community in each plant tissue. Shannon index indicated that vine has the greatest diversity of isolates ( $H' = 2.3393$ ), followed by stem ( $H' = 1.8843$ ), young leaves ( $H' = 1.6756$ ), adult leaves ( $H' = 1.8415$ ) and fruit ( $H' = 1.3718$ ). Many studies show that diversity of endophytes founded in a plant, depends of several factors as plant age (Taylor *et al.*, 1999), isolation tissue, collection season, temperature (Wang & Guo, 2007), among others.

## 4 | CONCLUSIONS

ARDRA provided us important data about diversity of endophytes community of *A. triangularis*, showing big diversity in all the plant tissue tested. However, must be associated to other molecular techniques, as genomic sequencing, to identify these organisms at species level, and for a better knowledge of this communities.

## REFERENCES

ABRAHÃO M. R. E.; MOLINA G.; PASTORE G. M. **Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production.** *Food Research International*. 2013, 52, 367:372.

BALE J. S.; VAN LENTEREN J. C.; BIGLER F. **Biological control and sustainable food production.** Philosophical Transaction of The Royal Society B. 2008, 363, 761:776.

CORREA C. F.; BIASI L. A. Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* CHAM. ET SCHL.). Revista Brasileira de Agrociências. 2003, 9(3), 233:235.

GIAUQUE H.; HAWKES C. V. **Historical and current climate drive spacial and temporal patterns in fungal endophyte diversity.** Fungal Ecology. 2016, 20, 108:114.

JOSEPH B.; PRIYA R. M. **Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review.** American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2011, 1(3), 291:309.

LV S. C.; CHEN Z. C.; JIA R. B.; LIU Z. B.; ZHANG W.; CHEN S. J.; RAO P. F.; NI L. **Microbial community structure and dynamics during the traditional brewing of Fuzhou Hong Qu glutinous rice wine as determined by culture-dependent and culture-independent techniques.** Food Control. 2015, 57, 216:224.

MILLER K. I.; QING C.; SZE D M. Y.; NEILAN B. A. **Investigation of the Biosynthetic Potential of Endophytes in Traditional Chinese Anticancer Herbs.** Plos One. 2012, 7(5), 1:12.

STROBEL G.; DAISY B.; CASTILLO U.; HARPER J. **Natural Products from Endophytic Microorganisms.** Journal of Natural Products. 2004, 67, 257:268

STUART R. M.; ROMÃO A. S.; PIZZIRANI-KLEINER A. A.; AZEVEDO J. L.; ARAUJO W. L. **Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines.** Archives Microbiology. 2010, 192, 307:313.

REDECKER D.; THIERFELDER H.; WALKER C.; WERNER D. **Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales.** Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63(5), 1756:1761.

TAYLOR J. E.; HYDE K. D.; JONES E. B. G. **Endophytic fungi associated with temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range.** New Phytology. 1999, 142, 335:346.

VERMA P.; YADAV A. N.; KHANNAM K. S.; KUMAR S.; SAXENA A. K.; SUMAN A. **Molecular diversity and multifactorious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India.** Journal of Basic Microbiology. 2016, 56, 44:58.

WANG Y.; GUO L. D. **A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*.** Canadian Journal of Botany. 2007, 85, 911:917.

## ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

### **Rebeca Rocha Silva**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

### **Valdiele de Jesus Salgado**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

### **Tatiana Reis dos Santos Bastos**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

### **Pâmela Beatriz Lima Oliveira**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

### **Bruna Luiza Bedoni Italiano**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

### **Gabriele Marisco da Silva**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –  
UESB  
Vitória da Conquista - Bahia, Brasil.

potencial de proteção da planta hospedeira, produzindo compostos tais como enzimas, alcalóides e antibióticos. As plantas medicinais têm sido alvo de isolamento, caracterização e análise da diversidade de fungos endofíticos, devido o seu potencial. Desse modo, o objetivo deste trabalho é o isolamento de fungos endofíticos em plantas medicinais coletadas no município de Itambé-Bahia. Foram utilizadas três folhas saudáveis de cada planta (*Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema), *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso), *Citrus cf aurantium* (Laranja) ) e esterilizadas por imersão em álcool 70%, NaClO 3% e etanol 70%. Feita a assepsia, cortou-se com bisturi, fragmentos de 1cm e inseridas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com 0,2% de extrato de levedura e 100 µg/ml de Tetraciclina, além do controle negativo com alíquotas com água estéril. As placas foram identificadas e incubadas em BOD a temperatura de 28° a 30°, durante 7 dias. Em seguida os fungos crescidos foram repicados em BDA e acondicionados sob mesma temperatura e período, posteriormente foi feita a caracterização macroscópica e microscópica. Obteve-se um total de 11 fungos endofíticos isolados, sendo 1 fungo da *Lavandula angustifolia* Mill, 4 fungos do *Plectranthus barbatus*, 1 fungo do *Plectranthus amboinicus* e 5 fungos do *Citrus cf aurantium*.

**RESUMO:** Os fungos endofíticos habitam o interior de plantas de forma harmoniosa, protegendo-as contra fitopatógenos e induzindo-as à resistência a pragas. Estudos mostram o

Devido a ausência de estruturas de esporulação não foi possível identificar os fungos isolados, sendo necessário novos isolamentos dos mesmos para identificação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais. Isolamento fúngico. Boldo. Hortelã Grosso. Laranja.

**ABSTRACT:** Endophytic fungi inhabit the interior of plants harmoniously, protecting them against phytopathogens and inducing them to resistance to pests. Studies show the protective potential of the host plant, producing compounds such as enzymes, alkaloids and antibiotics. Medicinal plants have been subjected to isolation, characterization and analysis of endophytic fungi diversity, due to their potential. Thus, the objective of this work is the isolation of endophytic fungi in medicinal plants collected in the municipality of Itambé-Bahia. Three healthy leaves of each plant were used (*Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema), *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso), *Citrus cf aurantium* (Laranja) ) and sterilized by immersion in 70% alcohol, 3% NaClO and 70% ethanol. Aseptically, 1-cm-length fragments were inserted into Petri dishes containing BDA (Potato-Dextrose-Agar) with 0.2% of yeast extract and 100 µg / ml of Tetracycline, in addition to the negative control with aliquots of sterile water. Plates were identified and incubated in BOD at 28° to 30° for 7 days. After that, the fungi were grown in BDA and conditioned under the same temperature and period, after which the macroscopic and microscopic characterization was done. A total of 11 isolated endophytic fungi were obtained, 1 fungus from *Lavandula angustifolia* Mill, 4 fungi from *Plectranthus barbatus*, 1 fungus from *Plectranthus amboinicus* and 5 isolates from *Citrus cf aurantium*. Due to the absence of sporulation structures it was not possible to identify the isolated fungi, and new isolates of the same are necessary for identification.

**KEYWORDS:** Medicinal plants. Fungal isolation. Boldo. Hortelã Grosso. Orange.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados, unicelulares ou pluricelulares, de tamanhos e formas variadas, desde muito pequenos visto apenas em microscópios até as formas vistas a olho nu. Em sua maioria são aeróbicos, entretanto, alguns são anaeróbios obrigatórios ou facultativos e se reproduzem por via sexuada ou assexuada (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010; VIEIRA; QUEIROZ, 2012). Estão dispostos no ambiente de forma geral, seja no ar, no solo, na água, sobre plantas e animais vivos ou matéria orgânica morta por isso é considerados como cosmopolitas (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009), além disso, encontram-se na natureza em temperaturas variadas desde as mais elevadas até as muito inferiores, contam com uma larga distribuição, bem como um número enorme de espécies em seu grupo sendo este de 200.000 espécies (COSTA; PEREIRA; JORGE, 2012).

O reino Fungi abrange todos os fungos, isto porque os mesmos foram separados em um grupo devido a falta de características semelhantes às plantas, dentre as

quais estão a ausência de pigmento fotossintético, tecidos verdadeiros, dentre outros (COSTA; PEREIRA; JORGE, 2012). Conhecidos como bolores, mofos, os fungos em sua grande maioria são populares apenas pelos danos que causam aos humanos, seja causando danos à saúde a exemplo de doenças, tais como as micoses, alergias dentre outras; seja prejudicando a agricultura, levando a morte de algumas plantas devido a infecções nos seus tecidos, ou ainda perda de grande parte da lavoura, já que a presença dos fungos não se limita apenas a determinada produção em sua maioria, inclusive podendo atacar os grãos já em estoque; ou também leva à destruição de objetos, como obras de arte (SILVA; COELHO, 2006; MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

Entretanto, os fungos apresentam vários benefícios, sendo estes em indústrias alimentícias na produção de queijos e pães; na indústria de bebidas a como cerveja e vinho, ou também no consumo direto, como os cogumelos que estão sendo amplamente consumidos principalmente em países orientais (SILVA; COELHO, 2006). São responsáveis pela manutenção da biosfera em conjunto com as bactérias, pois os mesmos realizam a atividade de decomposição de matérias orgânicas (COSTA; PEREIRA; JORGE, 2012).

Além dos benefícios supracitados os fungos são importantes na área médica, a exemplo do medicamento penicilina, que é produzido a partir do fungo *Penicillium chrysogenum*; na biotecnologia, muitas enzimas de fungos estão sendo exploradas; no controle de pragas via produção de inseticidas, na área farmacêutica, na área da nutrição, na agricultura, na fitopatologia e em outras áreas (SILVA; COELHO, 2006; MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

Dados baseados em inferências mostram que temos cerca de 99.000 espécies de fungos descritas no mundo, destas aproximadamente 13.800 ocorreriam no Brasil, e têm-se cerca de 584 espécies descritas na Bahia, sendo o quarto estado com maior número de espécies descritas (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010). Uma parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam o interior das plantas, que são os endófitos.

Os microrganismos endofíticos vivem entre as células dos tecidos vegetais, e não provocam malefícios aos tecidos. Este comportamento dos endófitos auxilia no controle biológico de patógenos e pragas, uma vez que, onde eles vivem poderiam disputar por espaço e nutrientes com os patógenos e assim produzirem substâncias tóxicas contra tais patógenos ou ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (BIZI, 2016).

Vários fungos endofíticos associados a plantas produzem substâncias que servem de repelentes naturais contra insetos e nematicidas, auxiliando assim, a planta. Portanto, mesmo com a comprovação da existência da microbiota endofítica, demais pesquisas deverão ser executadas em relação a aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa interação. Porém, antes disto, é importante conhecer a diversidade, presença, frequência e funções destes microrganismos, isto porque não

se tem informações para esclarecer a base biológica dessas interações, é devido ao fato destes microrganismos serem vantajosos no sentido da produção de substâncias (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

De acordo com seu crescimento em meio de cultura, são classificados em cultiváveis ou não cultiváveis (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010). Para Azevedo (1998), de maneira geral, os endofíticos se aderem à planta por aberturas naturais, como estômatos e ferimentos. Após a penetração, os fungos se disseminam de maneira sistêmica, para diversas partes da planta, podendo habitar de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e ainda em alguns casos ocorre colonização intracelular. Os endófitos são de extrema importância biotecnológica, devido à ampla fonte de produtos, sendo úteis na agricultura e na indústria, principalmente na alimentícia e farmacêutica, também podem ser utilizados como vetores para a introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos, além de apresentarem ampla aplicação como antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, antitumorais, entre outras aplicações (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010). Plantas medicinais tem sido alvo de isolamento, caracterização e análise da diversidade de fungos endofíticos, pois representam um considerável reservatório de endofíticos com potencial para descobertas de novas moléculas bioativas (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Portanto, as plantas medicinais são assim denominadas por possuírem tradição em uso por comunidades e pelo potencial de cura ou redução de doenças (TORQUATTO, 2013). O uso destas plantas apresenta relevância inesquecível para as transformações da terapêutica, no que se refere ao uso das plantas medicinais para fabricação de produtos fármacos, e também no uso dos seus princípios ativos isolados para uso como, por exemplo, de fitoterápicos (SIMÃO, 2013), além do fato de que as plantas medicinais são utilizadas na medicina popular desde tempos remotos (CARVALHO, 2012; SIMÃO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas em todo o território, mesmo em regiões distintas. Este uso se justifica não somente por estas plantas apresentarem baixo custo quando comparados aos medicamentos alopáticos, mas por questões culturais (SILVA; SILVA; ANDRADE, 2007). O conhecimento sobre essas plantas surgiu a partir dos saberes populares (BOSCOLO; SENNA VALLE, 2008), assim muitas comunidades tradicionais as utilizam como recurso terapêutico de forma hereditária, pelo fato de apresentarem uma ampla farmacopeia natural (LOPES; PANTOJA, 2012).

Provavelmente, todas as plantas apresentam em seu interior microrganismos endofíticos, até mesmo diversas espécies em um único hospedeiro. Algumas são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designadas dominantes, em contraposição a outras mais raras, chamadas de secundárias. Em alguns casos, constata-se uma especificidade endófito- hospedeiro, em que poucas espécies de fungos são encontradas, enquanto na maioria dos casos, como em *Stylosanthes* e *Musa*, uma

variedade enorme de gêneros e espécies é observada (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; GLIENKE, 1995; AZEVEDO, 1998).

A ocorrência de endófitos varia bastante de acordo com o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

Diante do exposto, considerando a presença de fungos endofíticos em plantas; a importância das plantas medicinais, o seu uso tradicional ser de longa data e de fácil acesso, bem como a associação de fungos endofíticos em plantas medicinais, este trabalho teve por objetivo isolar fungos endofíticos das plantas: *Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema), *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso), *Citrus cf aurantium* (Laranja) de caráter medicinal.

## 2 | METODOLOGIA

A coleta das folhas das plantas: *Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema), *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso), *Citrus cf aurantium* (Laranja), foi realizada no município de Itambé - Bahia (Latitude: 15° 14' 42" S; Longitude: 40° 37' 28" W). Posteriormente foram levadas ao Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia para isolamento dos fungos.

Três folhas saudáveis de um mesmo indivíduo de cada uma das espécies estudadas foram esterilizadas por imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e etanol 70%. Feita a assepsia, cortou-se com bisturi fragmentos de 1cm e inseridas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com 0,2% de extrato de levedura e 100 µg/ml de Tetraciclina, além do controle negativo com alíquotas com água estéril. As placas foram identificadas e incubadas em BOD a temperatura de 28 a 30°C, durante 7 dias.

Em seguida os fungos crescidos foram repicados em BDA e acondicionados sob mesma temperatura e período. Para a caracterização macroscópica avaliou-se parâmetros como cor, dimensão (diâmetro do halo), elevação e margem. Para a caracterização microscópica realizou-se microcultivo a partir da raspagem do fungo e seu esfregaço em meio BDA presente numa lâmina, onde foi acondicionada à temperatura de 28 a 30°C por sete dias, com intuito de obter e identificar as estruturas de esporulação dos endofíticos.

Os fungos isolados foram preservados em água destilada contida em frascos de vidro com tampa de borracha e armazenados em temperatura ambiente, de acordo com a metodologia de Castellani (1939).

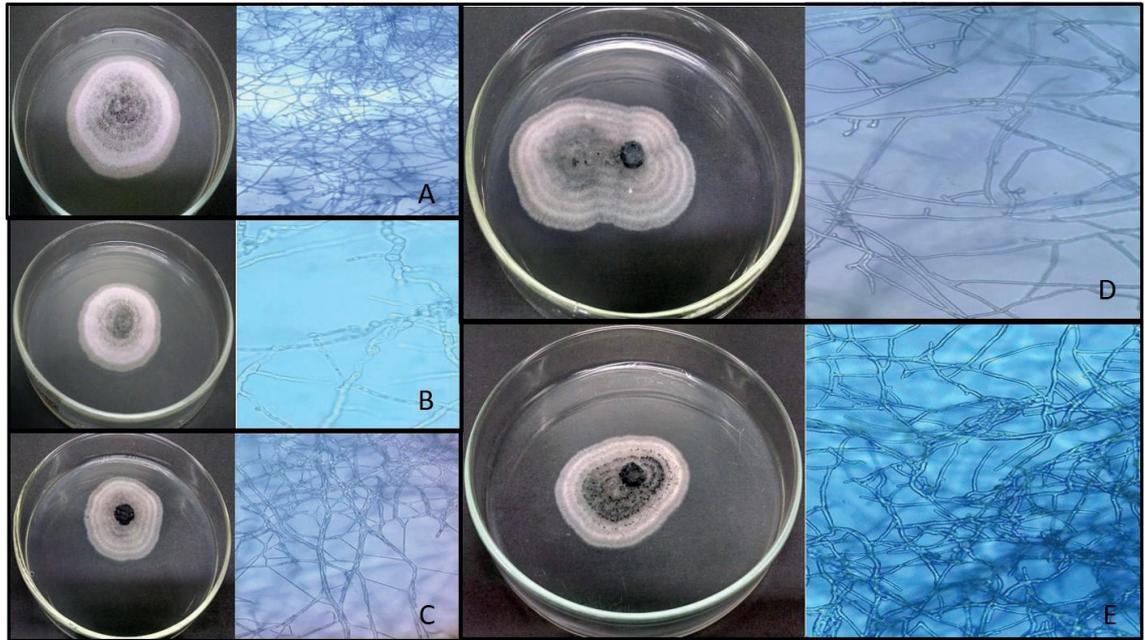
### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não houve crescimento fúngico epifítico, pois o método de desinfestação das folhas foi eficiente, sendo assim obteve-se um total de 11 fungos endofíticos isolados, sendo 5 isolados do *Citrus cf aurantium* (Laranja), 4 fungos isolados do *Plectranthus barbatus* (Boldo), 1 isolado do *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso) e 1 fungo isolado da *Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema). Quanto às características dos fungos de cada uma das plantas, pode-se observar na Tabela 1.

Planta	Características macroscópica	Nº de isolados
Laranja ( <i>Citrus cf aurantium</i> )	1: Cor rosê. Brilho opaco. Margem inteira. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 5,60cm/ Larg. 3,90cm. 2: Cor rosê. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 4,00cm/ Larg. 3,80cm. 3: Cor rosê. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 4,20cm/Larg. 3,40cm. 4: Cor rosê. Brilho opaco. Margem inteira. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 5,50cm/Larg. 5,40cm. 5: Cor rosê. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 4,30cm/Larg. 3,30cm	5
Boldo ( <i>Plectranthus barbatus</i> )	1: Cor Branca. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 4,00cm/Larg. 3,40cm. 2: Cor preta. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação elevada. Compr. 1,80cm/ Larg. 1,90cm. 3: Cor branca. Brilho opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação elevada. Compr. 4,80cm/ Larg. 4,80cm 4: Cor branca. Brilho opaco. Margem inteira. Textura aveludada. Elevação plana. Compr. 4,90cm/ Larg. 4,90cm.	4
Hortelã grosso ( <i>Plectranthus amboinicus</i> )	Cor branca. Brilho opaco. Margem inteira. Textura aveludada. Elevação mamelonada. Compr. 6,00cm/ Larg. 5,80cm.	1
Alfazema ( <i>Lavandula angustifolia</i> Mill)	Cor preta. Brilho Opaco. Margem ondulada. Textura aveludada. Elevação elevada. Compr. 1,00cm/Larg. 0,80cm.	1
<b>Total</b>		11

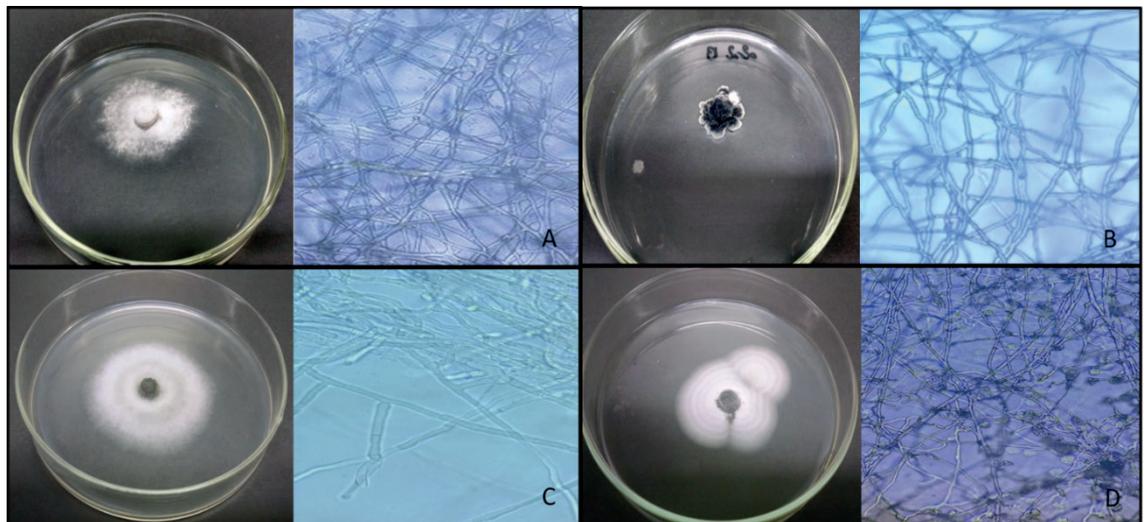
**TABELA 1.** Características morfológicas dos fungos endofíticos obtidos dos repliques.

As plantas que apresentaram mais de um fungo endofítico isolado foram Laranja (*Citrus cf aurantium*) e Boldo (*Plectranthus barbatus*), sendo que para a Laranja (*Citrus cf aurantium*), os 5 (cinco) fungos isolados apresentaram as características macroscópicas de cor, brilho, textura e elevação semelhantes para todos (rosê, opaca, aveludada e plana), bem como comprimento e largura médias de 4,72 e 3,9 cm, respectivamente, e margem ondulada. Em relação às características microscópicas, os isolados apresentaram em geral hifas cenocíticas (Figura 1).



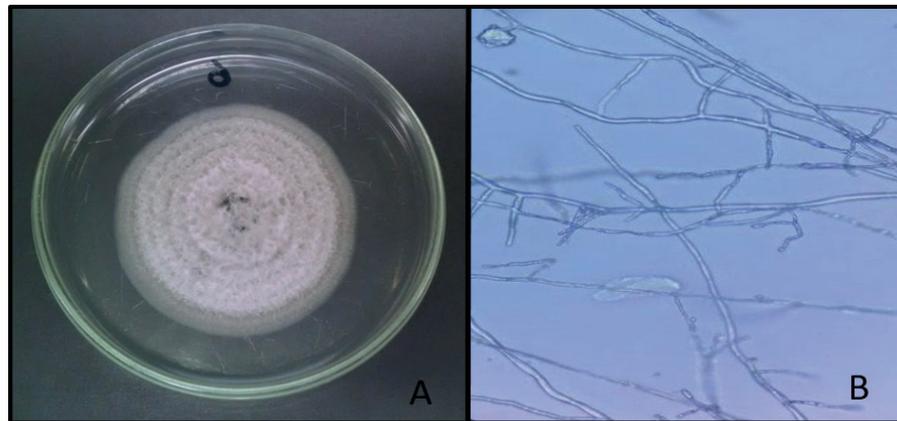
**Figura 1.** Aspecto macroscópico e microscópico (aumento de 40x) dos 5 isolados fúngicos obtidos da Laranja (*Citrus cf aurantium*), representados, respectivamente, em A, B, C, D e E.

Já os fungos isolados encontrados no Boldo (*Plectranthus barbatus*), apresentaram variação quanto às características macroscópicas de cor, forma, margem e comprimento. Em relação às características microscópicas, os isolados apresentaram em geral hifas cenocíticas (Figura 2).

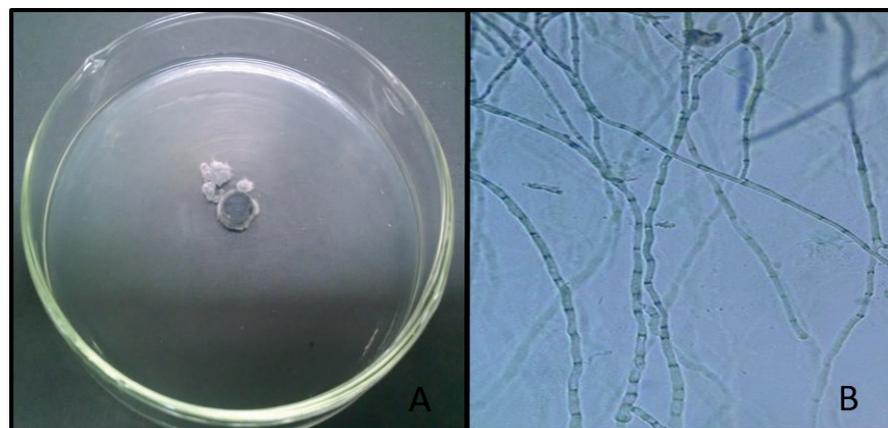


**Figura 2.** Aspecto macroscópico e microscópico (aumento de 40x) dos 4 isolados fúngicos obtidos do Boldo (*Plectranthus barbatus*), representados, respectivamente, em A, B, C e D.

As plantas Hortelã grosso (*Plectranthus amboinicus*) e Alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill) apresentam apenas um fungo endofítico isolado cada uma. Os dados macroscópicos observados podem ser observados na Tabela 1 e Figuras 3a e 4a. Quanto às hifas, Hortelã grosso apresentam hifas cenocíticas (Figura 3b), enquanto que Alfazema apresentaram hifas septadas (Figura 4b).



**Figura 3.** Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B, aumento de 40x) do fungo endofítico do hortelã grosso (*Plectranthus amboinicus*).



**Figura 4.** Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B, aumento de 40x) do fungo endofítico da Alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill).

Com base nas informações obtidas das características macroscópicas obtidas da Laranja (*Citrus cf aurantium*) podemos inferir que os fungos endofíticos isolados da Laranja trata-se de um fungo de mesmo gênero, já que todos os isolados apresentaram as mesmas características macroscópicas.

Entretanto, para as demais plantas testadas, não se pode fazer a mesma inferência pois houve diferença entre as características macroscópicas no Boldo (*Plectranthus barbatus*) para cada isolado obtido e nas demais plantas, hortelã grosso (*Plectranthus amboinicus*) e Alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill) apenas um isolado de cada planta foi obtido.

Portanto, torna-se necessário a realização de métodos moleculares para a real identificação dos fungos isolados obtidos, já que as estruturas de esporulação que tornam possível a identificação se encontram escassas nos isolados obtidos.

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, no entanto apesar da imensa diversidade biológica, as espécies de microrganismos e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos as suas interações com outros seres

(MANFIO, 2002). Em outros trabalhos também houve a ausência de identificação baseada nos dados microscópicos dos fungos endofíticos devido a escassez de estruturas de esporulação (SILVA, 2017; PAUL, 2014; PIMENTEL; FIGURA; AUER, 2010).

Bary (1866) foi quem realizou a primeira descrição destes microrganismos, entretanto houve uma grande pausa, cerca de mais de um século no que se refere a identificação dos mesmos, já que o conhecimento que se tinha não era tão considerável e também por estes organismos serem endófitos e não expor suas estruturas visivelmente dificultava, tanto a identificação quanto os estudos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002), com base nisso pode-se inferir que a pequena quantidade de estudos sobre estes microrganismos se devem pela dificuldade de análise dos mesmos.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante a metodologia utilizada, 11 fungos endofíticos foram isolados das plantas medicinais analisadas, porém não foi possível realizar a classificação dos mesmos. Assim, faz-se necessário o isolamento de fungos endofíticos de *Lavandula angustifolia* Mill (Alfazema), *Plectranthus barbatus* (Boldo), *Plectranthus amboinicus* (Hortelã Grosso) e *Citrus cf aurantium* (Laranja) para a identificação dos mesmos, e associado a isso, avaliar o potencial biotecnológico desses fungos, como ação antagônica frente à fungos/bactérias patogênicos de interesse agrícola e médico, na produção de enzimas e corantes, dentre outras atividades.

#### REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos Endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) Ecologia Microbiana. Ed. EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p.117-137, 1998.

BARY, A. Morphologieundphysiologie der pilze, flechtenundmyxomyceten. Holmeister'sHandbookofPhysiologicalBotany, Leipzig, v. 2, p. 316, 1866.

BIZI, R. M. **Microrganismos endofíticos**. Disponível em: <[http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public\\_html/contbio02.html](http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio02.html)>Acesso em: 22 de Junho de 2018 às 11:25.

BOSCOLO, O. H.; SENNA VALLE, L. **Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil**. IHERINGIA, Série Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277,2008.

CASTELLANI, A. **Viabilityofmoldcultureoffungi in destiledwater**. American Journalof Tropical Medicine andHygiene,v. 42, p. 225, 1939.

CHAVES, R. C.; PEREIRA, R. T. G.; CASTRO, H. A. **Obtenção de isolados de *Cladosporium* com potencial de biocontrole pós-colheita**. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 15., 2002, Lavras: UFLA, 2002.

- CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico – Farmacêutico de Fitoterapia**. São Paulo: Pharmabooks, 3ed., 365p. 2012.
- COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; JORGE, A. O.C. Capítulo 3: **Os fungos**. Microbiologia e Imunologia Oral. Elsevier, p. 29-36, 2012.
- GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely por RAPD**. Dissertação (Mestrado em Genética), Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. P. 96, 1995.
- LACAIVA, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. **Fungos endofíticos: diversidade e aplicações biotecnológicas**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). Fungos: Biologia, Bioquímica e biotecnologia. 2ed. EDUCS: Caxias do Sul, v. 1, p. 533-568, 2010.
- LOPES, G. F. G.; PANTOJA, S. C. S. **Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz – Rio de Janeiro – RJ**. Revista Eletrônica Novo Enfoque, v. 15, edição especial, p. 76-82, 2012.
- MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. DE. Introdução: Os fungos do Brasil. In: FORZZA, R. C., org., *et al.* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 43-48, 2010.
- MANFIO, G. P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil**. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (Org.). Biodiversidade brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo, SP: Contexto, v., p. 113-145, 2002.
- MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L.; **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 4, p. 499, 2009. 496 p.
- OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. **Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, São Paulo, v.8, n.2, p.39-41, 2006.
- PAUL, N. C. LEE, H. B.; LEE, J. H.; SHIN, K. S.; RYU, T. H.; KWON, H. R.; KIM, Y. K.; YOUN, N. Y.; YU, S. H. **Endophytic Fungus from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum***. International Journal of Molecular Sciences, Switzerland, v. 15, n. 9, p. 15272-15286, 2014.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.29, p.62-76, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.pdf>>. Acesso em: 22 de Junho de 2018, às 15:23.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. **Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report**. Mycologia, v. 85, p. 362-364, 1993.
- PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss Por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese do Programa de Pós Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná – Curitiba, p. 141, 2006.
- PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. **Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda***. Summaphytopathology, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.
- RODOLFO, A. M.; CÂNDIDO JR, J. F.; TEMPONI, L. G.; GREGORINI, M. Z. **Citrus aurantium L.**

**(laranja-apepu) e HoveniadicisThunb. (uva-do-japão): espécies exóticas invasoras da trilha do Poço Preto no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná – Brasil.** Revista Brasileira de Biociências, v. 6, supl. 1, p. 16-18, 2008.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. **Biodiversity of Endophytic Fungi in Tropical Regions.** In: Biodiversity of Tropical Microfungi, Hong Kong University Press, Hong Kong, 1997, p. 57-69.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. **Fungalepiphytesandendophytesofcoffealeaves (coffearabica).** Microbial Ecology,v. 50, p. 1-8, 2005.

SILVA, C. G. R.; SILVA, J. L. L.; ANDRADE, M. **Fitoterapia como terapêutica alternativa e promoção da saúde.** Informe-se em promoção da saúde, v. 3, n. 2.p. 15-17, 2007.

SILVA, M. H. R. da. **Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro - Rio Claro, 111 f. 2017.

SILVA, R. R.; COELHO, G D. **Fungos Principais grupos e Aplicações Biotecnológicas.** Instituto de Botânica. São Paulo, 2006.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia, e toxicidade das plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade.** Universidade Federal de Lavras. Tese (Doutorado). Lavras, 182p. 2013.

TORQUATTO, J. **Fitoterapia, vantagens riscos e ação dos fitoterápicos.** São Paulo, 1ed., 2013.

VIEIRA, D. A.P.; QUEIROZ, N. C. A. **Microbiologia Geral.** Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal De Santa Maria, 100 p., 2012.

## PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA MULTIRRESISTENTE ISOLADAS DE COLIBACILOSE EM AVESTRUZ

### **Angela Hitomi Kimura**

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina  
Londrina – Paraná

### **Vanessa Lumi Koga**

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina  
Londrina – Paraná

### **Benito Guimarães de Brito**

Laboratório de Saúde das Aves & Inovação Tecnológica, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor  
Eldorado do Sul - Rio Grande do Sul

### **Kelly Cristina Taglieri de Brito**

Laboratório de Saúde das Aves & Inovação Tecnológica, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor  
Eldorado do Sul - Rio Grande do Sul

### **Gerson Nakazato**

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina  
Londrina – Paraná

### **Renata Katsuko Takayama Kobayashi**

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina  
Londrina – Paraná

indústria de aves, incluindo a estrutocultura. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de virulência por meio da investigação de genes de virulência presentes em *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e *E. coli* diarreiogênica (DEC), e o perfil resistência aos antimicrobianos em amostras de APEC isoladas de colibacilose em avestruz. Nossos resultados demonstraram uma elevada frequência dos 5 genes relacionados à virulência de ExPEC, na qual todas amostras apresentavam o gene *hlyF*, quase todas as amostras apresentaram os genes *iroN* e *ompT* (90.9%), 19 amostras apresentaram *iss* (86.36%), e apenas 1 amostra apresentou o gene *iutA* (4.54%). Duas amostras também apresentaram o gene *eae* (relacionado a DEC), sendo essa amostra classificada como uma amostra de *E. coli* enteropatogênica atípica. De acordo com o perfil de resistência aos antimicrobianos, a maioria das amostras estudadas foram classificadas como multirresistentes (81.8%), sendo as maiores frequências de resistências relacionadas a tetraciclina (86.4%), sulfonamida, sulfametoxazol+trimetoprim e ampicilina (81.8%). Nosso trabalho demonstra que a maioria das nossas amostras de APEC isoladas de colibacilose em avestruz apresentam uma alta frequência de resistência, demonstrando a necessidade de um constante monitoramento quanto a presença de *E. coli* e seus fatores de

**RESUMO:** *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é o agente etiológico da colibacilose aviária, responsável por grandes perdas na

virulência e resistência aos antimicrobianos, visando o controle da disseminação de patógenos multirresistentes na estrutiocultura.

**PALAVRAS-CHAVE:** colibacilose, APEC, avestruz, multirresistência.

**ABSTRACT:** Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the etiological agent of avian colibacillosis, responsible for large losses in the poultry industry, including the strutioculture. The objective of this work was to evaluate the virulence profile by investigating virulence genes present in extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and diarrheogenic *E. coli* (DEC), and the antimicrobial resistance profile in APEC samples isolated from colibacillosis in ostrich. Our results demonstrated a high frequency of the 5 genes related to the virulence of ExPEC, in which all samples harbored the *hlyF* gene, almost all samples harbored the *iroN* and *ompT* genes (90.9%), 19 samples had *iss* (86.36%), and only 1 sample had the *iutA* gene (4.54%). Two samples also presented the *eae* gene (related to DEC), being this sample classified as a atypical enteropathogenic *E. coli*. According to the antimicrobial resistance profile, the majority of the studied samples were classified as multiresistant (81.8%), with the highest frequencies to tetracycline (86.4%), sulfonamide, sulfamethoxazole + trimethoprim and ampicillin (81.8%). Our work demonstrates that most of our APEC samples isolated from ostrich colibacillosis present a high frequency of resistance, demonstrating the need for constant monitoring of the presence of *E. coli* and its virulence factors and antimicrobial resistance, aiming at the control dissemination of multiresistant pathogens in the strutioculture.

**KEYWORDS:** colibacillosis, APEC, ostrich, multiresistance.

## 1 | INTRODUÇÃO

A estrutiocultura é designada como a criação de avestruzes, sendo a sua comercialização no mundo destinada principalmente a produção de carne, mas também a produção de couro, óleo e plumas. A criação de avestruz iniciou-se no Brasil na década de 90, com rápida expansão desta atividade, devido às condições climáticas favoráveis. No entanto, existe uma preocupação com relação ao estado sanitário dessas aves, pois pouco se conhece em relação a participação desses animais como reservatórios de microrganismos. Assim, essas aves são suscetíveis a diversas doenças infecciosas, entre elas a colibacilose (KNÖBL; FERREIRA, 1999).

A colibacilose, causada por *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), é responsável por altos prejuízos para a indústria aviária. A doença ocorre em aves nas formas septicêmicas causando principalmente lesões de aerossaculite, pericardite, peritonite, salpingite e localizada, provocando celulite, síndrome da cabeça inchada e onfalite (BRITO, 2012).

As linhagens patogênicas de *Escherichia coli* podem ser classificadas em ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal), na qual APEC faz parte, e DEC (*Escherichia*

*coli* diarreio gênica), a qual apresentam genes codificadores de fatores de virulência específicos e manifestações clínicas distintas (JOHNSON; RUSSO, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A presença ou ausência dos marcadores moleculares caracteriza DEC em diferentes categorias: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* de adesão difusa) (GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Com o propósito de reduzir os prejuízos devido às doenças infecciosas a prática do uso de antimicrobianos durante a criação das aves tornou-se bastante utilizada com a finalidade de prevenir a ocorrência de infecções bacterianas. Vários estudos têm demonstrado que amostras de *E. coli* isoladas da produção de aves apresentam diferentes perfis de resistência múltipla aos antimicrobianos, os quais são frequentemente resistentes a mais de um antimicrobiano (HASAN et al., 2012; KOGA et al., 2015a).

A elevada taxa de resistência aos antimicrobianos, associada a diversos fatores de virulência tornaram *E. coli* um problema para a avicultura, devido aos prejuízos acarretados na indústria avícola. No entanto pouco se conhece a respeito do perfil de virulência e resistência em *E. coli* isolados de infecções em avestruzes. Este trabalho tem a finalidade de avaliar a presença de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos em amostras de APEC isolados de colibacilose em avestruz, visando o controle da disseminação de patógenos multirresistentes na avicultura.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento das Amostras

Foram estudadas 22 amostras de APEC isoladas de colibacilose em avestruzes. Essas amostras foram isoladas das aves nas agroindústrias do Paraná, no período de 2011 a 2014. Essas amostras pertencem à bacterioteca do Laboratório de Saúde das Aves e Inovação Tecnológica do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

### 2.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

O perfil de sensibilidade a antimicrobianos foi determinado pelo método qualitativo de disco difusão de Kirby-Bauer (1996), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2018).

Os seguintes antimicrobianos foram testados: ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), enrofloxacina (10 µg), sulfonamida e sulfametoxazol – trimetoprim (1.25/23.75 µg) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, Reino Unido).

## 2.3 Pesquisa de Genes de Virulência

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência de ExPEC e DEC, e também para a realização da classificação filogenética. O tamanho e a sequência dos iniciadores são apresentados na **Tabela 1**.

O método de PCR multiplex empregado para a detecção dos genes de virulência de DEC foi descrito por Aranda et al. (2007) e Paton e Paton (2008), com algumas modificações. Nessa metodologia utilizou-se 2.5 µl de DNA em 25 µl de mistura de reação, a qual foi adicionado 1.5 U *Taq* polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), 0.2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP, Invitrogen®, Carlsbad, CA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 2.5 µl de tampão de PCR 10X (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e os primers apropriados (**Tabela 1**). As amostras foram submetidas em um termociclador (Applied Biosystems®), nas temperaturas de anelamento 52°C e 65°C, conforme descrito por Aranda e colaboradores (2007) e Paton e Paton (2008), respectivamente.

Já para a detecção dos genes de virulência de ExPEC, a metodologia adotada é a descrita por Johnson e colaboradores (2008). Foram utilizados tampão (1x), 0.2 mM de dNTP, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM dos iniciadores, 1.25U de *Taq* polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e 1.5 µL de DNA. O material foi submetido a um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, e 68°C por 3 minutos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Além disso, as amostras foram classificadas em 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 ou D), baseando-se na presença ou ausência dos genes *chuA* e *yjaA*, e um fragmento de DNA (TSPE4.C2), seguindo o método de Clermont e colaboradores (2000). Para a reação da PCR foram utilizados 1x de tampão, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTP, 1µM de cada iniciador; 1.25U de *Taq* polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e 2.5 µL de DNA. Esse material foi submetido a um ciclo de 94°C por 4 minutos e 30 ciclos de 5 segundos a 94°C, 10 segundos a 54°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Posteriormente, o produto de amplificação da PCR de cada metodologia foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% e visualizado em transiluminador UV.

Gene	Sequência dos iniciadores (5' a 3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>iroN</i>	AAT CCG GCA AAG AGA CGA ACC GCC T GTT CGG GCA ACC CCT GCT TTG ACT TT	553	
<i>ompT</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	Johnson et al., 2008
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	
<i>iss</i>	CAG CAA CCC GAA CCA CTT GAT G AGC ATT GCC AGA GCG GCA GAA	323	
<i>iutA</i>	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	302	
<i>eaeA</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	917	
<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	
<i>elt</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATCCCTGTT	450	Aranda et al., 2004
<i>est</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	
<i>ipaH</i>	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	
<i>stx</i>	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518	Toma et al., 2003
<i>eaeA</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Paton e Paton, 1998
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	
<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGTAGCTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	
<i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	279	
<i>yjaA</i>	TGAAGT GTC AGG AGA CGC TG ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	211	Clermont et al., 2000
TSPE4.C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	152	

**Tabela 1** - Genes pesquisados para ExPEC, DEC e classificação filogenética, com seus respectivos iniciadores e tamanho

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, estima-se que os prejuízos decorrentes da colibacilose aviária na cadeia produtiva das aves ultrapassem a soma de cem milhões de dólares por ano (BRITO, 2012). *E. coli* é uma das bactérias que tem tido sua virulência associada ao uso de antimicrobianos na avicultura (MANGES; JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013). Porém, ainda há poucos estudos sobre o papel de *E. coli* como importante patógeno em infecções em avestruzes.

De acordo com Clermont e colaboradores (2000), *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) normalmente pertencem ao grupo filogenético B2 e com uma menor frequência ao grupo D, enquanto amostras comensais normalmente pertencem aos grupos A e B1. No entanto, amostras de APEC normalmente pertencem aos grupos filogenéticos A, B1 e D (JOHNSON et al., 2008). Nossos resultados corroboram com esses dados, na qual o grupo mais prevalente nas amostras de avestruz pertenceram aos grupos comensais B1 (77.27%) e A (13.63%), ao contrário do grupo mais virulento D (9.09%) (**Tabela 2**). Esses dados também corroboram com dados sobre APEC isolados de colibacilose em galinhas, como o trabalho publicado por Kobayashi e colaboradores (2011), na qual a maioria das amostras de APEC pertencem aos grupos filogenéticos B1 (30.8%) e A (27.6%).

Johnson e colaboradores (2008) demonstraram que amostras de APEC podem ser distinguidas de *E. coli* de origem fecal em aves por meio da pesquisa de 5 genes codificadores de fatores de virulência, normalmente presentes em plasmídios (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*). Nossos resultados demonstraram a elevada frequência dos 5 genes de virulência de ExPEC pesquisados, a qual todas amostras apresentavam o gene *hlyF*, a maioria das amostras apresentaram o gene *iroN* e *ompT* (90.9%), 19 amostras apresentaram *iss* (86.36%), e apenas 1 amostra apresentou o gene *iutA* (4.54%). Em um trabalho realizado por Knöbl e colaboradores (2001) de 8 amostras de APEC isolados de pneumonia caseosa em avestruz, nenhuma amostra apresentou o gene *hly*. Vários trabalhos realizados com APECs isolados de infecções em frangos demonstraram uma alta frequência desses genes de virulência (KOBAYASHI et al., 2011; SOLÀ-GINÉS et al., 2015; SUBEDI et al., 2018).

Estudos demonstrando a co-existência de fatores de virulência de APEC e DEC na mesma amostra já foram relatados (RAMADAN; AWAD; ATEYA, 2016; MOHAMED et al., 2017). Assim, quanto a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência de DEC, somente 9.09% das amostras continham o gene *eae* (que codifica a intimina, responsável pela aderência íntima da bactéria à célula do hospedeiro), sendo caracterizadas como EPEC (GOMES et al., 2016; ARANDA et al., 2007). A presença ou ausência do gene *bfpA*, subclassifica esta linhagem em EPEC típica e EPEC atípica (GOMES et al., 2016; ARANDA; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2004; TOMA et al., 2003). Nossas amostras não continham o gene *bfpA*, portanto não possuem o plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) o qual é característico de EPEC

típica (ARANDA et al., 2007).

Os demais genes de virulência pesquisados (*elt*, *est* - enterotoxinas de ETEC; *ipaH* - antígeno de plasmídeo de invasão H encontrado em EIEC e *Shigella*; *stx1*, *stx2* - Shiga toxinas 1, 2 de STEC; *ehxA* - enterotoxina de EHEC), não foram encontrados em nenhuma das amostras.

Amostras	CF <sup>a</sup>	Genes Expec					Gene DEC
		<i>hlyF</i>	<i>iutA</i>	<i>iss</i>	<i>ompT</i>	<i>iroN</i>	<i>eaeA</i>
B1		+	-	-	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	+	+	+	+	+
B1		+	-	+	+	+	+
B1		+	-	+	+	+	-
A		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
D		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	-	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
A		+	-	-	-	-	-
D		+	-	+	+	+	-
A		+	-	+	-	-	-
B1		+	-	+	+	+	-
B1		+	-	+	+	+	-
Total		22	1	19	20	20	2

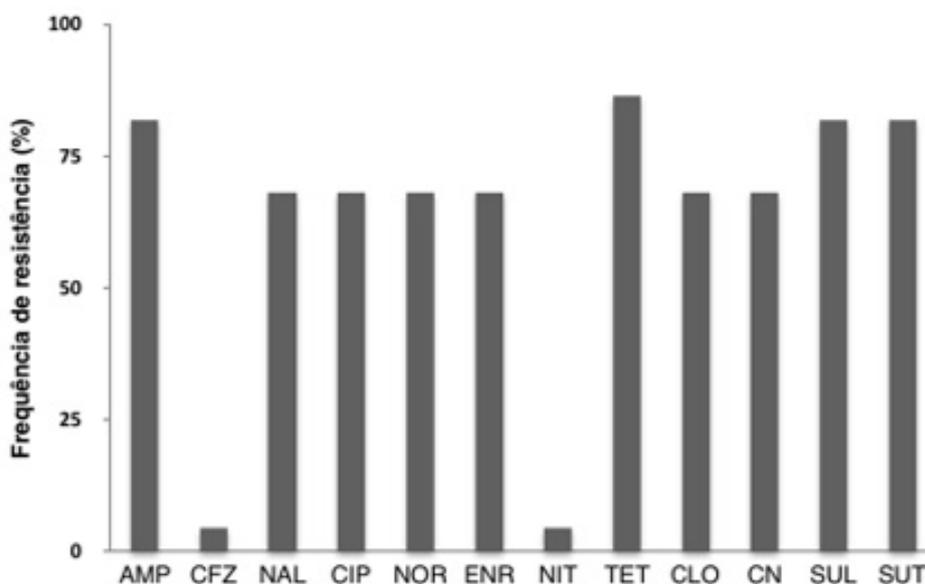
**Tabela 2** – Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência de ExPEC e DEC entre as amostras de *E. coli* isoladas de avestruz.

<sup>a</sup>CF: classificação filogenética

A terapia antimicrobiana é uma importante ferramenta na redução da incidência e mortalidade associados a colibacilose aviária (ŠČERBOVÁ; LAUKOVÁ, 2016). Além da finalidade terapêutica, várias pesquisas evidenciaram os benefícios promovidos pela utilização de antimicrobianos na alimentação animal, sendo estes administrados como aditivos em ração ou na água de beber das aves de granja, em doses subterapêuticas

(GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; PHILLIPS et al., 2004; BRUMANO; GATTÁS, 2009). Porém, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado à seleção de bactérias resistentes. Em relação à resistência antimicrobiana, as amostras isoladas de avestruz apresentaram uma alta frequência de resistência, sendo que 18 amostras apresentaram um perfil de multirresistência, sendo resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos. Em um trabalho realizado na Eslováquia encontraram 90% de *E. coli* isolada de fezes de avestruz resistente a 3 ou mais antimicrobianos (ŠČERBOVÁ; LAUKOVÁ, 2016).

Nossos resultados apresentaram uma alta frequência de resistência principalmente para tetraciclina (86,4%), seguido de sulfonamida, sulfametoxazol + trimetoprim e ampicilina (81,8%) (**Figura 1**). Todas as amostras foram sensíveis para amoxicilina + ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima e cefoxitina. Estudos também realizados no norte do estado do Paraná tem relatado perfil semelhante de multirresistência a estes antibióticos em *E. coli* isolada de carcaças de frango de granja (KOGA et al., 2015a; KOGA et al., 2015b). Isso sugere uma possível semelhança entre a criação e manejo de avestruzes com outras aves de corte.



**Figura 1** – Frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras isoladas de avestruz.

AMP, ampicilina; CFZ, cefazolina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; ENR, enrofloxacina; NIT, nitrofurantoína; TET, tetraciclina; CLO, cloranfenicol; CN, gentamicina; SUL, sulfonamida; SUT, sulfametoxazol+trimetoprim

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados indicam que amostras de APEC isolados de colibacilose em avestruz apresentam um perfil de alta frequência de resistência e genes de virulência. Uma vez que são poucos os trabalhos relacionados ao perfil de virulência e resistência em agentes patogênicos na produção de avestruzes, nosso trabalho

mostra a importância do monitoramento e controle quanto ao uso de antimicrobianos na produção aviária, a fim de obter êxito no tratamento da colibacilose e evitar gastos e perdas na estruoticultura.

## REFERÊNCIAS

- ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A.. **Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella spp.*** Journal of Clinical Microbiology, [s.l.], v. 42, n. 12, p.5849-5853, 1 dez. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.12.5849-5853.2004>.
- ARANDA, K. R. S. et al. **Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children.** Fems Microbiology Letters, [s.l.], v. 267, n. 2, p.145-150, fev. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x>.
- BAUER, A.W., et al. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** American Journal Clinical Pathology, v.45, n.4, p.493-496, apr. 1996.
- BRITO, B.G. **Celulite em frangos.** Revista do Avisite, v.59, p.44-48, 2012.
- BRUMANO, G.; GATTÁS, G. **Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos.** Revista Eletrônica Nutrimine, v.6, n. 3, p.953 – 959, 2009.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 10, p. 4555 – 4558, 2000.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; twenty eight informational supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**; 3rd ed. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA.
- GASKINS, H.R.; COLLIER, C.T.; ANDERSON, D.B. **Antibiotics as growth promotants: mode of action.** Animal Biotechnology, [s.l.], v. 13, n. 1, p.29-42, jul. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/abio-120005768>.
- GOMES, T.A.T. et al. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Brazilian Journal of Microbiology, [s.l.], v. 47, p.3-30, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- HASAN, B., et al. **Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh.** Emerging Infectious Disease, [s.l.], v. 18, n. 12, p.2055-2058, dez. 2012. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120513>.
- JOHNSON, T.J., et al. **Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool.** Journal of Clinical Microbiology, [s.l.], v. 46, n. 12, p.3987-3996, 8 out. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00816-08>.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T.A. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, [s.l.], v. 139, n. 3, p.155-162, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2002.121550>

- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nature Reviews Microbiology, [s.l.], v. 2, n. 2, p.123-140, fev. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- KOGA, V.L., et al., 2015a. **Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil**. Foodborne Pathogens and Disease, [s.l.], v. 12, n. 6, p.479-485, jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2014.1888>.
- KOGA, V.L., et al., 2015b. **Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry**. Biomed Research International [s.l.], v. 2015, p.1-8, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/618752>.
- KOBAYASHI, R.K.T., et al., 2011. **EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in Southern Brazil**. Foodborne Pathogens and Disease, [s.l.], v. 8, n. 5, p.631-634, mai. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2013.1533>.
- KNÖBL, T.; FERREIRA, A.J.P. **Influenza aviária: participação dos avestruzes como fonte de infecção da doença/ Avian influenza: ostriches as a disease infection source**. Rev. Educ. contin. CRMV-SP/Continuous Education Journal CRMV-SP, São Paulo, v. 2, fascículo 3, p. 053 - 058. 1999
- KNÖBL, T. et al. **Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease**. Veterinary Microbiology, [s.l.], v. 83, n. 1, p.71-80, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00403-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00403-5).
- MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R. **Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections**. Clinical Infectious Diseases, [s.l.], v. 55, n. 5, p.712-719, 21 maio 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis502>.
- MELLATA, M. **Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends**. Foodborne Pathogens and Disease, [s.l.], v. 10, n. 11, p.916-932, nov. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2013.1533>.
- MOHAMED, L. et al. **Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria**. Tropical Animal Health and Production, [s.l.], v. 50, n. 3, p.547-553, 21 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1467-5>.
- PATON, A.W., PATON, J.C., **Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>0111</sub>, and *rfb*<sub>0157</sub>**. Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 2, 598-602, 1998.
- PHILLIPS, I., et al. **Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A clinical review of published data**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, [s.l.], v. 53, n. 1, p.28-52, 4 dez. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg483>.
- RAMADAN, H.; AWAD, A.; ATEYA, A. **Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt**. The Journal of Infection in Developing Countries, [s.l.], v. 10, n. 06, p.584-591, 30 jun. 2016. Journal of Infection in Developing Countries. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.7762>.
- ŠČERBOVÁ, J.; LAUKOVÁ, A. ***Escherichia coli* strains from ostriches and their sensitivity to antimicrobial substances**. Polish Journal of Veterinary Sciences, [s.l.], v. 19, n. 2, p.415-423, 1 jan. 2016. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/pjvs-2016-0052>.
- SOLÀ-GINÉS, M., et al. **Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain**. Plos One, [s.l.], v. 10, n. 11, p.e0143191, 23 nov. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/>

journal.pone.0143191.

SUBEDI, M., et al. **Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal.** *Bmc Veterinary Research*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-6, 27 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-018-1442-z>.

TOMA, C. et al. **Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Journal of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 41, n. 6, p.2669-2671, 1 jun. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.6.2669-2671.2003>.

## VÍRUS RÁBICO EM CÃES DOMÉSTICOS E SUA TRANSMISSÃO PARA O SER HUMANO

### **Aline Mendes Balieiro Diniz**

Centro universitário de Volta Redonda – Unifoa  
Volta Redonda – Rio de Janeiro

### **Denise Santos Abelha**

Centro universitário de Volta Redonda – Unifoa  
Volta Redonda – Rio de Janeiro

### **Márcio de Moraes Pereira Rosa**

Centro universitário de Volta Redonda – Unifoa  
Volta Redonda – Rio de Janeiro

### **Sabrina Guimaraes Silva**

Centro universitário de Volta Redonda – Unifoa  
Volta Redonda – Rio de Janeiro

respeito do vírus rábico, nas bases de dados SCIELO, Bireme e PubMed, e em seguida foi aplicado questionário para a supracitada população, verificando a consciência desta sobre a necessidade de vacinação profilática e as formas de transmissão da doença. Sendo assim, a tal população ficará mais bem informada sobre o assunto, tendo uma maior capacidade de se prevenir e detectar casos de raiva quando estas ocorrerem.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vírus rábico; Raiva; Raiva humana; Raiva canina; Cão doméstico.

**RESUMO:** A raiva é uma zoonose viral, que se caracteriza como uma encefalite progressiva aguda e letal. A transmissão da doença ocorre quando o vírus contido na saliva e secreções do animal infectado penetra no tecido do hospedeiro. A importância da conscientização da população sobre a profilaxia e transmissão da doença se deve pelo vírus levar a uma resposta imunológica precária e tardia, favorecendo sua replicação e disseminação. Esse trabalho tem como objetivo identificar dentro da população que possui o cão como animal doméstico as possíveis formas de transmissão do vírus da raiva, visto que a transmissão por cães foi responsável por 75% dos casos de raiva humano notificados no Brasil de 1991 a 2007. Para isso, foi realizada revisão de artigos científicos a

### **INTRODUÇÃO**

A raiva é uma zoonose viral, que se caracteriza como uma encefalite progressiva aguda e letal. O vírus rábico pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e gênero Lyssavirus, e pode infectar todos os mamíferos, desde animais silvestres até cães domésticos. É um vírus de caráter neurotrópico, e sua ação no sistema nervoso central é decorrente da sua replicação nos neurônios. (VIEIRA et al., 2011)

A transmissão da doença ocorre quando o vírus contido na saliva e secreções do animal infectado penetra no tecido do hospedeiro. A mordedura é a principal forma, mas pode ocorrer também pela arranhadura e lambedura

de mucosas ou pele descontinuada. O controle da raiva é efetuado essencialmente através da profilaxia sanitária e varia de acordo com a região do mundo e os hospedeiros reservatórios. (VIEIRA et al., 2011)

O vírus rábico ocorre em todo o Mundo, com algumas exceções, como o Japão, Reino Unido, Nova Zelândia, Antártida, e outras pequenas ilhas como o Havai, onde foi erradicada. A transmissão por animais domésticos é real, sendo criado no Brasil, em 1973, o programa Nacional de Profilaxia da Raiva, visando atuar na promoção e proteção a saúde da população. (MOUTINHO; NASCIMENTO; PAIXÃO, 2015)

Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 1990 a 2009, foram registrados no Brasil 574 casos de raiva humana, nos quais, até 2003, a principal espécie transmissora foi o cão. (QUEIROZ et al., 2009)

A importância da conscientização da população sobre a profilaxia e transmissão da doença se deve pelo vírus levar a uma resposta imunológica precária e tardia, favorecendo sua replicação e disseminação. Nesse contexto, o conhecimento a respeito da vacina e do soro anti-rábico também são de extrema importância, devido a suas peculiaridades, com destaque no fato de que ambos não têm efeito após o aparecimento dos sintomas neurológicos. (MOUTINHO; NASCIMENTO; PAIXÃO, 2015)

## **OBJETIVO**

Esse trabalho tem como objetivo identificar dentro da população que possui o cão como animal doméstico as possíveis formas de transmissão do vírus da raiva, com o intuito de educar a sociedade sobre o vírus rábico, para que se torne possível uma profilaxia adequada e evite uma contaminação generalizada.

## **JUSTIFICATIVA**

Dos 1.271 casos de raiva humano notificados no Brasil de 1991 a 2007, a transmissão por cães foi responsável por 75% desse número. Isso ocorre devido a falta de informação da população a respeito da doença, sua transmissão e seus fatores de risco. Além disso, a evasão de animais silvestres infectados para o meio urbano, devido à devastação dos seus habitats naturais, contribui para que os mesmo transmitam o vírus para os animais domésticos.

## **HIPÓTESE**

Através das informações contidas no respectivo artigo e no questionário distribuído na população, é possível informar os indivíduos sobre os métodos de contágio da

doença rábica, bem como seu meio de transmissão e sua profilaxia. Sendo assim, a população ficará mais bem informada sobre o assunto, tendo uma maior capacidade de se prevenir e detectar casos de raiva quando estas ocorrerem.

## **METODOLOGIA**

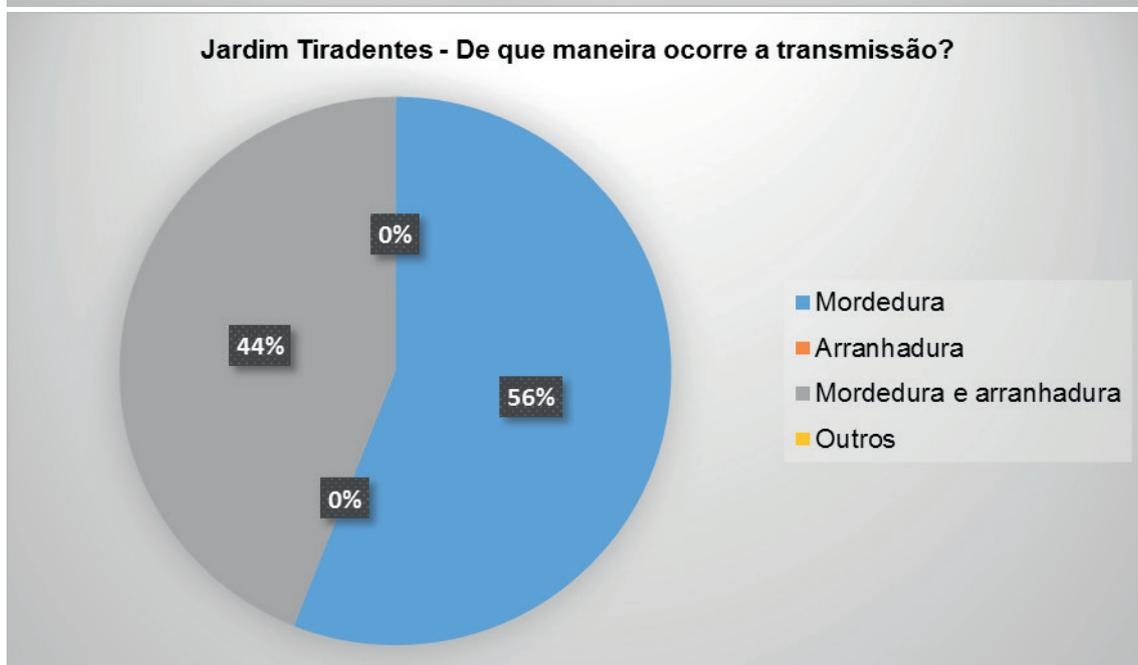
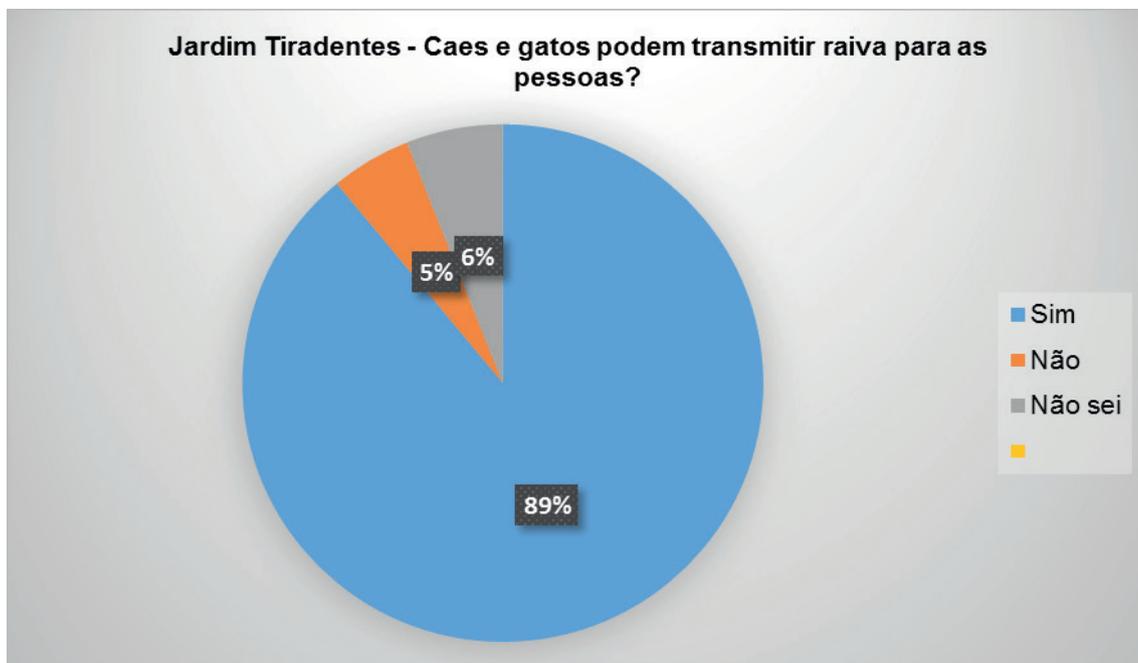
A metodologia do projeto consistirá na revisão de diversos artigos científicos a respeito do vírus rábico, no que diz respeito a sua crescente presença em caninos encontrados em áreas de risco. Também serão utilizados artigos científicos que abordem a Raiva no geral, incluindo suas manifestações, tratamento e sua epidemiologia em animais silvestres e domésticos, para fins de comparação e informação. As bases de dados utilizadas para a pesquisa dos artigos serão SCIELO, Bireme e PubMed. Serão aplicados então 50 questionários para determinada população que possui o cão como animal doméstico, em três bairros da cidade de Volta Redonda. Tal questionário verificará a consciência dessa população sobre a necessidade de vacinação profilática e as formas de transmissão da doença, sendo nove (9) questionários no bairro Jardim Normândia, de característica classe alta; dezoito (18) questionários no bairro Jardim Tiradentes, de característica classe baixa; e vinte e três (23) questionários no bairro Jardim Belvedere, de característica classe média.

## **RESULTADO**

Ao distribuir os questionários no bairro Jardim Tiradentes, cuja população é predominantemente de classe baixa, foi avaliado que 83,3% das residências com animais de estimação possuem um ou dois cães e apenas 16,6% possuem três ou mais. Todavia, apenas 38,8% destes são castrados.

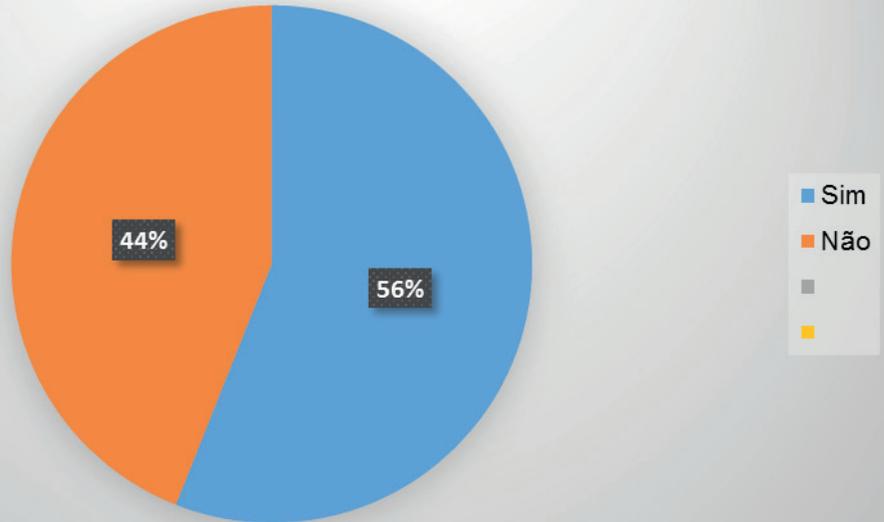
No estudo, foi possível perceber que todos os cães foram vacinados, mas apenas 66,6% tinham todas as vacinas em dia. 72,2% foram vacinados em clínicas, 22,2% em campanhas e 5,5% em outros locais. 55,5% desses animais são levados periodicamente ao veterinário, e o restante apenas quando há uma comorbidade. 55,5% tem costume de passear sozinho na rua. Em 77,7% dos casos, o animal não tem costume de lamber a mucosa dos indivíduos. 61,1% das pessoas relataram que tem muitos cães soltos na rua, mas apenas 45,4% destes referem incômodo com isso.

Ao ser questionado o conhecimento da população sobre a raiva, 89% da população dizem que é possível a transmissão do vírus rábico canino para o ser humano, mas 5% dizem que isso não é possível e 6% dizem não saber sobre o assunto. Todavia, 56% dos indivíduos que acreditam que a transmissão ocorra, relatam que o contágio é feita apenas com a mordedura, sendo que os outros 44% acham que a arranhadura também é fator de risco.

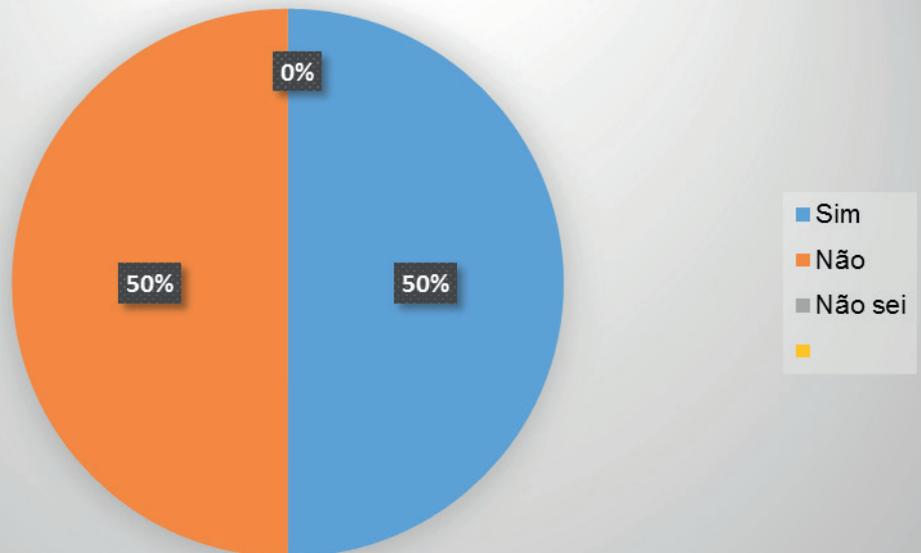


Percebeu-se também um impasse, em que 50% das pessoas acreditam que a raiva tem cura, e a outra metade discorda. 56% já foram mordidos por cães, sendo que todos procuraram assistência médica. As avaliações mostraram que o meio de informação mais utilizado é a internet, com 88,8%, seguida do radio, com 11,1%.

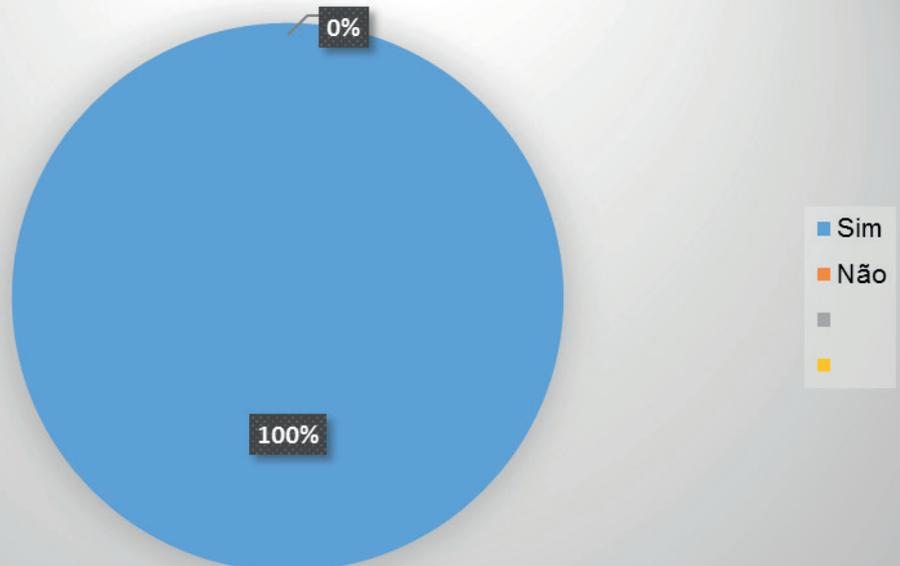
Jardim Tiradentes - Alguém da sua família já foi mordido ou ferido por cão?



Jardim Tiradentes - A raiva tem cura?



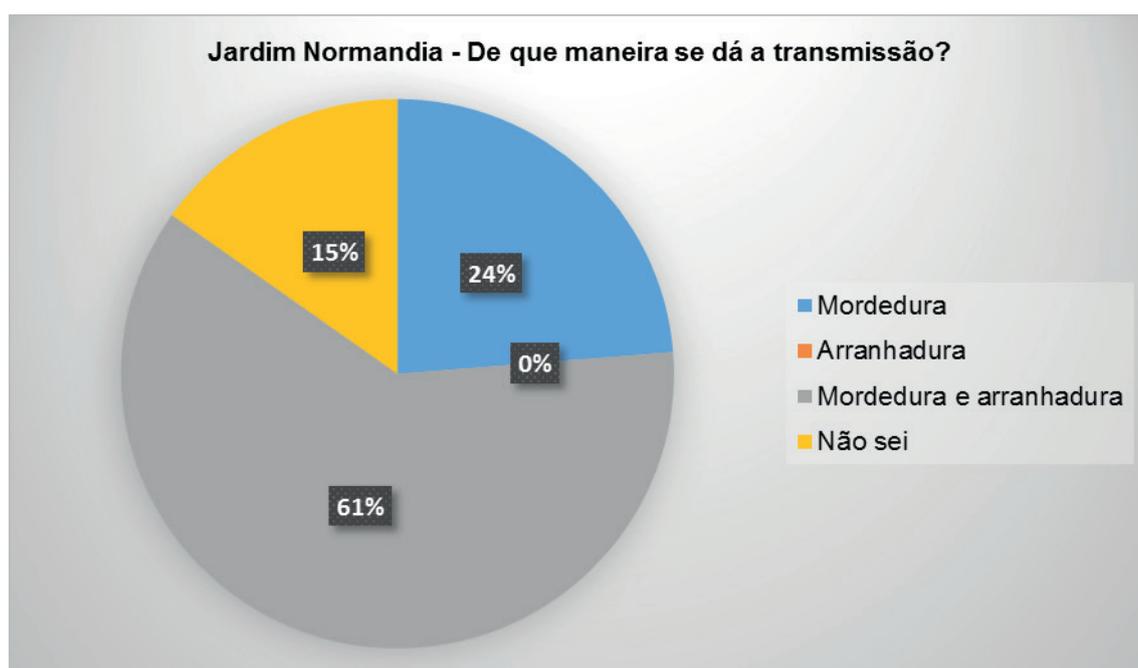
Jardim Tiradentes - Procurou ajuda médica após o acidente?

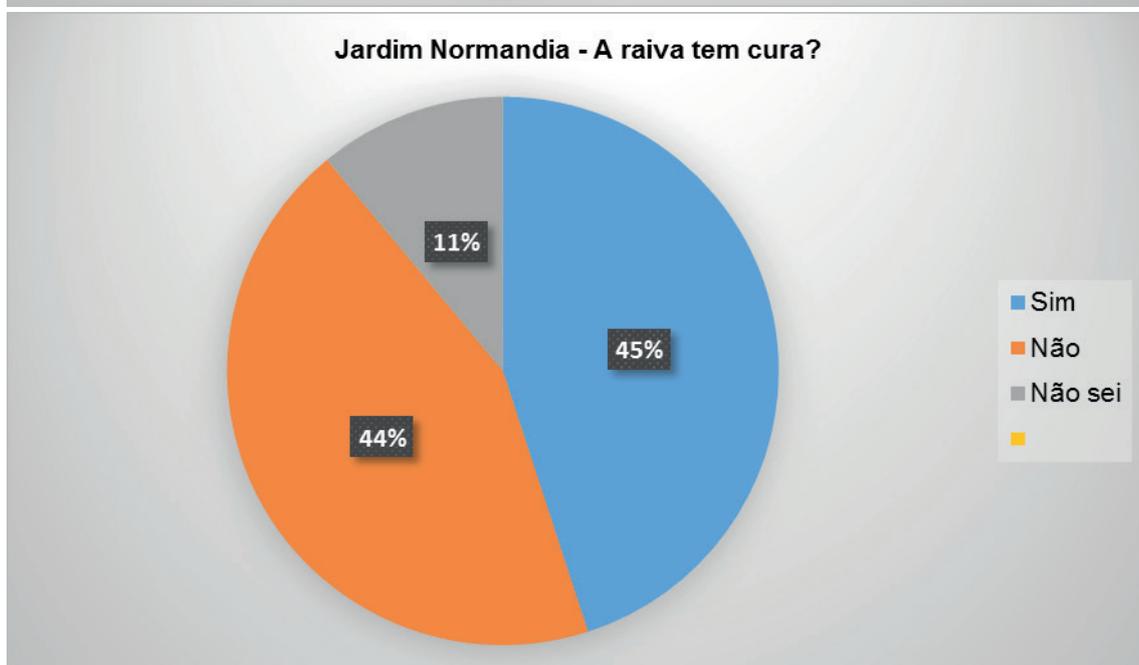
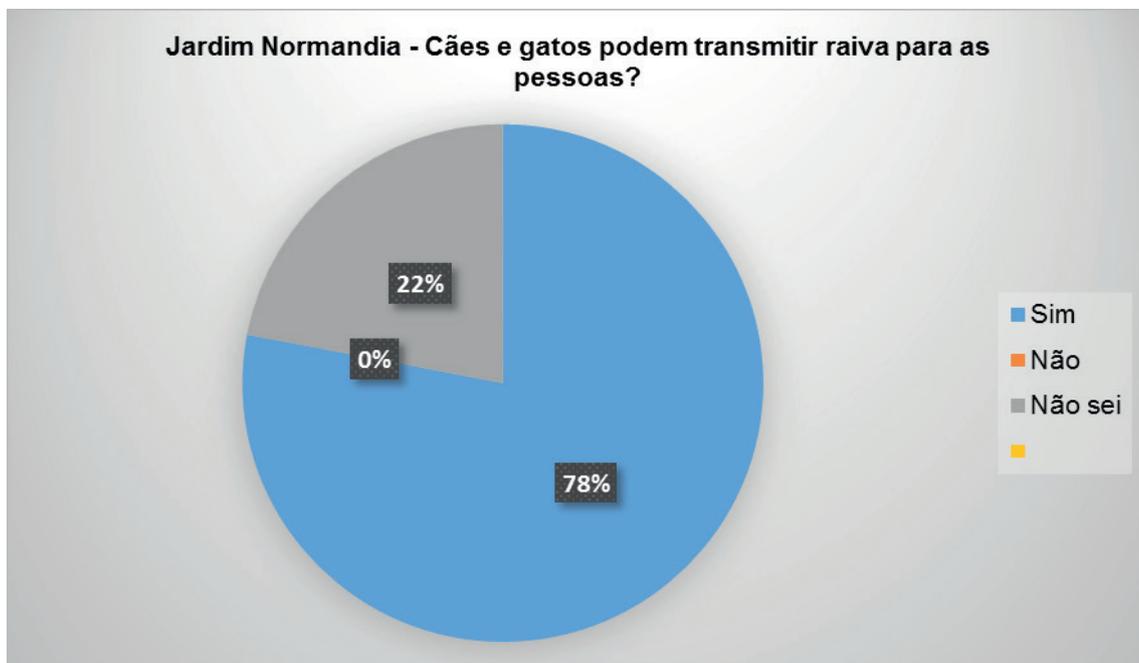


No bairro Jardim Normândia, onde se tem uma população majoritariamente de classe alta, foram distribuídos questionários para moradores que possuíam o cão como animal de estimação, sendo que 100% alegaram possuir de 1 a 2 cães.

Quanto à castração dos mesmos, 77,7% das pessoas afirmaram que seus animais são castrados. Em relação à vacinação, foi observado que a grande maioria (88,8%) desses animais de estimação foram vacinados contra raiva e outras vacinas no último ano, enquanto 11,1% não tomou nenhuma vacina nesse mesmo período. 77,7% dos indivíduos afirmaram que vacinam seus animais em clínicas, 11,1% administram vacinas por conta própria e 11,1% não vacinam os cães. Quanto aos hábitos dos animais, temos que 77,7% desses cães saem à rua; 55,5% são levados ao veterinário periodicamente, enquanto 44,4% só buscam o serviço apenas quando o animal adoecer; 33,3% do cães possuem o costume, ao brincar, de lambe região de mucosa dos moradores.

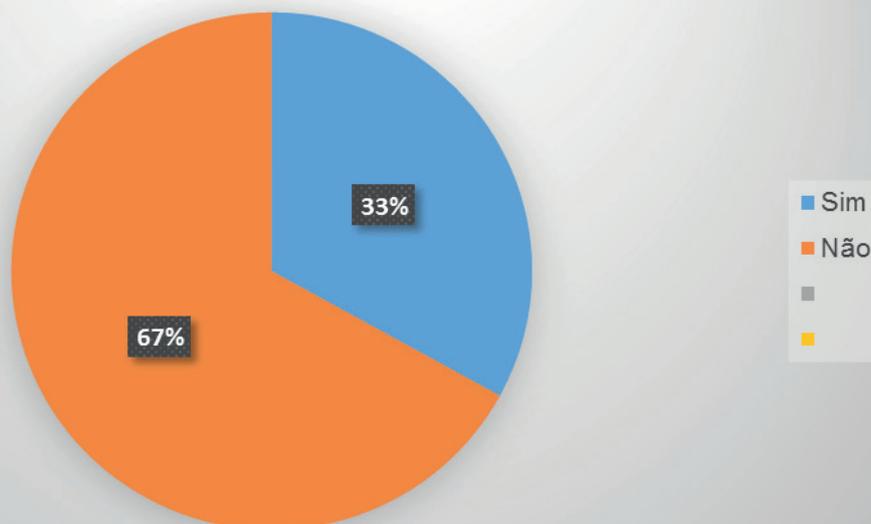
Das moradias pesquisadas, 66,6% das pessoas afirmaram que existem muitos cães soltos na rua no bairro Jardim Normandia, porém nenhuma delas se sente incomodado com a presença destes animais. Nas perguntas que avaliaram o conhecimento da população sobre a existência da cura da doença abordada, houve 45% nas respostas “sim” e 44% nas respostas “não”, com o restante tendo afirmado não saber a resposta, mostrando certo desconhecimento da população sobre a raiva. Quanto à possibilidade de cães e gatos transmitirem a raiva para humanos, a grande maioria (78%) respondeu corretamente que sim, é possível; e quanto ao modo de transmissão, a maioria (61%) também respondeu corretamente, através de mordedura e arranhadura, com 24% tendo respondido apenas por mordedura e 15% afirmando não saber a resposta.



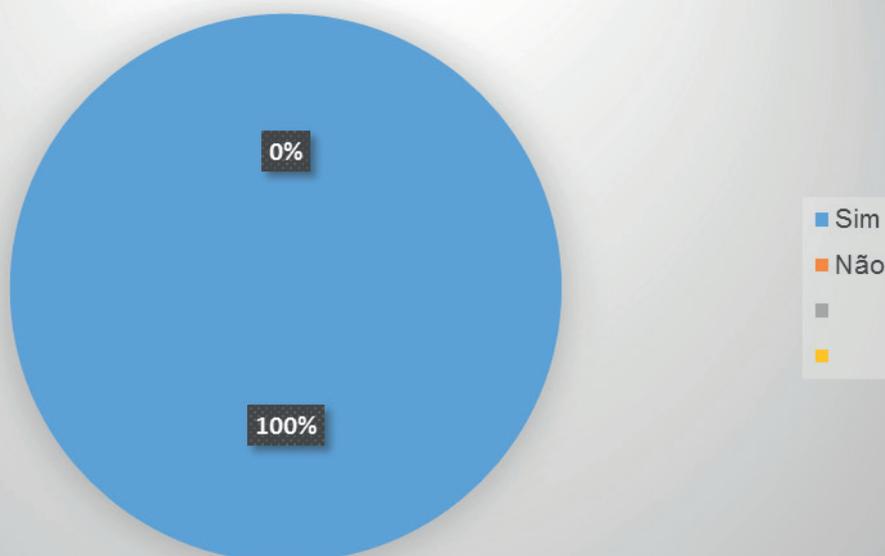


Ao serem indagados se alguém da família já foi mordido ou ferido por cão, 67% dos residentes entrevistados afirmaram que não; já os que afirmaram que sim em sua totalidade responderam que buscaram ajuda médica após o ocorrido. Por fim, ao serem questionados sobre o meio de informação mais utilizado na moradia, 55,5% responderam Internet, 11,1% revistas e jornais e 11,1% rádio.

### Jardim normandia - Alguém da sua família já foi mordido ou ferido por cão?



### Jardim Normandia - Procurou ajuda médica após o acidente?



Para tentarmos ter uma visão socioeconômica mais fidedigna em nossa pesquisa, optamos também pela distribuição dos nossos questionários no Bairro Jardim Belvedere, com predominância em moradores classe média, já que o nosso objetivo é o contraponto proposto nos três bairros. Foram distribuídos 23 questionários às moradias que abrigavam o cachorro como animal de estimação.

Neste bairro pudemos observar, nas casas que possuem cães, que 82,6% delas abrigam de 1-2 desses animais, e apenas 17,3 possuem três ou mais; sendo que 43,4% são castrados e 56,5% não. Quanto à vacinação, 73,9% foram vacinados tanto pela vacina da raiva quanto por outras neste ultimo ano, apenas a vacina da raiva foram 8,6% e 17,3% não foram vacinados. O interessante é que dentre o universo dos cães vacinados todos foram imunizados com a vacina antirrábica. Os participantes da pesquisa que vacinaram seus animais de estimação informaram que 72,8% dessas

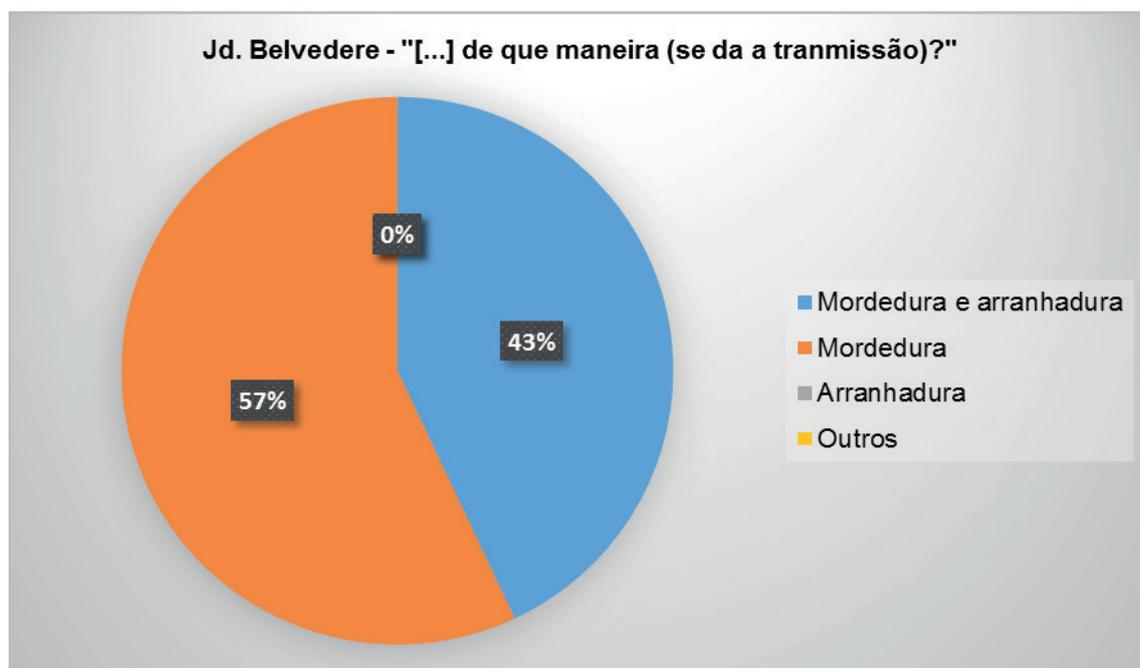
vacinas foram administradas numa clinica veterinária e 13% deles informaram que utilizavam outros métodos (não incluído a campanha e vacinação administrada pelo próprio dono em sua residência).

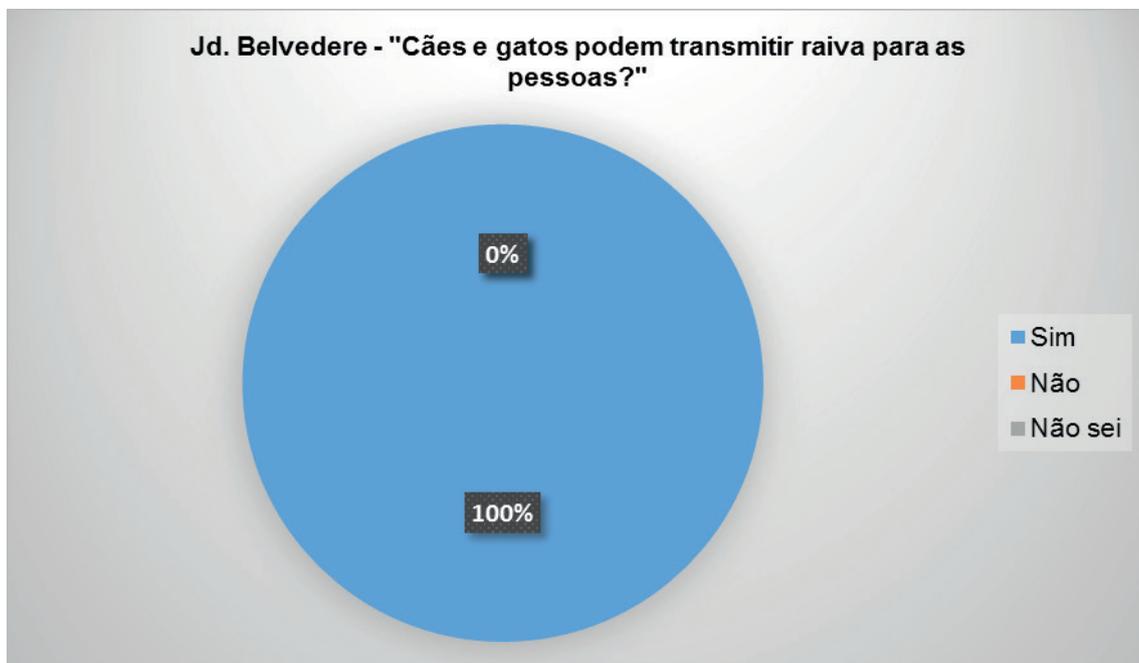
43,4% dos entrevistados informaram não permitir que seu animal saia à rua, enquanto o restante, 56,5% permitiam. Os animais em sua grande maioria são levados periodicamente ao veterinário, correspondendo 73,9%, 4,3% nunca são levados e 21,7 só frequentam quando adoecem.

Em relação ao dono-animal de estimação, 17,3% dos participantes permitem a lambedura por seus cães em suas regiões de mucosas -boca, nariz, olhos-, enquanto 82,6% não permitem.

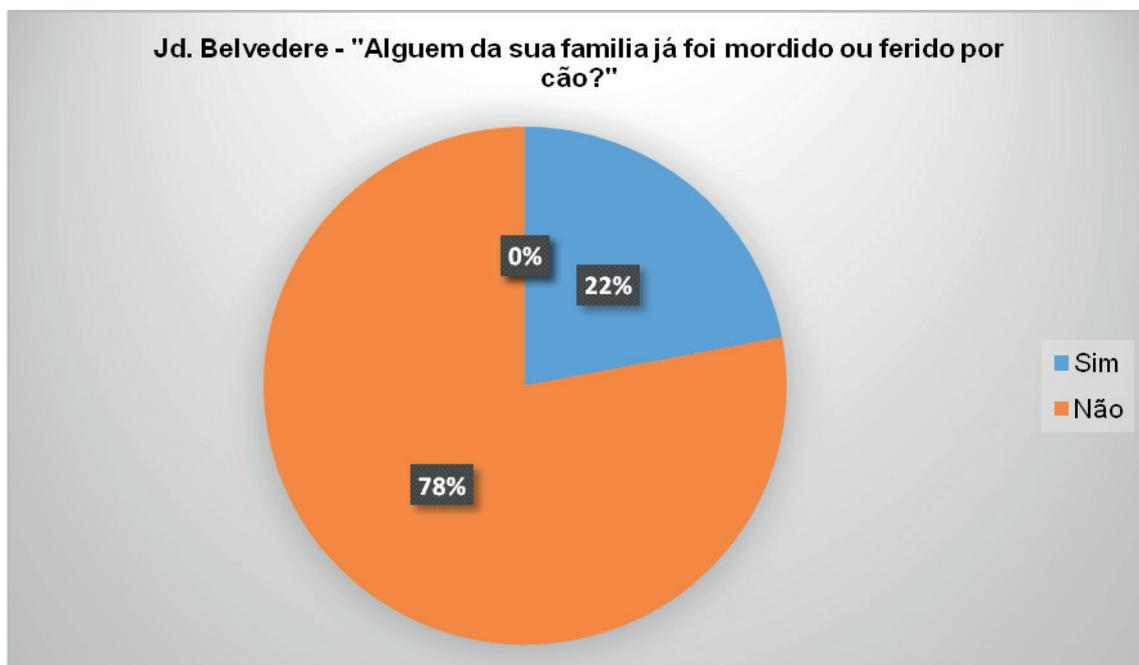
Foi indagado aos participantes se haviam muitos cães soltos em sua rua, 35,7% informaram que sim, enquanto 65,2% não se encontravam na mesma situação. Quanto ao incômodo causado pela presença desses animais, houve um empate, 50% sentiam-se incomodada e a outra metade, não.

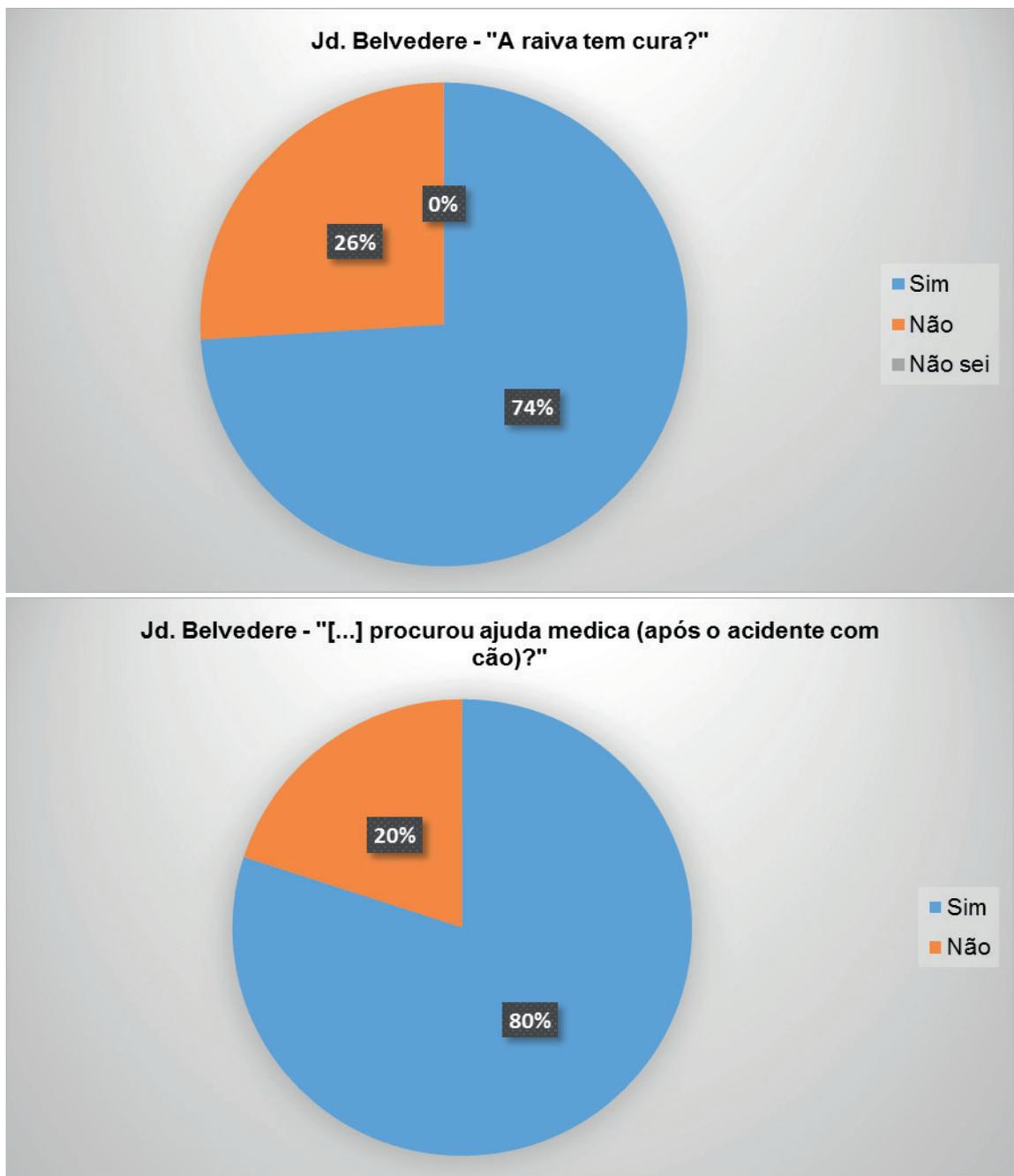
Quanto à possibilidade de cães e gatos transmitirem a raiva para humanos, a totalidade respondeu corretamente que sim, é possível; e quanto ao modo de transmissão, a maioria (57%) respondeu incorretamente (apenas por mordedura), enquanto 43% respondeu corretamente (mordedura e arranhadura).





Num direcionamento maior em nossa pesquisa, dosando o conhecimento geral da população sobre a raiva, podemos perceber que apenas 26% sabiam que a raiva não tem cura, os outros 74% informaram erroneamente que esta doença tem tratamento curativo. 22% dos participantes já foram e/ou tiveram algum parente mordido por cão, 78% relatam não sofrer nenhum ataque; no universo dos que sofreram mordedura 80% procuraram ajuda médica em seguida, 20% julgou não ser necessário.





A população entrevistada do bairro Jd. Belvedere utiliza principalmente a internet como meio de informação, com um total de 82,6%; utilizam a rádio 8,6%, a TV 4,3% e outros meios 4,3%.

## DISCUSSÃO

Ao comparar os três bairros, podemos perceber que a maioria dos indivíduos opta por ter um ou dois cães, sendo que no bairro Jardim Normândia essa escolha foi unanime. A grande maioria deles, todavia, não são castrados, com exceção do bairro Belvedere, em que quase metade (43,4%) são. Ao analisar o numero de vacinas feitas, verificamos que apesar do bairro Tiradentes abrigar uma classe econômica inferior as demais, todos os animais foram vacinados, seja só pela vacina da raiva ou

por outras. Isso não ocorre no bairro Jardim Normândia e Jardim Belvedere, em que 11,1% e 17,3% dos cães, respectivamente, não se vacinaram de nenhuma forma, o que são números altos. Isso pode ser causado pelo fato das pessoas mais humildes se prontificarem a ir a campanhas de vacinação e acabam se informando mais sobre as doenças como a própria raiva.

A grande maioria dos indivíduos buscam na clínica veterinária o meio de vacinar seus bichos de estimação. Sendo assim, é de extrema importância que o local mantenha a sociedade informada sobre as doenças e seus meios de transmissão, evitando assim, o contágio destas, inclusive a raiva, para a população. O bairro Jardim Normândia é o local onde os animais mais saem às ruas, evidenciando uma área de risco a enfermidades, já que há baixa adesão à vacinação canina, aumentando a probabilidade de uma transmissão cão-cão, cão-ser humano.

No bairro Jardim Belverere verificamos uma contradição; apesar de 78,2% dos animais serem vacinados em clínica, 4,3% dos indivíduos nunca levaram seu animal ao veterinário. Um dos fatores que pode explicar este fenômeno é a falta de informação de alguns indivíduos sobre o risco que correm quando seu cão está desprotegido, bem como os meios de contágio da doença. Ao analisar os dados, mais da metade da população do bairro Jardim Normândia relata que o animal tem costume de lambem a mucosa e rosto das pessoas. Ainda neste local, 66 moradores dizem que tem bastante cão solto a rua, mas ninguém se diz incomodado. Já em Jardim Tiradentes, apesar de terem relatos de abundantes animais na rua (61,1%), 45,4% se sentem perturbados com isso. Em Jardim Belverere, 35,7% dos cães estão soltos, mas a grande maioria da população se incomoda com isso.

Ao avaliarmos o conhecimento geral das populações analisadas sobre a doença rábica através das questões de número 4 e 5 do questionário distribuído, observamos algumas discrepâncias. No que diz respeito a possibilidade de cães e gatos transmitirem a doença para humanos, nos três bairros pesquisados a maioria das moradias respondeu corretamente, isto é, que essa transmissão é possível; sendo válido destacar que no bairro Jardim Belvedere, de característica classe média, 100% dos moradores respondeu corretamente, enquanto nos bairros restantes (classe alta e classe baixa) a minoria se dividiu entre as respostas “não” e “não sei”. Quanto ao modo de transmissão, o que se observou foi que nos bairros de classe média e classe baixa a maioria respondeu incorretamente: que essa transmissão é feita apenas pela mordedura. Tal dado se contrastou com o obtido no bairro de classe alta, onde a maioria respondeu corretamente, ou seja, que a transmissão pode ocorrer tanto por mordedura quanto por arranhadura. Esse resultado mostrou que, de uma maneira geral, a população está bem informada sobre a transmissão da doença, com exceção apenas no que diz respeito da possibilidade de transmissão por arranhadura, cujo conhecimento foi menor nos bairros Jd. Belvedere e Jd. Tiradentes. Podemos dizer que 54% da população entrevistada não tem informação correta sobre a transmissão do vírus. Através disso percebemos que as campanhas não estão sendo tão eficientes

quanto deveriam, faltam informações sobre a raiva em colégios e locais públicos, assim como agentes de saúde que informem a população sobre os riscos.

Em relação a existência de uma cura para a raiva, curiosamente foi detectada semelhança nos bairros de classe alta e classe baixa, onde houve empate entre as respostas corretas (“não”) e incorretas (“sim”), com apenas uma resposta “não sei”, no bairro Jd. Normândia. Já no bairro de classe média (Jd. Belvedere), a grande maioria respondeu incorretamente, que havia cura. Confirma-se, então, após a observação desse resultado, a existência de uma importante desinformação, em torno de 40%, a respeito da possibilidade de cura da doença, em todos os três bairros pesquisados. Durante a pesquisa de campo ficou claro a desinformação sobre a funcionalidade da vacina antirrábica, levando-nos a crer que a população entende que a vacina é curativa, não só paliativa.

Ao ser questionado sobre algum familiar mordido ou ferido por cão, os bairros Jd. Normândia e Jd. Belvedere (classes alta e média, respectivamente) obtiveram resultados semelhantes, em que a maioria negou tal acidente. Resultado este que se contrastou com o obtido no bairro de classe baixa, onde a maioria afirmou que já foi lesionado por algum cão, o que mostra uma relação entre classe e ocorrência desse tipo de acidente. Já no que diz respeito à busca de ajuda médica após tais ocorridos, houve homogeneidade nas respostas: os moradores buscaram ajuda especializada.

Por fim, em relação aos meios de informação mais utilizados nas residências, observamos um grande predomínio do uso da internet em todos os bairros pesquisados, sendo o rádio o segundo meio mais utilizado.

## CONCLUSÃO

Ao findar de nossas pesquisas podemos concluir que o nível social da população criou um contraponto em relação ao conhecimento geral sobre a raiva; entretanto, alguns desses dados fugiram um pouco do esperado. Pode-se notar que indivíduos de classe social mais alta desconhecem mais do que os economicamente desfavoráveis, talvez pelo fato da maior porcentagem de mordeduras na classe baixa e conseqüentemente, maior procura por ajuda médica.

Podemos concluir que o conhecimento sobre essa patologia está distribuído de forma difusa e parcial na população. Muitos não sabem como ela é transmitida, e outros desconhecem a possibilidade de adquiri-las. Hodierno ainda é comum o convívio dos seres humanos com animais domésticos, ressaltando a necessidade de uma efetiva campanha sobre a raiva, para que essa população possa se prevenir de forma correta. Vale ressaltar que a importância de maior informação sobre a doença deve abranger não somente a classe mais pobre, como também a mais rica, pois essa é uma doença negligenciada que está dispersa na população como um todo.

## REFERÊNCIAS

MOUTINHO, Flavio Fernando Batista; NASCIMENTO, Elmiro Rosendo do; PAIXAO, Rita Leal. Raiva no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: análise das ações de vigilância e controle no âmbito municipal. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 20, n. 2, p. 577-586, fev. 2015 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232015000200577&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232015000200577&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 1 out 2015.

QUEIROZ, Luzia Helena et al . Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 42, n. 1, p. 9-14, fev. 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822009000100003&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000100003&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 1 out. 2015.

VIEIRA, Luiz F. P et al . Detection of rabies virus nucleoprotein-RNA in several organs outside the Central Nervous System in naturally-infected vampire bats. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 10, p. 922-925, out. 2011 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2011001000014&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011001000014&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 1 out. 2015.

## AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ADUBAÇÕES NITROGENADAS NO CULTIVO DE HORTELÃ VISANDO O APERFEIÇOAMENTO DE SEU SISTEMA PRODUTIVO

### **Kleber Lopes Longhini**

Centro Universitário de Maringá – Unicesumar,  
Ciências Exatas e da Terra, Maringá-PR.

### **Anny Rosi Mannigel**

Centro Universitário de Maringá – Unicesumar,  
Ciências Exatas e da Terra, Maringá-PR.

### **Rafael Egea Sanches**

Centro Universitário de Maringá – Unicesumar,  
Ciências Exatas e da Terra, Maringá-PR.

### **Sonia Tomie Tanimoto**

Centro Universitário de Maringá – Unicesumar,  
Ciências Exatas e da Terra, Maringá-PR.

**RESUMO:** O cultivo de plantas medicinais com a finalidade de cura de algumas doenças já existe há vários anos, tendo em vista o menor tempo para se chegar ao produto final que a planta medicinal oferece, a praticidade e principalmente, o baixo custo, sendo dessa forma acessível a todas as classes sociais. É neste contexto que a Hortelã se destaca como uma importante planta para utilização na fitoterapia. A *Mentha sp* assim como algumas outras plantas é uma fonte promissora de antioxidante natural. Foi com o intuito de buscar mais informações sobre a produção em escala comercial de plantas medicinais que está pesquisa foi realizada, onde teve como objetivo analisar a produção de biomassa vegetal. O projeto foi desenvolvido na fazenda Biotec, no

Centro Universitário de Maringá – Unicesumar, localizada no município de Maringá-PR, o delineamento foi inteiramente casualizados com 15 repetições para cada tratamento. Concluiu-se que a planta medicinal Hortelã responde significativamente ao fornecimento de adubações, gerando um aumento de produtividade das plantas e que realizar adubações durante o cultivo de Hortelã é uma alternativa interessante para o produtor visando atender em escala comercial a demanda por compostos fitoterápicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomassa, Nitrogênio, e Óleo Essencial.

**ABSTRACT:** The cultivation of medicinal plants for the purpose of curing some diseases has existed for several years, taking into account the shortest time to reach the final product that the medicinal plant offers, the practicality and especially the low cost, and is thus accessible to all social classes. It is in this context that the Hortelã stands out as an important plant for use in phytotherapy. *Mentha sp* as well as some other plants is a promising source of natural antioxidant. It was with the intention of seeking more information on the commercial scale production of medicinal plants that this research was carried out, where it had as objective to analyze the production of vegetal biomass. The project was developed at the Biotec farm, in the

University Center of Maringá - Unicesumar, located in the municipality of Maringá-PR, the design was completely randomized with 15 replicates for each treatment. It was concluded that the medicinal plant Hortelã responds significantly to the supply of fertilizers, generating an increase of productivity of the plants and that to make fertilizations during the cultivation of Hortelã is an interesting alternative for the producer aiming to meet on a commercial scale the demand for phytotherapeutic compounds.

**KEYWORDS:** Biomass, Essential Oil, Nitrogen.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos primórdios da humanidade o homem provavelmente observou os animais algumas vezes e em outras fez uso da sua própria intuição para usar uma ou outra planta como agente curativo. Freire (2004) aborda que o que parecia surtir efeito positivo era divulgado e reproduzido por pessoas da comunidade, dando início assim ao início do uso de plantas medicinais com o objetivo de combater doenças.

Segundo Ferreira (2003), o cultivo de plantas medicinais com a finalidade de cura de algumas doenças já existe há vários anos, tendo em vista o menor tempo para se chegar ao produto final que a planta medicinal oferece, a praticidade e principalmente, o baixo custo, sendo dessa forma acessível a todas as classes sociais.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde em 2012 estima-se que 70 a 90% da população mundial preferiam o uso das plantas medicinais ou seus extratos nos cuidados à saúde, e que 80% não tinham acesso aos medicamentos industrializados. Em muitos casos, Rates (2001) aborda que a adesão às plantas medicinais natural ocorre por curiosidade, cultura familiar ou ainda pela insatisfação com as práticas convencionais.

É neste contexto que a Hortelã se destaca como uma importante planta para utilização na fitoterapia. A *Mentha sp* assim como algumas outras plantas é uma fonte promissora de antioxidante natural, pelo fato de possuir uma infinidade de compostos, além disso pode servir como vermífugo entre outras funções. Chagas (2013) menciona que os maiores interesses econômicos nas espécies de *Mentha* ocorrem devido à exploração comercial dos óleos essenciais, substâncias complexas com polimorfismo químico.

Com a crescente demanda pela procura das plantas medicinais, iniciaram-se os estudos para aumentar sua produtividade, e uma das formas estudadas para que isso ocorra é a aplicação de adubações minerais, orgânicas e organominerais, como fontes de nutrientes para as mesmas.

Segundo Corrêa et al (1998) o cultivo, quando mal conduzido, pode gerar plantas de uso medicinal com produtos ativos em quantidades pequenas, tornando a sua comercialização inviável por incrementar as quantidades de substâncias consideradas tóxicas.

A realidade é que muito já se sabe em termos de produção de alimentos, mas muito pouco sobre cultivo de plantas medicinais. Há muito que aprender, sendo um campo fértil para estudos futuros. As poucas informações existentes denotam uma grande diversidade de reações, algumas plantas respondem positivamente, algumas são indiferentes, enquanto outras aumentam o nível de determinada substância e diminuem de outras no mesmo indivíduo.

Foi com o intuito de buscar mais informações sobre a produção em escala comercial de plantas medicinais que esta pesquisa foi realizada, onde teve como objetivo analisar a produção de biomassa vegetal mediante a aplicação dos tratamentos contendo adubos nitrogenados, avaliar qual a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizado, avaliar a produção de óleo essencial no caule e nas folhas das plantas mediante os tratamentos realizados.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida na fazenda Biotec, localizada no município de Maringá-PR, na área destinada ao cultivo de plantas medicinais. Maringá possui um clima chamado de subtropical, tendo média anual de 22°C; e semi-úmido, com média de 1.590 mm anuais de chuva. As temperaturas mais baixas são entre os meses de maio a julho, enquanto as temperaturas mais altas são entre novembro a março (Koppen & Geiser 1928).

A semeadura das plantas de Hortelã foram plantadas em vasos de plástico de coloração preta, com capacidade de 8 dm<sup>3</sup> de solo, constituindo uma unidade experimental. Constituindo os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 – Testemunha (sem adição de adubos)

Tratamento 2 – Adubação Orgânica (100 kg.ha<sup>1</sup> de Nitrogênio, pela aplicação de 10 t.ha<sup>-1</sup> de cama de frango)

Tratamento 3 – Adubação organomineral (100 kg.ha<sup>1</sup> de Nitrogênio, pela aplicação de 5 t.ha<sup>-1</sup> de cama de frango + 238 kg.ha<sup>1</sup> do adubo Sulfato de Amônio)

Tratamento 4 – Adubação Mineral (100 kg.ha<sup>1</sup> de Nitrogênio, pela aplicação de 476,20 kg.ha<sup>1</sup> do adubo Sulfato de Amônio)

A dosagem dos tratamentos foi definida tendo como base a necessidade nutricional da planta de Hortelã em relação ao nitrogênio, que se satisfaz com 100 kg.ha<sup>-1</sup> (Correa Júnior. et al., 1991).

O Delineamento foi inteiramente casualizado com 15 repetições para cada tratamento.

O solo trabalhado presente no vaso foi coletado na própria fazenda, onde o mesmo apresenta a seguinte classificação: Latossolo Vermelho ácrico distrófico, com 200, 200 e 600 g kg<sup>-1</sup> de areia, silte e argila, respectivamente (Embrapa 2013).

Os tratamentos foram separados em canteiros para facilitar o manejo dos vasos

e das plantas, totalizando 4 canteiros de 25m<sup>2</sup> com 15 vasos cada. Os vasos foram colocados sobre estes canteiros, onde se deu o cultivo das plantas por quatro meses, sendo que após o fim desse período foi feita a coleta das plantas para avaliação da produção de biomassa e de óleo essencial.

Segundo análise química realizada na cama de frango, a mesma apresenta como principal característica o teor de 1% de nitrogênio.

Durante seu cultivo, verificou-se a ocorrência de algumas pragas como a vaquinha (*Diabrotica speciosa*), falsa medideira (*Trichoplusia ni*) e lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*). Ambas as pragas foram combatidas com caldas orgânicas feitas caseiramente e aplicadas através de um pulverizador costal. As duas caldas utilizadas foram respectivamente feitas com extrato de pimenta e de cebola.

Os valores de biomassa seca utilizados para análise estatística foram obtidos através da pesagem da parte aérea da planta que foi levada para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65 graus Celsius até atingir peso constante.

Os valores de óleo essencial foram obtidos através do equipamento SOHX LET por um sistema de refluxo que teve como solvente o álcool. Conforme o álcool ia lavando a planta, o óleo retirado das folhas e do caule ficava retido em um Becker. A pesagem da amostra de planta utilizada foi feita antes e após o processo e com a diferença obteve-se o valor de óleo produzido por amostra, depois de feito isso, através de uma regra de três simples chegou-se na quantidade de óleo produzida por planta

Será realizada a análise de variância dos dados obtidos ( $p < 0,05$ ) e aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, para as variáveis respostas que apresentarem diferenças significativas (Banzatto e Kronka, 2008). Sendo analisadas através do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

As características avaliadas no projeto foram teor de óleo essencial no caule das plantas de hortelã, teor do óleo essencial nas folhas das plantas de hortelã e massa seca das plantas de hortelã. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tratamentos	Biomassa*	Teor de Óleo essencial nas folhas*	Teor de Óleo essencial nos caules*
Tratamento 1	2,432919 d	2,314608 b	1,972437 b
Tratamento 2	4,477313 c	3,621700 b	3,190341 b
Tratamento 3	8,092365 b	8,033127 a	6,609661 a
Tratamento 4	11,321306 a	8,290068 a	8,089976 a
Teste F	78,355*	89,447*	38,348*
CV(%)	14,48	11,58	18,75

Tabela 1. Características no desenvolvimento de Hortelã (*Mentha sp.*)

As letras são referentes a análise estatística e ao teste Scott-Knott.

O \* é referente à transformação dos dados feita no Sisvar pela fórmula  $(x^{0.5})$

Com relação a produção de óleo essencial no caule não houve diferença significativa entre o fornecimento do adubo mineral pelo tratamento 4 e o tratamento 3 de esterco bovino, porém, ambos aumentaram significativamente a produção de óleo essencial no caule das plantas de hortelã em comparação com o tratamento 1 e 2. Provavelmente esse aumento de produtividade se deu devido à baixa relação C/N (8,6/1) do tratamento 3, que está relacionado a velocidade da liberação e disponibilidade dos nutrientes contidos no adubo para as plantas absorverem em um processo conhecido como mineralização. Essa pequena relação C/N do tratamento 3 faz com que os nutrientes sejam disponibilizados para planta em torno de 20 dias após sua aplicação e considerando o tratamento 4, por ser um adubo mineral, ele disponibiliza os nutrientes para as plantas absorverem em poucos dias (Possato 2010).

Resultados semelhantes a estes foram encontrados por outros pesquisadores, Stevenson (1982) e Shalaby & Khattab (1993) demonstraram que doses elevadas da combinação NPK aumentaram o teor de óleo das plantas em função do aumento do diâmetro das glândulas de óleo.

Materiais com alta concentração de carbono, mas pouco nitrogênio (alta relação C/N) geralmente são lentamente mineralizados e induzem deficiência de nitrogênio às plantas ou baixa disponibilidade deste nutriente para as mesmas, pois os microrganismos absorvem grande parte do N disponível, o qual só volta a ser disponibilizado após a decomposição do material adicionado, enquanto que materiais com baixa relação C/N são rapidamente mineralizados e disponibilizados para a planta absorver (Mielniczuk 1999).

Outro fator que pode ter resultado no aumento de produtividade das plantas é o fornecimento de enxofre juntamente com nitrogênio, uma vez que a fonte mineral fornecida foi o sulfato de amônio contendo 24% de S. A relação entre nitrogênio e enxofre foi tratada, entre outros por Guedes et al. (2000) e Braga (2001), possibilitando

ganho na produção e na qualidade das plantas. Estes autores ressaltaram que a utilização eficiente do nitrogênio está relacionada ao uso de adubos portadores de enxofre e mostraram a importância do equilíbrio entre as quantidades de nitrogênio e enxofre no crescimento e no estado nutricional das plantas.

O tratamento 2 não apresentou diferença significativa em comparação com o tratamento 1, provavelmente devido sua relação C/N (14,7/1) no adubo orgânico, fazendo com que a velocidade de liberação dos nutrientes para as plantas seja menor do que a dos tratamentos 3 e 4, demorando assim para liberar os nutrientes para as plantas absorverem por volta de 40 dias após sua aplicação. Contudo, Moraes (2006) ao utilizar diferentes doses de cama de frango no cultivo de *Ocimum basilicum* verificou alteração no teor de linalol em comparação com sua testemunha.

Se tratando do óleo essencial avaliado das folhas de hortelã, o tratamento 3 não teve diferença significativa em comparação com o tratamento 4, porém, ambos aumentaram significativamente a produção de óleo essencial nas folhas de hortelã em comparação com o tratamento 2 e o tratamento 1. Isso provavelmente está ligado à velocidade de liberação dos nutrientes contidos nesses adubos para as plantas absorverem, conforme já foi explicado da discussão dos resultados da extração do óleo essencial do caule.

Do ponto de vista econômico e ambiental, o tratamento 3 é uma alternativa interessante para o produtor, tendo em vista que ele usa 50% do adubo mineral utilizado no tratamento 4 e que os outros 50% são fornecidos através do esterco bovino encontrado em propriedade rural, dando desta forma um destino correto a um dos resíduos do sistema produtivo.

O tratamento 2 apesar de ter apresentado menores resultados do que os tratamentos 3 e 4, apresentou um aumento significativo em comparação com o tratamento 1. Seus baixos valores provavelmente se deram devido à lenta liberação dos nutrientes para as plantas. Uma vez que, embora a relação C/N seja baixa, a disponibilização dos nutrientes provavelmente ocorreu cerca de 30 dias após a aplicação do esterco, enquanto que o adubo mineral provavelmente liberou os nutrientes para as plantas em poucos dias.

Augusto et al., (2015) encontraram resultados semelhantes, onde o manjeriço aumentava significativamente a produção de óleo essencial com a adição de cama de aviário. Pode haver incremento no rendimento de óleo essencial por planta com o aumento dos níveis de nutrientes disponíveis no solo (SILVA et al., 2006). Entretanto, esta resposta varia de acordo com a espécie, pois em *Achillea millefolium* não houve alteração do rendimento de óleo essencial com as doses de adubo orgânico (Ming, 1998).

Um fator que pode ter contribuído para que os resultados de produtividade não fossem ainda maiores é o fato de que a planta medicinal de Hortelã é uma planta rústica, com pouca interferência do melhoramento genético.

Por fim ao avaliar a massa seca obteve-se que a fonte que proporcionou os

resultados mais altos para a planta de hortelã foi o adubo mineral do tratamento 4 devido a velocidade de liberação dos nutrientes para as plantas. Berté et al. (2010) comprovaram que a liberação de N é mais rápida na adubação mineral do que em materiais orgânicos sólidos, quando comparou adubações orgânicas e minerais na cultura do milho (*Zea mays L.*). Os autores salientam que, para ocorrer à liberação de nutrientes, no caso da adubação orgânica sólida, existe a necessidade de mineralização desses compostos, só após o que, então, haverá a disponibilidade para as culturas.

Em relação ao tratamento 3, Albuquerque et al. (2010) comentam que a associação das adubações mineral e orgânica é uma prática que contribui para a otimização da adubação das culturas.

O tratamento 2 apesar de apresentar resultados mais baixos que o tratamento 3 e 4, teve resultados significativos em comparação com o tratamento 1. Para pequenos produtores que não tem condições de investir dinheiro com uma adubação mineral, a utilização do esterco bovino, que é um subproduto da bovinocultura, se torna uma alternativa interessante.

Segundo Pinto et al. (2001), a prática da adubação orgânica, além de fornecer nutrientes às plantas, proporciona melhoria das propriedades físicas do solo, como aumento da retenção de água, redução de erosão, controle biológico devido à maior população microbiana e melhoria da capacidade tampão do solo. Também aumenta a CTC, eleva o pH e mantém processos dinâmicos responsáveis pela produção de hormônios vegetais e outras substâncias estimuladoras do desenvolvimento e resistência das plantas. No entanto, a adubação orgânica tem a desvantagem de, ao ser usado em grande quantidade (nos primeiros anos), tornar oneroso o processo de produção.

Resultados semelhantes ao do tratamento 4 foram encontrados por outros autores, Arabacy & Bayram (2004) avaliando o efeito da fertilização nitrogenada e diferentes densidades de plantas sobre as características agrônômicas e tecnológicas de *O. basilicum*, verificaram que a fertilização nitrogenada elevou a massa seca foliar. Ferreira et al (2016) encontraram resultados positivos elevando-se a dosagem de nitrogênio para a cultura de *Ocimum basilicum L.*

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a planta medicinal Hortelã responde significativamente ao fornecimento de adubações, gerando um aumento de produtividade das plantas. Realizar adubações durante o cultivo de Hortelã é uma alternativa interessante para o produtor visando atender em escala comercial a demanda por compostos fitoterápicos.

O fornecimento de nutrientes para a planta (principalmente nitrogênio) resultou em um aumento na produção de massa seca da planta (folhas e caule) e um aumento

de produção de óleo essencial tanto do caule quanto das folhas. Além disso, para aplicação do nitrogênio na cultura da Hortelã, recomenda-se a utilização do adubo organomineral, que apresentou os melhores resultados.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque, A.W.; Rocha, E.S.; Costa, J.V.; Farias, A.P.; Bastos, A.L. 2010. **Produção de helicônia Golden Torch influenciada pela adubação mineral e orgânica.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental v.14, n.10, p.1052–1058, 2010.

Arabacy, O.; Bayram, E. **The effect of nitrogen fertilization and different plant densities on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil).**Journal of Agronomy, v, 3, n.4, p.255-262, 2004.

Augusto, J.; Pôrto, D. R. Q.; Blank, A. F.; **Rendimento de manjeriço, para a produção de óleo essencial rico em linalol, sob efeito de diferentes doses de cama de aviário,** Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Vol 10, Nº 3 de 2015.

Banzatto, Ariovaldo D.; Kronka, S. N. **Experimentação agrícola.** 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2008. 237 p.

Berté, L.N.; Castagnara, D.D.; Bulegon, L.G.; Kuhl, J.A.; Eninger, E.M.; Santos, L.B.; Vendrame, J.P.; Oliveira, P.S.R.; Neres, M.A.; (2010) **Associação da adubação química e orgânica na produção de milho para silagem no Oeste do Paraná.** In: 28ª Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia, 2010.

Braga, G.J. **Resposta do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq.) a doses de nitrogênio e intervalos de corte .** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2001. 121p.

Chagas, J. H.; Pinto, J. E. B.; Bertolucci, S. K. V.; Costa, A. G.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; **Produção, teor e composição química do óleo essencial de hortelã-japonesa cultivada sobre malhas fotoconversoras.** Revista de Horticultura Brasileira.,v. 31, n. 2, p. 297-303, 2013.

Corrêa, A. D.; Siqueira, B. R.; Quintas, L. E. M; **Plantas Medicinais – Do Cultivo á Terapêutica,** 1998.

Embrapa, **Sistema brasileiro de classificação de Solos, 3ª Edição, 2013.**

Ferreira, F. D. **Sisvar: a computer statistical analysis system.** Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

Ferreira, Z. **Recomendações técnicas para a agropecuária de Rondônia: manual do produtor.** Embrapa, 2003.

Ferreira S. D.; Bulegon L. G.; Yassue R. M.; Echer M. M.; **Efeito da adubação nitrogenada e da sazonalidade na produtividade de *Ocimum basilicum* L.** Revista brasileira de plantas medicinais. vol.18, pg 67-73. 2016.

Guedes, L. M.; Graça, D. S.; Morais, M. G. **Influência da aplicação de gesso na produção de matéria seca, na relação nitrogênio: enxofre e concentrações de enxofre, cobre, nitrogênio e nitrato em pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, 2000.

Köppen, W.; Geiger, R. **Klimate der Erde.** Gotha: Verlagcondicionadas. Justus Perthes. 1928.

Luz J. M. Q.; Morais T. P. S.; Blank A. F.; Sodré A. C. B.; Oliveira G. S.; **Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango**. Horticultura Brasileira: p. 349-353, 2009.

Mielniczuk, J.; **Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas**. Ecosistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, p. 1-8, 1999.

Ming, L. C. et al. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônoma** v.1, p.1-22, 1998.

Ministério Da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

Pinto J. E. B.; Castro N. E. A.; Bertolucci S. K. V.; Pinheiro R. C.; **Cultivo e produção de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: FAEPE. 2001.

Possato, M. A.; Universidade Federal de Lavras: **Fertilizantes orgânicos: usos, legislação e métodos de análise**. Lavras/MG, Boletim Técnico - n.º 96 - p. 1-90, 2014.

Rates, S. M. K. **Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia**. Revista Brasileira Farmacognosia, 2001.

Shalaby, A. S.; Khattab, M. D. **Cultivation of *Melissa officinalis* in Egypt**. Acta Horticulturae, n.331, p.115-20, 1993.

Silva, F.G. **Influence of manure and fertilizer on *Baccharis trimera* (Less)**. Journal of herbs Spices & Medicinal Plants, v.12, n.1/2, p.1-11, 2006.

Stevenson, F. J.; **Humus chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 443p, 1982.

## AVALIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SOLO ALUVIAL ÀS MARGENS DO RIO UVU, CURITIBA-PR

**Victoria Stadler Tasca Ribeiro**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Curitiba-PR

**Silvia Schmidlin Keil**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Curitiba-PR

**RESUMO:** Solos aluviais são pouco desenvolvidos e constituídos por depósitos de sedimentos fluviais recentes. O rio Barigui tem parte de seu percurso situado em Curitiba, percorrendo 18 bairros, entre eles, Santa Felicidade. O bairro é banhado pelo rio Uvu, que deságua na bacia do Barigui, exercendo influência sobre a poluição hídrica da mesma, também interferindo em parâmetros do solo nas proximidades do rio. Objetivou-se analisar as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo aluvial do rio Uvu, verificando os índices de atividade, diversidade, uniformidade e riqueza dos microrganismos desse solo e a influência da sazonalidade. Foram realizadas 10 coletas (5 no verão e 5 no inverno de 2015), em 4 pontos distintos do rio, em profundidade de 0-5 cm. Amostras do solo foram cultivadas em ágar nutriente e ágar Sabouraud e submetidas a análises de atividade respiratória, pH, matéria orgânica e textural. Os microrganismos cultivados foram separados em morfoespécies

e em agrupamentos para contagem. Os maiores valores de abundância de bactérias foram no ponto Uvu IV,  $56,7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  solo (no inverno) e no ponto Uvu I,  $52 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  solo (no verão). Já para fungos, os maiores valores foram  $38,7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  solo no ponto Uvu I e  $36,5 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  solo no ponto Uvu IV, ambos no verão. Constatou-se que as comunidades microbianas podem ter sido afetadas pela sazonalidade e interferência antrópica, ocorrendo em menores quantidades no inverno, possivelmente associadas à localização dos pontos com melhor conservação de vegetação e maiores índices de matéria orgânica no solo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Matéria orgânica do solo. Microrganismos do solo. Sazonalidade.

**ABSTRACT:** Alluvial soils are poorly developed and are made up of deposits of recent fluvial sediments. The Barigui river has part of its route located in Curitiba, covering 18 neighborhoods, among them, Santa Felicidade. The neighborhood is surrounded by the Uvu river, which flows into the Barigui watershed, exerting influence on its water pollution, also interfering with soil parameters in the proximity of the river. The objective of this study was to analyze the physico-chemical and microbiological properties of alluvial soil of the Uvu river, verifying the activity, diversity,

uniformity and richness index of the microorganisms of this soil and the seasonality influence. Ten samples were collected (5 in the summer and 5 in the winter of 2015), in 4 distinct points of the river (at 0-5 cm depth). Soil samples were cultivated on nutrient agar and Sabouraud agar and submitted to respiratory, pH, organic matter and textural analyzes. Cultivated microorganisms were separated into morphospecies and groups for counting. The highest values of abundance of bacteria were at Uvu IV,  $56.7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  soil (winter) and at Uvu I,  $52 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  soil (summer). For fungi, the highest values were  $38.7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  soil at Uvu I (summer) and  $36.5 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  soil at Uvu IV (summer). It was observed that microbial communities may have been affected by seasonality and anthropic interference, occurring in smaller amounts in the winter, possibly associated to the location of points with better conservation of vegetation and higher levels of organic matter on the soil.

**KEYWORDS:** Soil organic matter. Soil microorganisms. Seasonality.

## 1 | INTRODUÇÃO

O solo é constituído por partes sólidas, líquidas e gasosas, contendo matéria viva e podendo ser vegetado na natureza onde ocorrem ou modificados por interferência humana (EMBRAPA, 2013). Solos aluviais são pouco desenvolvidos, com depósitos de sedimentos fluviais recentes, periodicamente depositados durante as inundações nas margens de rios. Características físico-químicas são muito dependentes da textura e da mineralogia. Solos de textura arenosa geralmente são inférteis, enquanto os aluviais, de textura média a argilosa, apresentam boa fertilidade natural. Contudo, para melhor compreender este tipo de solo, é necessária à sua classificação e propriedades físicas, químicas e microbiológicas (EMBRAPA, 2004).

Um dos principais rios da cidade de Curitiba é o rio Barigui, que é um afluente do rio Iguaçu. Com 66 quilômetros de extensão, é o principal rio da bacia hidrográfica que leva o seu nome. Sua nascente está localizada no município de Almirante Tamandaré e tem sua foz no município de Araucária. Em seu percurso atravessa também Curitiba, percorrendo 18 bairros, dentre eles, Santa Felicidade. Este bairro é conhecido pela sua colonização italiana, intenso movimento turístico e gastronômico e está em constante desenvolvimento urbano. Santa Felicidade é banhada pelo rio Uvu, que possui uma extensão total de aproximadamente 6 quilômetros. Cruzando 3 bairros, o rio Uvu é um dos principais afluentes do rio Barigui, que deságua em sua margem direita e ajuda a formar a lagoa do Parque Barigui (PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA, 2011). Ainda, as águas do rio Barigui estão classificadas como Classe 2 a montante do Parque Barigui, e a jusante como Classe 3 (Portaria 20/1992 da Superintendência de Recursos Hídricos e Meio Ambiente). Portanto, o bairro de Santa Felicidade tem grande influência sobre a poluição hídrica do mesmo, sendo que a ação antrópica pode vir a influenciar alguns parâmetros do solo e, conseqüentemente do rio (MELZ &

TIAGO, 2009).

As análises físico-químicas e microbiológicas têm como intenção avaliar a qualidade do solo aluvial sob a influência da sazonalidade, uma vez que o solo como habitat é um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por micro-habitats, onde células, populações microbianas são encontradas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Nesse contexto, tem-se como hipótese que a sazonalidade e ações antrópicas podem causar alterações na dinâmica do solo e espera-se que os indicadores microbianos e físico-químicos possam avaliar esse impacto.

Neste contexto, objetivou-se pesquisar as propriedades físico-químicas e microbiológicas de solos aluviais às margens do rio Uvu, assim como, analisar a influência da sazonalidade nas estações verão e inverno do ano de 2015, além de estimar os índices de atividade, diversidade, uniformidade e riqueza de bactérias e fungos desses solos.

## 2 | METODOLOGIA

Foram realizadas 10 coletas, sendo 5 no verão e 5 no inverno do ano de 2015. O solo aluvial foi coletado às margens do rio Uvu, na profundidade de 0-5 cm, localizado no bairro Santa Felicidade, Curitiba-PR (figura 3), que tem como característica clima temperado (Cfb) segundo a classificação de Köppen-Geiger (ALVARES *et al.*, 2013).

As amostras foram coletadas numa delimitação de até 1 metro da margem do rio, em 4 pontos distintos ao longo do rio Uvu. São eles: Uvu I (Nascente do rio): Rua Joaquim Fressato (figuras 1 A e B); Uvu II: Rua João Azolin (figuras 1 C e D); Uvu III: Rua Ângelo Trevisan (figuras 2 F e G) e Uvu IV (Foz do rio): Rua José Lass (figuras 2 H e I). A distância do ponto 1 ao ponto 2 é de aproximadamente 3 quilômetros, do ponto 2 ao ponto 3, 2 quilômetros, enquanto que a distância do ponto 3 ao ponto 4 é de aproximadamente 1,5 quilômetro, perfazendo um percurso de aproximadamente 6 quilômetros. Também foram considerados índices de pluviosidade e temperatura média das estações de verão e inverno do ano de 2015, de acordo com dados da Estação de Curitiba do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).



Figura 1 - Foto e localização no mapa de cada ponto de coleta, respectivamente. A e B: Ponto Uvu I. C e D: Ponto Uvu II.

Fonte: As autoras, 2015 e IPPUC, 2013



Figura 2 - Foto e localização no mapa de cada ponto de coleta, respectivamente. F e G: Ponto Uvu III. H e I: Ponto Uvu IV.

Fonte: As autoras, 2015 e IPPUC, 2013



Figura 3 – Esquerda: Brasil, Estado do Paraná e a capital, Curitiba. Direita: Cidade de Curitiba, região metropolitana e o bairro Santa Felicidade em vermelho.

Fonte: IPPUC, 2013

A coleta de solo foi realizada com pás para jardim (Vonder, Brasil), as quais foram lavadas e esterilizadas com álcool 70% a cada coleta. Foram coletadas

aproximadamente 500 gramas de amostras, que foram identificadas e armazenadas para análise em laboratório, onde foram mantidas sob refrigeração 2-8°C.

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório de análises de solos da Universidade Federal do Paraná, no campus Agrárias. Foram analisados pH, Carbono, Matéria Orgânica Total e granulometria. A análise microbiológica foi concentrada em atividade respiratória, uniformidade, riqueza e diversidade microbiana. Essas análises foram realizadas no laboratório de microbiologia e pedologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, no campus Curitiba.

Para a realização da análise de atividade respiratória microbiana, foi utilizado o método de avaliação da evolução de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), onde há incubação de uma amostra de solo com uma solução de hidróxido de sódio. Durante o período de incubação, o CO<sub>2</sub> liberado reage com a solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) e tem-se uma solução composta de hidróxido de sódio e carbonato de sódio. Esse carbonato é precipitado pela adição de cloreto de bário, formando o carbonato de bário. A dosagem do hidróxido de sódio em excesso na solução é medida pela neutralização com ácido clorídrico. A quantidade de carbono liberado na forma de CO<sub>2</sub> do solo é obtida a partir da diferença entre o resultado de um ensaio em branco e o resultado da solução das amostras incubadas com o solo (STOTZKY, 1965).

Para a avaliação da diversidade microbiana, as colônias foram agrupadas em morfoespécies de acordo com suas características morfológicas, como forma, borda, brilho e cor (SILVA *et al.*, 2001), onde 10 gramas de cada amostra de solo foram submetidas à diluição seriada em salina estéril, seguida de plaqueamento em Ágar Nutriente (AN), para quantificação de bactérias, e em Ágar Sabouraud (AS), para quantificação de fungos (RIBEIRO & SOARES, 2002). Realizaram-se os Índices: diversidade de Shannon, uniformidade de Pielou e riqueza de Margalef, através do programa PAST 3.0 (HAMMER *et al.*, 2001). Utilizaram-se estes índices tendo em vista que os microrganismos representam cerca de 60% a 80% da fração viva e mais ativa da matéria orgânica do solo, sendo o principal componente de fertilidade dos solos tropicais (THENG *et al.*, 1989).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi registrado para o verão de 2015 (entre janeiro e março) índice de pluviosidade de aproximadamente 420mm e temperatura média de aproximadamente 20°C, enquanto que para o inverno de 2015 (entre junho e setembro), a temperatura média foi de aproximadamente 14°C e precipitação de aproximadamente 350mm (INPE,2015).

Em todos os dados obtidos foi realizada a média aritmética dos valores encontrados em cada ponto coletado, separado pelo período sazonal.

As médias de UFC (unidades formadoras de colônias) para cada ponto foram

tratadas como abundância de UFC (média da quantidade de todos os indivíduos para cada ponto). Os maiores valores de abundância para bactérias foram identificados no ponto Uvu IV,  $56,7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de solo (no inverno) e no ponto Uvu I,  $52 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de solo (no verão). Já para fungos, os maiores valores observados foram  $38,7 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de solo no ponto Uvu I (no verão) e  $36,5 \cdot 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de solo no ponto Uvu IV (no verão) (tabela 1).

Ponto / Estação	Bactérias (UFC x $10^5$ g <sup>-1</sup> de solo)		Fungos (UFC x $10^5$ g <sup>-1</sup> de solo)	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
<b>Uvu I</b>	52.0	8.9	38.7	8.3
<b>Uvu II</b>	11.4	11.0	26.3	1.5
<b>Uvu III</b>	38.2	33.8	21.6	9.3
<b>Uvu IV</b>	42.9	56.7	36.5	8.0

Tabela 1 - Abundância de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias e fungos de amostras do solo aluvial dos pontos Uvu I, Uvu II, Uvu III e Uvu IV nas estações verão e inverno

Fonte: As autoras

Notou-se que a abundância de bactérias e fungos foi afetada pelas estações, ocorrendo em menores quantidades, em média, no inverno, também estando associada à localização dos pontos (nascente e foz) com maior conservação de mata e vegetação, e, conseqüentemente, com maiores índices de matéria orgânica.

Observou-se que no inverno no ponto Uvu I, houve uma redução no número de bactérias em relação ao verão de aproximadamente seis vezes, enquanto no ponto Uvu IV houve aumento de 32%, local onde há elevada vegetação e o solo encontra-se mais protegido das oscilações térmicas, contribuindo pela maior presença de matéria orgânica (tabela 2). Ao analisar as UFC de fungos, foi observado que no ponto Uvu II no inverno, uma redução de aproximadamente dezessete vezes o número de UFC em relação ao verão. O número mais elevado de UFC no verão pode também estar associado à maior umidade, o que beneficia esses organismos.

O pH encontra-se num intervalo praticamente neutro (6,4 a 7,3) e moderadamente alcalino (7,4 a 8,3) (EMATER, 1979). Geralmente, os fungos são mais adaptados a valores de pH menores que 5.0 (acidófilos) e as bactérias, a valores de pH entre 6.0 e 8.0 (neutrófilos e basófilos) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Ponto / Estação	pH		Matéria Orgânica (g/kg <sup>-1</sup> )	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
<b>Uvu I</b>	7.4	7.3	21.6	33.1
<b>Uvu II</b>	7.8	7.3	15.6	19.1
<b>Uvu III</b>	7.7	7.1	11.3	20.4
<b>Uvu IV</b>	7.4	7.2	16.5	29.8

Tabela 2 - pH e Matéria orgânica (g/kg<sup>-1</sup>) de amostras do solo aluvial dos pontos Uvu I, Uvu II, Uvu III e Uvu IV nas estações verão e inverno

Fonte: As autoras

Observou-se que os pontos Uvu I e Uvu IV, no verão, possuem em média, os maiores índices de abundância de UFC. Esses pontos apresentam melhor conservação do solo em seu entorno, sendo observada mata ciliar na nascente (Uvu I) e na foz (Uvu IV). Nos pontos Uvu II e III encontram-se entre casas, restaurantes e pavimentação, sofrendo grande influência de resíduos sólidos e depósito dos mesmos. A diferença de unidades formadoras de colônia entre inverno e verão, também podem ser justificadas pela temperatura e precipitação mais elevadas nesta estação do ano, assim como a alteração do pH, que também pode ter interferido na população microbiana.

O acúmulo de matéria orgânica no solo favorece o crescimento e a atividade microbiana na camada superficial do solo, relacionado com áreas com presença de vegetação, que exerce influência sobre os microrganismos e a quantidade de carbono presente (GONÇALVES *et al.*, 1999; VARGAS & SCHOLLES, 2000).

Verificou-se através dos teores de matéria orgânica (figuras 4 e 5 e tabela 2) influência entre os pontos de coleta e as estações. No verão, verificou-se menor teor de matéria orgânica, enquanto que no inverno, o teor foi maior. Os maiores valores registrados foram 33,161 g/kg<sup>-1</sup> no ponto Uvu I e 29,824 g/kg<sup>-1</sup> para o ponto Uvu IV, ambos no inverno. Entretanto, as menores temperaturas e umidade, provavelmente colaboraram para a diferença das populações microbianas. Resíduos provenientes da deposição de serapilheira e o aumento da atividade microbiana, uma vez que os microrganismos utilizam componentes orgânicos em seus metabolismos, estão relacionados com a redução do aporte de matéria orgânica no solo (MARCHIORI JÚNIOR & MELO, 2000).

Ao associar a matéria orgânica e a atividade respiratória (tabela 3, figuras 4 e 5), observou-se que no inverno há maior teor de matéria orgânica e atividade respiratória mais baixa. No verão, foi observado que há menor teor de matéria orgânica e maiores índices de atividade respiratória. No inverno, os valores de matéria orgânica apresentam-se

mais altos pelo acúmulo de folhagens e redução nas atividades microbianas.

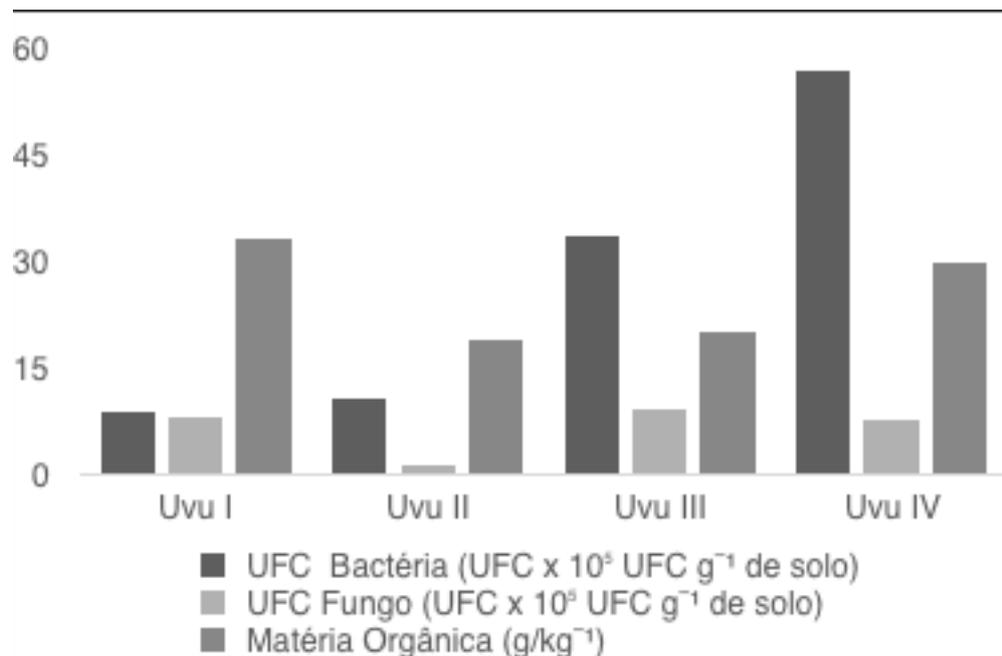


Gráfico 1 - Abundância de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias e fungos (em UFC x 10<sup>5</sup> g<sup>-1</sup> de solo) e matéria orgânica na estação inverno/2015 relacionadas com o ponto de coleta.

Fonte: As autoras

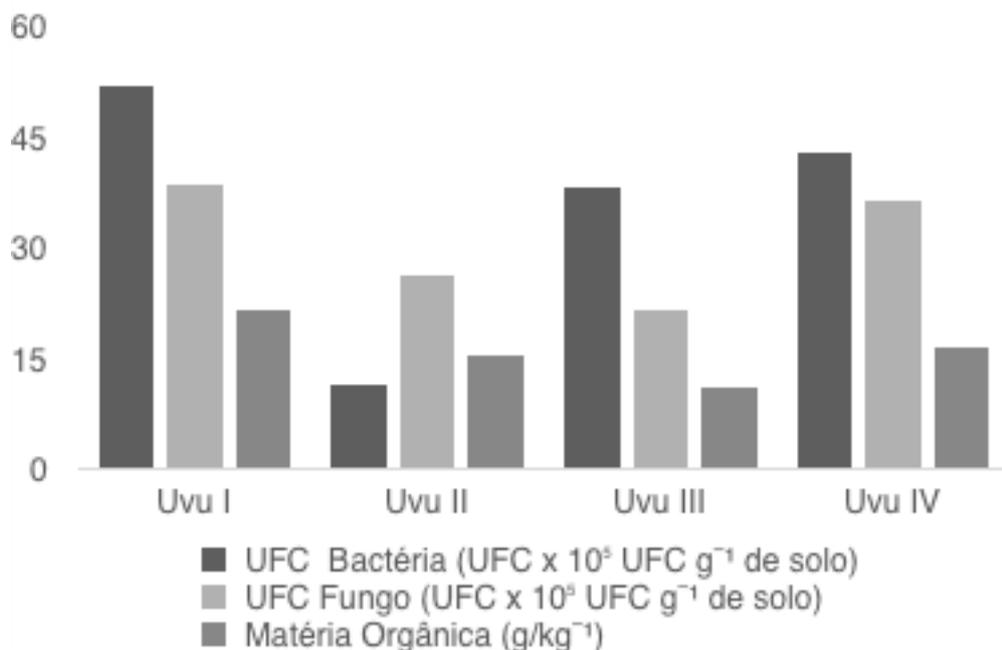


Gráfico 2 - Abundância de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias e fungos (em UFC x 10<sup>5</sup> g<sup>-1</sup> de solo) e matéria orgânica na estação verão/2015 relacionadas com ponto de coleta.

Fonte: As autoras

<b>Atividade Respiratória (mg/100g C-CO<sub>2</sub>)</b>		
<b>Ponto / Estação</b>	<b>Verão</b>	<b>Inverno</b>
<b>Uvu I</b>	3.1	2.6
<b>Uvu II</b>	4.8	3.6
<b>Uvu III</b>	3.9	2.8
<b>Uvu IV</b>	3.1	2.7

Tabela 3 - Médias da Atividade Respiratória (mg/100g de C-CO<sub>2</sub>) de amostras do solo aluvial dos pontos Uvu I, Uvu II, Uvu III e Uvu IV nas estações verão e inverno

Fonte: As autoras

Durante a decomposição da matéria orgânica, seja ela existente ou adicionada no solo, a microbiota presente inicialmente oxida os compostos mais facilmente degradados (GRAY & WILLIAMS, 1975), sendo que através do processo de atividade respiratória, ocorre a disponibilização de nutrientes aos vegetais e manutenção do conteúdo de matéria orgânica no solo, após reações de oxirredução que levam a formação de compostos orgânicos estáveis.

O metabolismo aeróbio e anaeróbio da comunidade microbiana é refletido através da liberação de CO<sub>2</sub> e a absorção de O<sub>2</sub> pelos fungos, bactérias e algas do solo (ANDERSON, 1982). Adicionalmente, as oscilações térmicas sazonais afetam as comunidades biológicas do solo e suas atividades, estando relacionadas com condições adversas para seu desenvolvimento (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Corroborando com os autores acima mencionados, observa-se na tabela 4, a variação de morfoespécies com a sazonalidade, ou seja, foram observadas 39 morfoespécies de bactérias no verão e 18 no inverno (tabela 4). No verão, o ponto que mais apresentou morfoespécies de bactérias foi o Uvu I (nascente), enquanto no inverno, os pontos Uvu I e Uvu IV (foz) apresentaram maior número.

Bactérias	Total de Morfoespécies		Índice de Diversidade		Índice de Equitabilidade		Índice de Riqueza	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
<b>Uvu I</b>	11	5	1.69	0.82	0.70	0.51	1.56	0.72
<b>Uvu II</b>	10	4	1.67	0.82	0.72	0.59	1.53	0.52
<b>Uvu III</b>	10	4	1.50	1.04	0.65	0.75	1.52	0.50
<b>Uvu IV</b>	8	5	1.53	0.96	0.73	0.60	1.16	0.62

Tabela 4 - Total de morfoespécies, índice de diversidade, equitabilidade e índice de riqueza de bactérias de amostras do solo do Rio Uvu, nas estações verão e inverno

Fonte: As autoras

Para fungos, foram identificados um total de 53 morfoespécies no verão e 36 no inverno (tabela 5). Os pontos que apresentaram maiores números no verão foram o Uvu II e Uvu IV, e no inverno, o ponto com maior abundância foi o Uvu I.

Fungos	Total de Morfoespécies		Índice de Diversidade		Índice de Equitabilidade		Índice de Riqueza	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
<b>Uvu I</b>	13	10	1.97	1.86	0.76	0.81	2.09	1.85
<b>Uvu II</b>	14	9	1.60	1.71	0.60	0.78	2.28	1.97
<b>Uvu III</b>	12	8	1.85	1.88	0.74	0.90	2.02	1.42
<b>Uvu IV</b>	14	9	1.98	2.01	0.75	0.91	2.31	1.71

Tabela 5 - Total de morfoespécies, índice de diversidade, equitabilidade e índice de riqueza de fungos de amostras do solo do Rio Uvu, nas estações verão e inverno

Fonte: As autoras

A maior concentração de morfoespécies nos pontos Uvu I e Uvu IV, em média, podem ter relação com as características texturais desses solos (tabela 6), uma vez que são mais argilosos, o que possibilita reter mais água, matéria orgânica, e mais nutrientes, o que também pode ter favorecido a microbiota da área. Índices menores nos pontos Uvu II e III podem estar associados a ações antrópicas próximas ao rio. É relatado que as reações químicas do solo e as transformações microbianas podem ser alteradas conforme o manejo do solo (THEODORO *et al.*, 2003).

A análise granulométrica (tabela 6) indica que o solo do ponto Uvu I é classificado como textura média, e os pontos II e III como arenosos, enquanto o ponto IV é classificado como argiloso, de acordo com o triângulo textural (EMBRAPA, 2006).

Um fator que pode estar associado aos índices de diversidade, equitabilidade e riqueza mais elevado é a quantidade de matéria orgânica presente nesses solos. Também nesses pontos, são encontradas características como mata ciliar e melhor conservação do rio e do solo, com pouca ação antrópica. Áreas sob ações antrópicas frequentes apresentam índices de diversidade, equitabilidade e riqueza de microrganismos menores quando comparadas com áreas com melhor preservação. Ainda, em áreas com melhor preservação é observada maior abundância de morfoespécies de microrganismos (MELZ & TIAGO, 2009).

<b>Ponto / Característica</b>	<b>Argila g/kg<sup>-1</sup></b>	<b>Silite g/kg<sup>-1</sup></b>	<b>Areia total g/kg<sup>-1</sup></b>	<b>Areia grossa g/ kg<sup>-1</sup></b>	<b>Areia fina g/kg<sup>-1</sup></b>
<b>Uvu I</b>	338	200	463	360	103
<b>Uvu II</b>	63	25	913	783	130
<b>Uvu III</b>	75	13	913	803	110
<b>Uvu IV</b>	350	213	438	219	218

Tabela 6 - Características texturais de amostras do solo dos pontos Uvu I, Uvu II, Uvu III e Uvu IV

Fonte: As autoras

Tanto para morfoespécies de bactérias quanto de fungos, os índices de diversidade foram baixos, visto que este índice varia de 1 a 5, onde 1 é o menor e 5 o maior índice de diversidade de espécies. Para equitabilidade (ou uniformidade de Pielou), que indica a distribuição de morfoespécies nas amostras do solo, os resultados apresentaram-se em intervalos de 0,1 a 1,0, onde o valor máximo representa espécies equitativamente abundantes. Observa-se heterogeneidade para esse índice, visto que em certos pontos houve elevada concentração de morfoespécies, com ocorrência em quantidades diferentes entre as estações.

Para o índice de riqueza de Margalef, foi observado um baixo índice, em ambas as estações, para as duas classes de microrganismos, uma vez que áreas com valores abaixo de 2.0 são consideradas de baixa diversidade, e valores acima de 5.0 são considerados como indicador de grande diversidade. Dentre os pontos, o que melhor apresentou índice de diversidade para bactérias foi o ponto Uvu I, no verão e Uvu III no inverno. Já os maiores índices de equitabilidade, para UFC de bactérias, foram observados nos pontos Uvu IV no verão e Uvu III, no inverno.

Quanto ao índice de riqueza, os maiores valores foram observados durante o verão. Para os fungos, o ponto que apresentou maior índice de diversidade foi o ponto

Uvu IV, tanto no verão quanto no inverno. Já no aspecto equitabilidade, o ponto Uvu I apresentou maior índice no verão e o ponto Uvu IV no inverno. No índice de riqueza, o ponto que apresentou maior valor foi o Uvu IV, no verão, e no inverno, o ponto Uvu II.

A diversidade vegetal altera a composição da comunidade microbiana, onde observa-se o estímulo da biodiversidade microbiana (VARGAS & SCHOLLES, 2000). Adicionalmente, o aumento da atividade microbiana do solo é influenciado por parâmetros como temperatura e maior conteúdo de água do solo em períodos de precipitação (CORREIA *et al.*, 2009). Observou-se que quando ocorre elevada diversidade, a média da uniformidade apresenta-se em cerca de 80 (ODUM, 1988), o que demonstra que entre os pontos estudados houve baixa diversidade e equitabilidade.

#### 4 | CONCLUSÃO

As estações de verão e inverno e atividades antrópicas podem exercer influência nas comunidades de bactérias e fungos do solo estudado ao longo do rio Uvu. No inverno houve drástica redução na atividade e abundância de bactérias e fungos. Os índices de diversidade, equitabilidade e riqueza apresentaram-se baixos, sendo os pontos Uvu II e III os com menores índices, estando relacionado às características texturais, químicas e antrópicas desses pontos. Observou-se que os melhores índices nos pontos Uvu I e IV estão associados à sua melhor conservação, onde índices de matéria orgânica e atividade respiratória corroboram com uma maior diversidade.

#### REFERÊNCIAS

ALVARES, C. A. *et al.* **Köppen's climate classification map for Brazil**. Meteorologische Zeitschrift, v. 22, n. 6, p. 711-728. 2013.

ANDERSON, J.P.E. **Soil respiration**. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, p. 831-871. 1982.

BRASIL. Portaria n. 20, de 12 de maio de 1992. **Enquadrar os cursos d'água da Bacia do Rio Iguaçu, de domínio do Estado do Paraná**. Diário Oficial do Estado, Curitiba, PR, 12 mai. 1992. Disponível em: [http://celepar7.pr.gov.br/sia/atosnormativos/atos2/exibir\\_ato.asp?codAto=1587](http://celepar7.pr.gov.br/sia/atosnormativos/atos2/exibir_ato.asp?codAto=1587). Acesso em: 20 set. 2015

CHAVES, L.H.G. *et al.* **Variabilidade de propriedades químicas do solo aluvial da Ilha de Picos, Pernambuco**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 6, p. 13-19. 2006.

CORREIA, K. G *et al.* **Atividade microbiana do solo em quatro estágios sucessionais da Caatinga no município de Santa Terezinha, Paraíba, Brasil**. Engenharia Ambiental. Espírito Santo do Pinhal, SP, p.534-549. 2009.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL (EMATER). **Sugestões de adubação para o Estado da Paraíba**. João Pessoa, PE, p.56. 1979.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Produção de Sementes Sadias de Feijão Comum em Várzeas Tropicais. Brasília, DF. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Brasília, DF. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, DF. 2013.

GONÇALVES, A.S. *et al.* **Estudo de variáveis de solo, vegetação e condicionamento de amostras de solo sobre a biomassa microbiana do solo no estado do Rio de Janeiro**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, p.18. 1999.

HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T., RYAN, P. D. **PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontological Association. 2001.

MARCHIORI J.M. & MELO, W.J. **Alterações na matéria orgânica e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, p.1177-1182. 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.inpe.br/>. Acesso em: 20 set. 2015

MELZ, E.M., & TIAGO, P.V. Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. Acta amazônica, Manaus, AM, v.39, n.4. 2009.

MOREIRA, S. M. F. & SIQUEIRA, O. J. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Lavras, 2ª ed. 2006.

ODUM, E.P. **Populações em comunidades**. Guanabara, SP, Ecologia, p. 258-272. 1988.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA. **Começa o projeto de despoluição do rio uvu na bacia do Barigüi**. Curitiba, PR. 2011. Disponível em: <http://www.curitiba.pr.gov.br/noticias/comeca-projeto-de-despoluicao-do-rio-uvu-na-bacia-do-barigui/12886>. Acesso em: 19 set. 2015

PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA, INSTITUTO DE PESQUISA E PLANEJAMENTO URBANO DE CURITIBA. **Bairro Santa Felicidade**. Curitiba, PR, 2013. Disponível em: <http://www.ippuc.org.br/mostrarpagina.php?pagina=351&idioma=1&ampliar=n%E3o>. Acesso em: 19 set. 2015

RIBEIRO, M. C. & SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual de bactérias e fungos**. São Paulo, SP. 2002.

SANTOS, E.S. & ZANELLO, S. **Análises físico químicas das águas e de solos do rio Canguiri**. Curitiba, PR. 2009. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-8.pdf>. Acesso em: 19 set. 2015

SILVA, R., SCHWAN, R. F., DIAS, E. S. **Aulas práticas de microbiologia geral**. Universidade Federal de Lavras, p.52, Lavras, MG. 2001.

SIQUEIRA, J.O. *et al.* **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Embrapa, Brasília, DF, p. 142. 1994.

STOTZKY, G. **Microbial respiration**. Methods of soil analysis. American Society of Agronomy,

Madison, EUA, p. 1550-1572. 1965.

SUREMA. Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente. **Bacia do Rio Iguaçu. Portaria SUREHMA Nº020/92 de 12 de maio de 1992.** Disponível em: <http://www.recursoshidricos.pr.gov.br/arquivos/File/enquadramento-b-iguacu.pdf>. Acesso em: 19 set. de 2015.

THENG, B.K.G., TATE, K.R., SOLLINS, P. **Constituents of organic matter in temperate and tropical soils.** Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems. NifTAL Project, Hawaii, EUA. 1989.

THEODORO, V.C.A *et al.* **Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros.** Acta Scientiarum: Agronomy, Maringá, PR, v.25, p.147-153. 2003.

VARGAS, L.K. & SCHOLLES, D. **Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral de um podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo.** Revista Brasileira de Ciências do Solo, v. 24, p. 35-42. 2000.

VICENTE, G. C. M. P. & ARAUJO, F. F. **Uso de indicadores microbiológicos e de fertilidade do solo em áreas de pastagens.** Semina: Ciências Agrárias Londrina, PR, v. 34, p. 137-146. 2013.

## COMPOSIÇÃO PROXIMAL, MINERAL E LIPÍDICA DE FRUTAS NATIVAS E EXÓTICAS

### **Antonio Eduardo Nicácio**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

### **Joana Schuelter Boeing**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

### **Érica Oliveira Barizão**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

### **Carina Alexandra Rodrigues**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

### **Jesuí Vergílio Visentainer**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

### **Liane Maldaner**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento  
de Química  
Maringá- Paraná

**RESUMO:** O consumo regular de frutas está associado a vários benefícios para a saúde humana, como o combate e prevenção de doenças crônicas e degenerativas, tais como hipertensão, diabetes tipo 2, câncer, doença

de Alzheimer, entre outras. O Brasil possui uma diversidade de frutas nativas e exóticas, porém muitas delas foram pouco ou ainda não estudadas em relação ao seu potencial nutricional. Baseado nisso, neste trabalho determinou-se a composição proximal, mineral e lipídica em diferentes partes das frutas cereja-do-mato, saraguají e mamey. Os resultados mostraram que, entre as partes das frutas analisadas, as sementes apresentaram os teores maiores de minerais e proteínas, enquanto que as concentrações mais elevadas dos ácidos graxos linoleico e alfa-linolênico foram encontradas nas sementes da saraguají e nas polpas da cereja-do-mato e do mamey. Com exceção da polpa e da semente da cereja-do-mato, todas as demais partes das frutas em estudo apresentaram razões ômega-6/ômega-3 abaixo de 4, indicando que as mesmas apresentam um perfil lipídico adequado para a manutenção de uma boa saúde. Desta forma, as diferentes partes das frutas avaliadas podem ser boas alternativas para uma alimentação mais completa e balanceada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Composição proximal; frutas; lipídios; minerais, ácidos graxos.

**ABSTRACT:** The regular consumption of fruits is associated with several benefits to human health, such as combating and preventing chronic and degenerative diseases, such as

hypertension, diabetes type 2, cancer, Alzheimer's disease and others. Brazil has a diversity of native and exotic fruits, however several of them have been little or not studied in relation to their nutritional potential. So, in this work the proximal, mineral and lipidic composition from different parts of the fruits cereja-do-mato, saraguají and mamey were determined. The results showed that, among the fruits parts analyzed, the seeds presented the highest levels of minerals and proteins. On the other hand, the highest concentration levels of linoleic and alpha-linolenic fatty acids were found in the seeds of saraguají and pulps of cereja-do-mato and mamey. With exception of pulp and seeds of cereja-do-mato, all other parts of the fruits under study presented omega-6/omega-3 ratios lower than 4, indicating that they have an adequate lipid profile for the maintenance of a good health. Thus, the different parts of the fruits evaluated can be good alternatives for a more complete and balanced diet.

**KEYWORDS:** Proximal composition, fruits, lipids, minerals, fatty acids.

## 1 | INTRODUÇÃO

Diversas fontes, como frutas, legumes, cereais, sementes e castanhas vêm sendo estudadas devido à sua composição rica em micronutrientes importantes para saúde humana (OROIAN e ESCRICHE, 2015). Dentre estas fontes, as frutas vêm ganhando destaque por apresentarem também quantidades elevadas de água, fibras, vitaminas e minerais. E, além disso, por serem alimentos consumidos geralmente como lanches ou parte das refeições principais, e por apresentarem uma diversidade de aplicações na indústria de alimentos como a fabricação de bebidas, licores, sorvetes, entre outras (VAUZOUR et al., 2010).

Estima-se que, atualmente, sejam produzidas por ano 800 milhões de toneladas de frutas frescas no mundo (Agrostat Brasil/MAPA, 2018). O Brasil, com aproximadamente 43 milhões de toneladas produzidas em 2014, é o terceiro maior produtor, atrás da China e da Índia (REETZ, 2015). As regiões Sudeste, Nordeste e Sul correspondem as principais regiões produtoras de frutas no Brasil, tendo como destaque, os estados de São Paulo, Bahia e Rio Grande do Sul. Dentre as frutas mais produzidas, estão a laranja, o mamão, a manga, a banana, o abacaxi e a uva (REETZ, 2015). Entre as frutas que o Brasil mais importa destacam-se a pera, o pêssego, as cerejas e as ameixas (Agrostat Brasil/MAPA, 2018). Perspectivas para o aumento da produção de frutas estão previstas, e isto se deve aos investimentos maiores em tecnologia e ampliação de áreas produtivas (OECD/FAO, 2015).

Apesar da preferência mundial estar voltada para o consumo de frutas mais comuns, como a maçã, a banana e a laranja; outras frutas menos conhecidas e/ou consumidas vêm despertando interesse comercial tanto no mercado interno quando no mercado externo. Dentre estas frutas, a manga, a goiaba, o kiwi e o mamão vêm sendo exportadas para os Estados Unidos e a Europa (Agrostat Brasil/MAPA, 2018).

Além disso, há um outro mercado em expansão a nível mundial que corresponde

ao mercado das frutas nativas e exóticas. As frutas nativas correspondem as frutas que são produzidas em seu país de origem e as frutas exóticas correspondem as frutas que se adaptaram e são produzidas em um país distinto em relação ao de origem (DAWSON; MAUREL; KLEUNEN, 2015).

Por ser um mercado em expansão, diversas frutas nativas e exóticas foram pouco ou ainda não estudadas. Desta forma, investigar a composição dessas frutas, é de grande relevância, uma vez que esses estudos podem contribuir para a divulgação e para despertar o interesse pelo consumo e pela produção das mesmas. Dentro desse contexto, a cereja-do-mato, a saraguajá e o mamey são frutas que carecem de estudos de caracterização química.

A cereja-do-mato (*Eugenia involucrata*) (Figura 1A) é uma planta nativa, silvestre, ornamental e frutífera, presente no Sul e Sudeste do Brasil (CARVALHO, 2008). Os frutos apresentam coloração avermelhada intensa podendo ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos e licores (LORENZI, 1992). Cole et al. (2007), publicaram um estudo que mostrou que os óleos essenciais extraídos de sete espécies do gênero *Eugenia* apresentaram uma diversidade de monoterpênicos e derivados de ácidos graxos.

A fruta nativa saraguajá (*Rhamnidium elaeocarpum*) (Figura 1B) está presente no Brasil, do estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2010). Os frutos são roxos, com casca fina e com polpa líquida. A fruta é muito apreciada *in natura* e suas sementes são também comestíveis. Segundo Oliveira et al. (2010), as folhas e cascas da *Rhamnidium elaeocarpum* são utilizadas popularmente no Brasil para reduzir o prurido das gengivas de crianças no início da dentição e para dores estomacais. Extratos metanólicos das folhas apresentaram quantidades significativas de flavonóides, alcalóides, saponinas e taninos.

A planta exótica mamey (*Pouteria sapote*) (Figura 1C) é melhor adaptada em regiões com clima tropical, sendo tolerante a temperaturas elevadas, porém não tolerante ao frio, e está presente nas regiões centrais da América (BALERDI; CRANE; MAGUIRE, 2005). Os frutos do mamey são do tipo baga, a polpa tem uma coloração laranja, e possuem somente uma semente grande e escura (BALERDI; CRANE; MAGUIRE, 2005). Esses frutos apresentam uma diversidade de compostos antioxidantes, tais como os ácidos fenólicos, flavonóides e carotenóides (TORRES-RODRIGUEZ et al., 2011).

## 1.1 Caracterização Química de Alimentos

### 1.1.1 Composição Centesimal e Minerais

A composição centesimal fornece informações dos principais constituintes presentes nos alimentos, dentre eles, umidade, cinzas, proteínas totais e lipídios totais (LT), e desta forma, está relacionada com diversas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos.

A umidade é um fator que está relacionado diretamente com a estabilidade química, microbiológica e textural dos alimentos, sendo a avaliação deste parâmetro essencial para que haja um condicionamento e processamento adequado dos mesmos (OZILGEN, 2011).

(A)



(B)



(C)



Figura 1: Árvore e frutos da Cereja-do-mato (A), Saraguajá (B) e Mamey (C). (Fonte: fotografias e <http://www.colecionandofrutas.org>)

O ensaio de cinzas é importante para caracterizar a parte inorgânica do alimento, a qual é constituída pelos minerais (CECCHI, 2003). Os minerais apresentam diversas funções vitais nos processos metabólicos, sendo que o ferro, magnésio, cobre, manganês e zinco se destacam, pois estes são cofatores das enzimas superóxido dismutase, as quais são responsáveis por catalisar a dismutação do superóxido de oxigênio em peróxido de hidrogênio (DOMKE et al., 2006). A falta destes minerais pode resultar em uma redução da atividade dessas enzimas, podendo diminuir a defesa antioxidante endógena frente às espécies reativas de oxigênio (DOMKE et al., 2006).

As proteínas e os lipídios exercem um papel fundamental na alimentação humana e, também, são componentes importantes na composição das frutas, fornecendo algumas propriedades tais como textura, viscosidade e sabor (FENNEMA, 1985). A quantidade destes macronutrientes em frutas geralmente é baixa, e a composição é dependente de vários fatores, tais como condições climáticas, fatores genéticos, estágio de maturação, entre outros (DAVIS e PONELEIT, 1974, TRABELSI et al., 2012, TLILI et al., 2014).

O teor lipídico das frutas é geralmente menor quando comparado à alimentos de origem animal, pois parte dos lipídios sintetizados pelos vegetais são precursores de compostos que conferem o aroma e o sabor dos frutos durante a maturação (GHOLAP e BANDYOPADHYAY, 1980). Dentre os compostos presentes na porção lipídica, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, alfa-linolênico (18:3n-3) e linoleico (18:2n-6), pois são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Adicionalmente, atuam como precursores para a síntese de outros importantes ácidos graxos no organismo humano (MARTIN et al., 2006; GRAMLICH et al., 2015). Os ácidos alfa-linolênico e linoleico são considerados estritamente essenciais, pois não são sintetizados pelo organismo humano sendo obtidos exclusivamente pela dieta (RIBEIRO et al., 2013).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As frutas saraguajá e mamey foram colhidas no Sítio de Frutas Raras, na cidade de Campina do Monte Alegre-SP (23° 35' 31" S, 48° 28' 38" W) no mês de janeiro de 2014 e fevereiro de 2015. A cereja-do-mato foi colhida no mês de setembro no ano de 2013 na cidade de Paranavaí-PR (23° 04' 22" S, 52° 27' 54" W). As frutas frescas foram lavadas em água corrente, separadas manualmente em casca, polpa ou casca+polpa e semente, embaladas a vácuo e mantidas a temperatura de -20 °C. As análises da composição centesimal, ácidos graxos e minerais foram realizadas nas diferentes partes da fruta *in natura*, sendo essas homogeneizadas em processador

antes de cada análise.

## 2.2 Composição Centesimal, Ácidos Graxos e Minerais

As análises de umidade, cinzas e proteína bruta foram realizadas conforme as técnicas descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* para análise de alimentos (AOAC, 1998).

O teor de umidade foi determinado gravimetricamente por aquecimento em estufa (105 °C) durante 4 h. O teor de cinzas foi determinado por aquecimento em forno mufla (600 °C) durante 6 h. Posteriormente, para a análise da composição mineral, as cinzas já obtidas foram solubilizadas empregando-se uma solução de ácido nítrico (5% v/v), conforme as normas da AOAC (1998). Os minerais (cobre, ferro, manganês e zinco) foram quantificados por um espectrômetro de absorção atômica e os resultados foram expressos em mg de minerais por kg de amostra (mg kg<sup>-1</sup>). A análise de proteína bruta foi realizada através do método semi-micro Kjeldahl e os resultados foram expressos em porcentagem de proteína bruta.

Os lipídios totais foram determinados gravimetricamente a partir da extração segundo a metodologia desenvolvida por Bligh e Dyer (1959). Após a extração, os lipídios foram esterificados e transesterificados segundo Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram separados e analisados em um cromatógrafo a gás acoplado ao detector por ionização em chama (CG-DIC). As vazões dos gases foram de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>); 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>) e 35 e 350 mL min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub> e para o ar sintético da chama, respectivamente, para a chama do detector. O volume de injeção foi de 2 µL e a razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente de 200°C e 240°C. Os analitos foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada pela comparação com os tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos (padrão 189-19, Sigma-USA). A quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por padronização interna e com uso de fatores de correção segundo Visentainer (2012) e os resultados foram apresentados em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição Centesimal e Minerais

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da composição centesimal das diferentes partes das frutas analisadas. Dentre as partes das frutas estudadas, as cascas e/ou casca+polpa apresentaram as porcentagens de umidade maiores em comparação com as sementes, com destaque para a fruta cereja-do-mato. Esses resultados indicam que essas partes das frutas requerem um melhor armazenamento para a conservação das mesmas.

Analisando-se o teor de cinzas das diferentes partes das frutas, pode-se observar que as sementes apresentaram os teores mais elevados. Isso está de acordo com outros trabalhos que analisaram o teor de cinzas de diferentes frutas e suas partes (MARTINÉZ et al., 2012; LIMA et al., 2014; BERTO et al. 2015).

Comumente, os vegetais apresentam teores de proteínas baixos em comparação com os alimentos de origem animal. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas para um indivíduo adulto é de 50 g. Dentre os vegetais, a soja se destaca por apresentar um teor de proteínas de 16% (ALMEIDA et al., 2013). Em comparação com a soja, o teor de proteína bruta de todas as partes das frutas analisadas foi inferior, não as caracterizando como fontes proteicas importantes. Entre as partes das frutas analisadas, as sementes da cereja-do-mato e da sarguají apresentaram as porcentagens maiores de proteína bruta. Pode-se observar também, que as partes das frutas com teor de umidade menor foram as que apresentaram o teor de cinzas e proteína bruta maior, o que também foi reportado por Berto et al. (2015).

A porcentagem lipídica foi menor que 1,5% para todas as partes das frutas analisadas, exceto para a casca+polpa da saraguají, não caracterizando essas frutas como fontes importantes de lipídios quando comparadas a alimentos de origem animal, bem como, quando comparadas a alimentos de origem vegetal ricos em lipídios, como as castanhas e as nozes (VENKATACHALAM e SATHE, 2006).

	Umidade	Cinzas	Proteína Bruta	Lipídios totais
<b>Cereja-do-Mato</b>				
Casca	82,0 <sup>A</sup> ±0,2	0,26 <sup>B,C</sup> ±0,06	2,0 <sup>C</sup> ±0,1	0,40 <sup>B,C</sup> ±0,03
Polpa	89,0 <sup>A</sup> ±0,3	0,60 <sup>C</sup> ±0,04	2,5 <sup>C</sup> ±0,8	0,06 <sup>D</sup> ±0,01
Semente	39 <sup>F</sup> ±2	0,90 <sup>A,B</sup> ±0,05	4,6 <sup>B</sup> ±0,6	0,50 <sup>B,C</sup> ±0,03
<b>Saraguají</b>				
Casca+Polpa	70 <sup>B</sup> ±6	0,8 <sup>A,B</sup> ±0,2	3,3 <sup>B,C</sup> ±0,6	1,50 <sup>A</sup> ±0,07
Semente	50 <sup>D,E</sup> ±1	1,22 <sup>A</sup> ±0,03	7,1 <sup>A</sup> ±0,7	0,30 <sup>C</sup> ±0,03
<b>Mamey</b>				
Casca	63 <sup>B,C</sup> ±2	0,7 <sup>A,B,C</sup> ±0,2	2,4 <sup>C</sup> ±0,3	0,50 <sup>B</sup> ±0,04
Polpa	58 <sup>E,C,D</sup> ±1	0,9 <sup>A,B</sup> ±0,4	2,40 <sup>C</sup> ±0,08	0,40 <sup>C</sup> ±0,04

**Tabela 1:** Composição centesimal (%) das diferentes partes das frutas cereja-do-mato, saraguají e mamey.

Dados expressos em média±estimativa de desvio padrão, n=3. Letras maiúsculas na mesma coluna representam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Adicionalmente, foi determinada a composição dos minerais ferro, cobre, manganês e zinco e os resultados da concentração destes minerais encontrada em cada uma das partes das frutas estudadas estão apresentados na Tabela 2. O ferro foi o mineral determinado em concentração maior em todas as partes das frutas, com destaque para a casca+polpa da saraguajá e a casca do mamey. Segundo a ANVISA (2005), a IDR de ferro, zinco, cobre e manganês em adultos deve corresponder a 14, 7, 0,9 e  $2,3 \cdot 10^{-3}$  mg dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando os resultados apresentados na Tabela 2, a quantidade de ferro e zinco poderia ser facilmente suprida com o consumo diário de uma porção de apenas 21 g da casca do mamey e 37 g da semente da cereja-do-mato, respectivamente. Por outro lado, o cobre e o manganês, foram determinados em concentrações menores, podendo complementar a recomendação diária desses minerais. Cabe destacar ainda, que de uma forma geral, as partes das frutas que geralmente são descartadas ou não consumidas (cascas e sementes) foram as partes das frutas que apresentaram as quantidades maiores dos minerais analisados, sinalizando que esses resíduos podem ser aproveitados no desenvolvimento de novos produtos pela indústria de alimentos.

	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Cereja-do-Mato</b>				
Casca	56,5 <sup>C</sup> ±1,5	221 <sup>E</sup> ±5	36 <sup>C</sup> ±4	110 <sup>C,D</sup> ±5
Polpa	38,2 <sup>D</sup> ±6,5	153,2 <sup>F</sup> ±11,7	10 <sup>D</sup> ±2	72 <sup>E</sup> ±4
Semente	138 <sup>A</sup> ±4	241 <sup>D,E</sup> ±8	72 <sup>A,B</sup> ±2	181 <sup>A</sup> ±6
<b>Saraguajá</b>				
Casca+Polpa	67 <sup>B,C</sup> ±5	398 <sup>B</sup> ±8	55 <sup>B,C</sup> ±6	123 <sup>C</sup> ±14
Semente	75 <sup>B</sup> ±5	350 <sup>C</sup> ±8	69,1 <sup>A,B</sup> ±0,5	157 <sup>B</sup> ±1
<b>Mamey</b>				
Casca	38,8 <sup>D</sup> ±8,2	684,3 <sup>A</sup> ±22	84 <sup>A</sup> ±17	105 <sup>C,D</sup> ±11
Polpa	83,4 <sup>B</sup> ±8,8	268 <sup>D</sup> ±8	54 <sup>B,C</sup> ±7	92 <sup>D,E</sup> ±10

**Tabela 2:** Concentrações dos minerais Cu, Fe, Mn, Zn (mg kg<sup>-1</sup>) nas diferentes partes das frutas cereja-do-mato, saraguajá e mamey.

Dados expressos em média±estimativa de desvio padrão, n=3. Letras maiúsculas na mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 3.2 Composição Lipídica

Na Tabela 3 está apresentada a composição em ácidos graxos determinada nas diferentes partes das frutas em estudo. Pode-se observar que em todas as partes das frutas, foram identificados e quantificados sete ácidos graxos, sendo três saturados (16:0, 18:0 e 20:0), dois monoinsaturados (16:1n-7 e 18:1n-9) e dois poli-insaturados (18:2n-6 e 18:3n-3).

Dentre as partes das frutas analisadas, o teor maior de ácidos graxos saturados foi encontrado na polpa da cereja-do-mato e na semente da saraguajá. Além disso, a semente da saraguajá apresentou a concentração maior de ácidos graxos

monoinsaturados, com destaque para o ácido oleico (18:1n-9). Estudos têm mostrado que o ácido oleico apresenta propriedades biológicas, como efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico (CHEN et al., 2018; CONNOR, 2000; HØSTMARK e HUANG, 2013; KIM et al., 2015). Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados, as polpas da cereja-do-mato e do mamey apresentaram as concentrações maiores dos ácidos linoleico (ômega-6) e alfa-linolênico (ômega-3), respectivamente. De acordo com Coimbra e Jorge (2012), a presença de ácidos graxos poli-insaturados, com destaque a classe dos ômega-3 e ômega-6, são de grande importância para saúde humana por serem ácidos graxos essenciais. Outro parâmetro que avalia a qualidade dos ácidos graxos presentes é a razão ômega-6/ômega-3. Conforme Simopoulos (2002), a razão ótima entre a classe destes ácidos graxos é entre 1 e 4. Com exceção da polpa e da semente da cereja-do-mato, todas as demais partes apresentaram as razões recomendadas, sendo, portanto, alimentos indicados para uma dieta equilibrada. Outras frutas nativas e exóticas apresentaram perfil lipídico similar ao encontrado neste trabalho, tais como a aração-boi, a siriguela e o murici (RIBEIRO et al., 2013).

Ácido Graxo	Cereja-do-mato			Saraguajá		Mamey	
	Casca	Polpa	Semente	Casca+Polpa	Semente	Casca	Polpa
<b>16:00</b>	57,8 <sup>C</sup> ±9,4	297,8 <sup>A</sup> ±5,9	69,7 <sup>C</sup> ±5,8	11,1 <sup>E</sup> ±2,5	181,5 <sup>B</sup> ±1,4	34,1 <sup>D</sup> ±4,0	72,0 <sup>C</sup> ±3,1
<b>16:1n-7</b>	1,8 <sup>C</sup> ±0,5	32,5 <sup>A</sup> ±4,0	1,0 <sup>D</sup> ±0,4	0,4 <sup>D</sup> ±0,1	3,8 <sup>B</sup> ±1,4	0,36 <sup>E</sup> ±0,04	0,38 <sup>E</sup> ±0,04
<b>18:00</b>	10,9 <sup>D</sup> ±2,5	26,2 <sup>B</sup> ±5,3	12,4 <sup>C,D</sup> ±4,6	3,1 <sup>G</sup> ±2,0	66,2 <sup>A</sup> ±5,1	7,1 <sup>F</sup> ±1,5	19,9 <sup>C</sup> ±1,1
<b>18:1n-9</b>	11,5 <sup>E</sup> ±0,1	8,2 <sup>E</sup> ±6,2	18,7 <sup>D</sup> ±1,0	15,1 <sup>D,E</sup> ±3,4	168,7 <sup>A</sup> ±4,0	34,8 <sup>C</sup> ±3,9	83,7 <sup>B</sup> ±4,7
<b>18:2n-6</b>	65,5 <sup>D</sup> ±8,8	190,3 <sup>A</sup> ±6,5	111,1 <sup>C</sup> ±4,9	7,6 <sup>F</sup> ±3,2	124,6 <sup>B</sup> ±1,4	8,9±1,4	13,1 <sup>E</sup> ±2,7
<b>18:3n-3</b>	40,3 <sup>B</sup> ±7,9	32,8 <sup>B</sup> ±4,2	16,8 <sup>C</sup> ±1,3	5,6 <sup>D</sup> ±0,1	42,7 <sup>B</sup> ±2,6	31,7 <sup>B</sup> ±2,6	85,5 <sup>A</sup> ±3,7
<b>20:00</b>	2,10 <sup>D</sup> ±0,6	3,4 <sup>B</sup> ±0,5	2,6 <sup>B,D</sup> ±0,4	0,15 <sup>F</sup> ±0,07	5,96 <sup>A</sup> ±0,08	1,2 <sup>E</sup> ±0,08	2,5 <sup>C</sup> ±0,1
<b>ΣSaturados</b>	70,9	327,5	84,7	14,3	253,7	42,4	94,5
<b>ΣMonoinsaturados</b>	13,4	40,8	19,7	15,5	172,5	35,2	84,1
<b>ΣPoliinsaturados</b>	105,8	223,1	127,9	13,3	167,4	40,6	98,6
<b>n-3</b>	40,3	32,8	16,8	5,6	42,7	31,7	85,5
<b>n-6</b>	65,5	190,3	111,1	7,6	124,6	8,9	13,0
<b>n-6/n-3</b>	1,6	5,8	6,6	1,3	2,9	0,3	0,1

**Tabela 3:** Composição em ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais) das diferentes partes das frutas cereja-do-mato, saraguajá e mamey.

Dados expressos em média±desvio padrão, n=3. Letras maiúsculas na mesma linha apresentam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

## 4 | CONCLUSÃO

Os resultados de composição centesimal mostraram que as frutas avaliadas não são fontes proteicas e lipídicas importantes, uma vez que apresentaram valores de proteína bruta e lipídios totais inferiores a 7,1 e 1,5%, respectivamente. Por outro

lado, algumas partes das frutas estudadas apresentaram quantidades significativas de minerais. A casca do mamey, casca+polpa da saraguajá e as sementes da cereja-do-mato, apresentaram  $241\pm 8$ ,  $398\pm 8$  e  $684,3\pm 22$  mg  $\text{kg}^{-1}$  de ferro, respectivamente e  $181\pm 6$ ,  $123\pm 14$  e  $105\pm 11$  mg  $\text{kg}^{-1}$  de zinco, respectivamente.

A partir da determinação da composição em ácidos graxos das diferentes partes das frutas, pode-se observar a presença do ácido oleico, um importante ácido graxo monoinsaturado, e dos ácidos graxos poli-insaturados, linoleico e alfa-linolênico, em todas as partes das frutas avaliadas. As concentrações mais elevadas do ácido oleico foram encontradas nas sementes da saraguajá ( $168,73\pm 3,9$  mg  $\text{g}^{-1}$  de LT) e na polpa do mamey ( $83,76\pm 4,7$  mg  $\text{g}^{-1}$  de LT). As sementes da saraguajá também se destacaram em relação a quantidade de ácido linoleico, assim como a polpa da cereja-do-mato, as quais apresentaram concentrações de  $124,67\pm 1,4$  e  $190,37\pm 6,5$  mg  $\text{g}^{-1}$  de LT, respectivamente. E, em relação ao ácido alfa-linolênico, a concentração maior foi encontrada na polpa do mamey ( $85,55\pm 3,7$  mg  $\text{g}^{-1}$  de LT).

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que todas as frutas avaliadas podem contribuir para as recomendações diárias de proteínas, minerais e ácidos graxos, com destaque para os ácidos graxos oleico, linoleico e alfa-linolênico, trazendo benefícios para a saúde humana. Cabe ressaltar ainda, que as sementes apresentaram as quantidades mais elevadas de proteínas, as cascas e as sementes apresentaram as quantidades mais elevadas da maioria minerais avaliados e as sementes da saraguajá e da cereja-do-mato apresentaram quantidades elevadas de ácidos graxos poli-insaturados. Assim, pode-se concluir que as cascas e as sementes, que são as partes das frutas que geralmente são descartadas ou não consumidas, são também fontes importantes de nutrientes.

## 5 | REFERÊNCIAS

Agrostat Brasil/MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>. Acessado em: 13 de junho 2018.

ALMEIDA, V. V. et al. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos por meio de reação de complexação do íon cúprico. **Química Nova na Escola**, v.35, p.34-40, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 269**, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. Arlington: AOAC, v.1, 1998.

BALERDI, C.F.; CRANE, J.H., MAGUIRE, J.I. *Mamey sapote* growing in the Florida home landscape. **Horticultural Science Department**, University of Florida, 2005. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/mg331>. Acessado em: 13 junho de 2018.

BERTO, A. et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native

Amazonian fruits. **Food Research International**, v.77, p.441-449, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v.3, 2008.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003.

CHEN, X. et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. **Life Sciences**, v.203 p. 291–304, 2018.

COIMBRA, M.C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.679-684, 2012.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 877-886, 2007.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.171S–5S, 2000.

DAVIS, D. L.; PONELEIT, C. G. Sterol accumulation and composition in developing *Zea mays* L. kernels. **Plant Physiology**, v.54, p.794-796, 1974.

DAWSON, W.; MAUREL, N.; KLEUNEN, M. V. A new perspective on trait differences between native and invasive exotic plants: comment. **Ecology**, v.96, p.1150–1152, 2015.

DOMKE, A. et al. Use of minerals in foods - Toxicological and nutritional-physiological aspects. **German Federal Institute for Risk Assessment**, p. 189–226, 2006.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 2. ed. Nova Iorque: Editora Marcel Dekker, 1985.

GHOLAP, A. S.; BANDYOPADHYAY, C. Fatty acid biogenesis in ripening mango (*Mangifera indica* L. var. Alphonso). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p.839–841, 1980.

GRAMLICH, M. D. L. et al. Essential Fatty Acid Deficiency in 2015: The Impact of Novel Intravenous Lipid Emulsions. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.39, p. 61S–66S, 2015.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-476, 1973.

HØSTMARK, A.T.; HUANG, A. Percentage oleic acid is inversely related to percentage arachidonic acid in total lipids of rat serum. **Lipids in Health and Disease**, v.12, p.1-7, 2013.

KIM, H. et al. Oleic acid ameliorates A $\beta$ -induced inflammation by downregulation of COX-2 and iNOS via NF $\kappa$ B signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.1-11, 2015.

LIMA, B. N. B. et al. Determination of the centesimal composition and characterization of flours from fruit seeds. **Food Chemistry**, v.151, p.293-299, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

- MARTIN, C.A et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, p.761-770, 2006.
- MARTÍNEZ, R. et al. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v.135, p.1520-1526, 2012.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**. Paris: Editora OECD Publishing, 2015.
- OLIVEIRA, T. B. et al. Caracterização das Folhas e Cascas da *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, p.534-41, 2010.
- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Chemistry**, v.74, p.10-36, 2015.
- OZILGEN, S. Influence of Chemical Composition and Environmental Conditions on the Textural Properties of Dried Fruit Bars. **Czech Journal of Food Science**, v.29, p.539-547, 2011.
- REETZ, E. R. **Anuário brasileiro da Fruticultura 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015.
- RIBEIRO, A. B., et al. Antioxidant capacity, total phenolic content, fatty acids and correlation by principal component analysis of exotic and native fruits from Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, 797-804, 2013.
- SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.365-379, 2002.
- TORRES-RODRÍGUEZ, A. et al. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. **Food Research International**, v.44, p.1956-1961, 2011.
- TLILI, N. et al. Variation in protein and oil content and fatty acid composition of *Rhus tripartitum* fruits collected at different maturity stages in different locations. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.197-201, 2014.
- TRABELSI, H. et al. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing in Tunisia. **Food Chemistry**, v.131, p.434-440, 2012.
- VAUZOUR, D. et al. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. **Nutrients**, v.2, p.1106-1131, 2010.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4705-4714, 2006.
- VISETAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, p.274-279, 2012.

## DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A INSETOS COLETADOS EM CULTIVO DE MORANGUEIRO

### **Carolina Gracia Poitevin**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba – PR

### **Mariana Vieira Porsani**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba – PR

### **Alex Sandro Poltronieri**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Florianópolis – SC

### **Maria Aparecida Cassilha Zawadneak**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba – PR

### **Ida Chapaval Pimentel**

Universidade Federal do Paraná  
Curitiba – PR

**RESUMO:** A incidência de doenças e pragas é um dos maiores problemas do cultivo do morangueiro, cultura de grande importância sócio-econômica no Brasil. A mariposa *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga de difícil manejo devido às altas infestações ao longo de todo o ano e aos danos causados pela lagarta. Assim, o controle biológico surge como uma alternativa, em contraponto ao uso de pesticidas, pois possui alta especificidade e não apresenta danos colaterais. Para o desenvolvimento de novos métodos de controle, o conhecimento

da microbiota fúngica associada a insetos é relevante sob os aspectos ecológicos e agrícolas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a diversidade de fungos provenientes de insetos coletados da cultura do morangueiro e avaliar o potencial dos isolados de *Beauveria bassiana* no controle da praga *D. fovealis*. Foram coletados insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera e Diptera. A partir desses insetos, as espécies fúngicas *Fusarium oxysporum*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium chrysogenum* e *Mucor fragilis* foram isoladas com maior frequência. Quando testadas contra *D. fovealis*, as linhagens de *B. bassiana* apresentaram mortalidade variando entre 0 a 67%. A avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos presentes na cultura do morangueiro sobre *D. fovealis* pode viabilizar o uso de micro-organismos promissores e adaptados às condições climáticas e ambientais das regiões produtoras de morango no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungo entomopatogênico, controle biológico, *Beauveria bassiana*

**ABSTRACT:** The incidence of diseases and pests is one of the major problems of strawberry cultivation, a culture of great socio-economic expression in Brazil. The moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) is a pest difficult to manage due to high infestations

throughout the year and damage caused by the larvae. Thus, biological control is an alternative, in opposition to the use of pesticides, since it has high specificity and does not present collateral damages. For the development of new control methods, the knowledge of the fungal microbiota associated to insects is relevant under ecological and agricultural aspects. Thus, the objective of this work was to verify the diversity of fungi from insects collected from the strawberry crop and to evaluate the potential of the *Beauveria bassiana* isolates in the control of the pest *D. fovealis*. Insects belonging to the orders Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera and Diptera were collected. From these insects, the fungal species *Fusarium oxysporum*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium chrysogenum* and *Mucor fragilis* were isolated more frequently. When tested against *D. fovealis*, *B. bassiana* strains showed mortality varying from 0 to 67%. The evaluation of the pathogenicity of entomopathogenic fungi present in the strawberry crop on *D. fovealis* can make feasible the use of promising microorganisms adapted to the climatic and environmental conditions of the strawberry producing regions in Brazil.

**KEYWORDS:** Entomopathogenic fungi, biological control, *Beauveria bassiana*

## 1 | INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duchesne) é uma cultura de grande importância socioeconômica no Brasil (CARVALHO, 2011). A incidência de doenças e pragas é um dos maiores problemas de seu cultivo, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias para o controle de tais patógenos e insetos-praga (OSHITA; JARDIM, 2012). O controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos surge como uma alternativa a ser considerada no manejo integrado, em contraponto ao uso excessivo de pesticidas, pois possui alta especificidade e baixa contaminação (VAN LENTEREN, 2012).

A lagarta *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga polífaga presente em vários países da Europa, Ásia, África e América do Norte. No Brasil, foi detectada pela primeira vez em áreas de morangueiro em 2008 no Paraná, sendo verificada sua rápida dispersão para outras regiões produtoras (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Devido às altas infestações ao longo de todo o ano e aos danos causados pela lagarta, tem sido utilizados inseticidas químicos não autorizados de forma indiscriminada, uma vez que no Brasil não há registro de pesticidas que podem ser utilizados para o controle desta praga (MAPA, 2018).

Assim, o conhecimento da microbiota fúngica associada a insetos é relevante sob os aspectos ecológicos e agrícolas para o desenvolvimento de novos métodos de controle (SUN; LIU, 2008). Neste estudo, o objetivo foi verificar a diversidade de fungos provenientes de insetos da cultura do morango e selecionar a linhagem de *Beauveria bassiana* com maior potencial entomopatogênico sobre *D. fovealis*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta de insetos e isolamento fúngico

Insetos sintomáticos ou mortos por fungos entomopatogênicos foram coletados em áreas comerciais de morangueiro no estado do Paraná entre maio de 2014 e fevereiro de 2015. Em cada área 50 plantas foram vistoriadas e os insetos encontrados foram individualizados em tubos esterilizados. Em laboratório, os insetos passaram por desinfecção externa (ALVES, 1998). Para o isolamento dos fungos entomopatogênicos foram utilizados os protocolos descritos por Tuininga et al. (2009).

### 2.2. Identificação dos isolados fúngicos

Os isolados foram identificados por macro e micromorfologia (BARNETT; HUNTER, 1972; DE HOOG et al, 2000; ROSSMAN; PALM; SPIELMAN, 1987) e por sequenciamento da região ITS ribossomal (WHITE et al., 1990).

### 2.3. Criação e manutenção de insetos em laboratório

Adultos de *D. fovealis* foram coletados em áreas de cultivo de morangueiro e mantidos em laboratório em condições controladas de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , Umidade Relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas, sendo alimentados por dieta artificial (ZAWADNEAK et al., 2017).

### 2.4. Testes de patogenicidade contra *Duponchelia fovealis*

Folhas de morangueiro passaram por desinfecção superficial (ARAÚJO et al., 2002) e posteriormente tiveram seus pecíolos envoltos em algodão e colocados em um tubo de vidro com água destilada esterilizada e isolados em placas acrílicas. Sobre cada folha foram transferidas 10 larvas de 3º instar de *D. fovealis*, sendo posteriormente pulverizadas com 1 mL de uma suspensão na concentração de  $1,5 \times 10^7$  conídios/mL + Tween80 (0,01%). Após a pulverização as folhas permaneceram em condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $60 \pm 10\%$  e fotofase: 12 horas).

Para obtenção das suspensões os fungos foram inoculados em placas de Petri com meio níger e mantidos a  $28^\circ\text{C}$  por 14 dias. Após este período micélios e esporos foram retirados das placas e transferidos para tubos com solução salina (0,85% NaCl + Tween80). Estes tubos foram agitados, as suspensões foram filtradas e ajustadas a  $1,5 \times 10^7$  conídios/mL por meio de um hemocítmetro.

As avaliações de mortalidade foram realizadas após cinco dias, sendo considerado morto o inseto que não respondeu ao estímulo do toque de um pincel de cerdas finas. Os insetos mortos foram mantidos em placas de Petri com papel filtro umedecido até a exteriorização dos micélios para confirmação do agente causal. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo cada fungo considerado um tratamento com cinco repetições. Como controle foi empregando água destilada

esterilizada + Tween80. Os dados de mortalidade foram corrigidos em relação a mortalidade do controle (ABBOTT, 1925). Quando houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos foram realizadas comparações múltiplas (Tukey,  $p < 0,05$ ) com o software estatístico R versão 2.15.1.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Insetos

Foram coletados 160 insetos pertencentes às ordens Lepidoptera (40.6%), Coleoptera (30.8%), Hemiptera (9.8%), Hymenoptera (9.8%) e Diptera (9.0%), normalmente associadas à cultura de morangueiro (BERNARDI et al., 2015). Um quarto destes insetos era adulto ou larvas de *Duponchelia fovealis*, praga que tem causado perdas significativas aos produtores (ZAWADNEAK et al., 2017).

#### 3.2. Identificação dos isolados fúngicos

Metade dos insetos coletados mostrou crescimento de fungos quando cultivados em ágar, em um total de 80 isolados de 26 diferentes espécies (Figura 1). *Fusarium oxysporum* (22.8%) e *Beauveria bassiana* (16.3%) foram as espécies mais encontradas. O único gênero de fungo entomopatogênico conhecido foi *Beauveria*, e 13 linhagens encontradas foram isoladas de Coleópteros das famílias Reduviidae (38,6%), Chrysomelidae (38,6%) e Nitidulidae (7,6%), Hymenopteros (7,6%) e lepidópteros (7,6%).

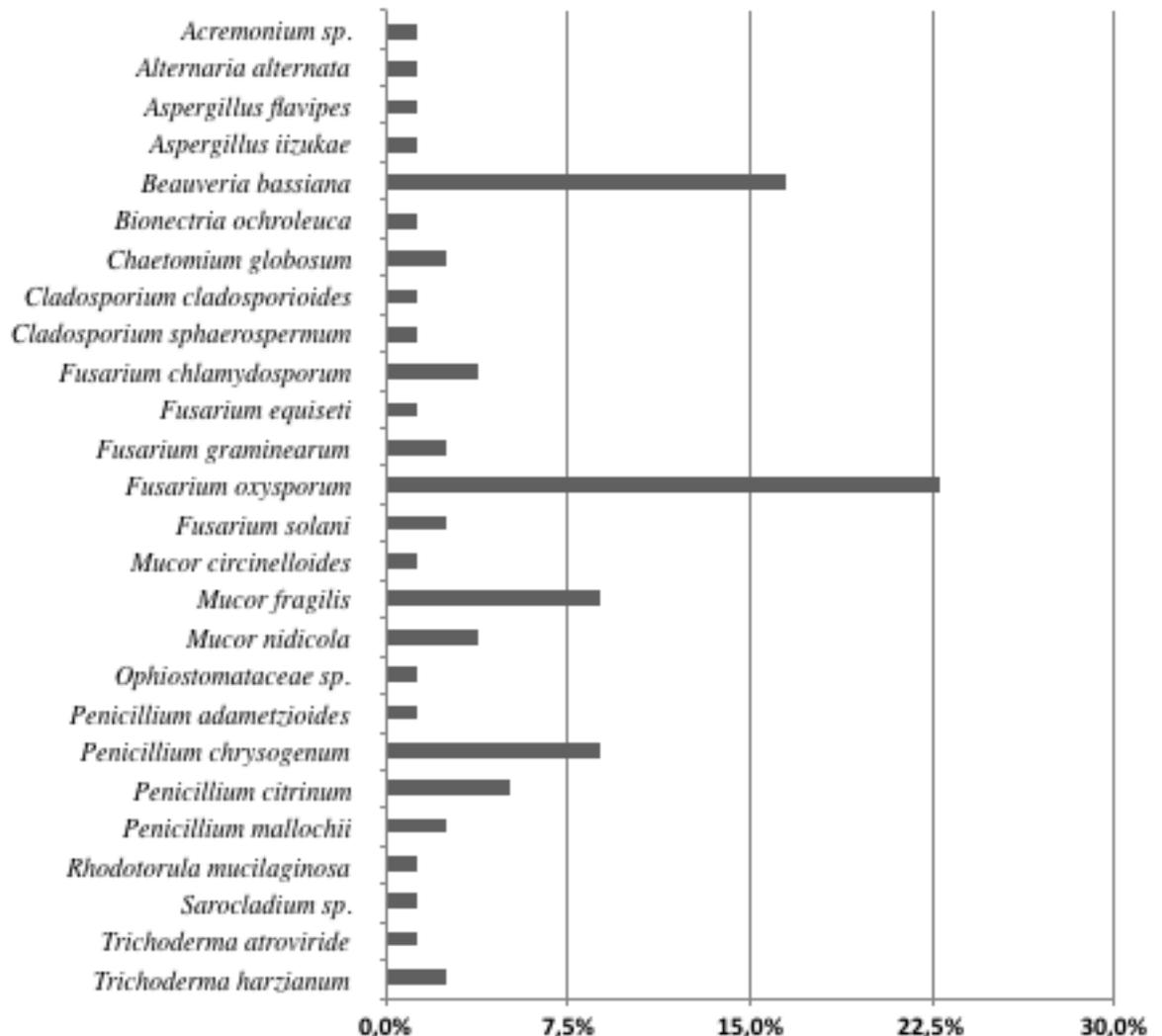


Figura 1. Frequência de fungos isolados de insetos em cultivo de morangueiro.

A ocorrência destas espécies pode estar ligada à diversidade de hospedeiros (URIBE; KHACHATOURIANS, 2004) e à adaptação a região de ocorrência (ZIMMERMANN, 2007). Além disso, práticas agrícolas como adubação química, uso de pesticidas e os sistemas de cultivo influenciam a diversidade da microbiota de áreas agrícolas (JARONSKI, 2007).

### 3.3. Testes de patogenicidade contra *Duponchelia fovealis*

A mortalidade de larvas de *D. fovealis* após 5 dias variou de 0 a 67% (Figura 2). Os isolados SA115F5 e SA111F4 foram os únicos que se diferenciaram significativamente dos demais ( $F=17.36$ , g.l.=13,56,  $P<0,0001$ ), com mortalidade de 66 e 67%, respectivamente. Já os demais isolados causaram uma mortalidade inferior a 27%, com SA115F2 não afetando nenhuma larva. Essa variação é um indicativo de variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2004; VALERO-JUMÉNEZ et al., 2016). A alta mortalidade causada por SA111F5 e SA111F4 pode ser um indicativo de uma rápida germinação, formação do apressório (SHANG et al., 2015), rompimento do tegumento e colonização do hospedeiro (FAN et al., 2012).

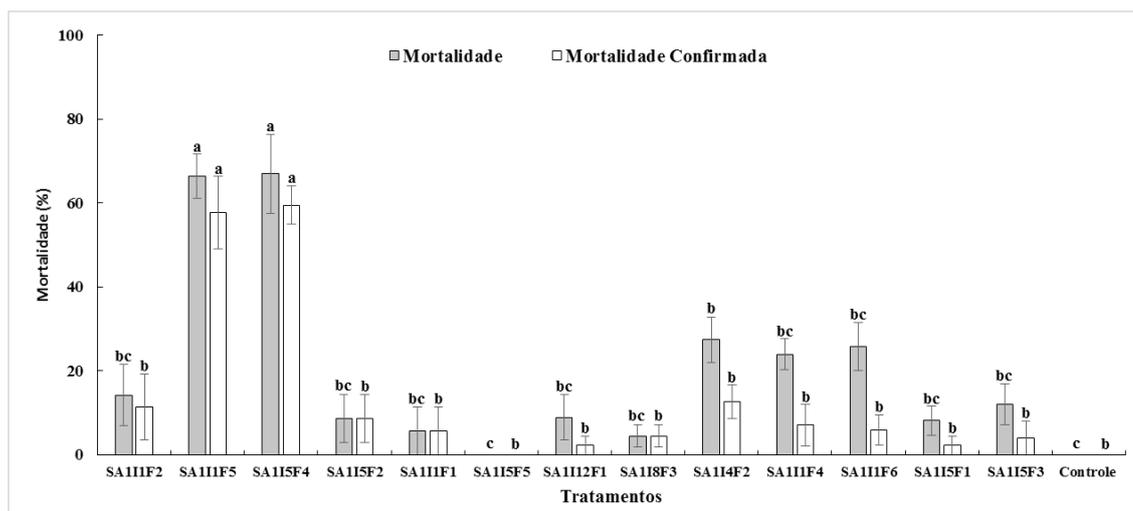


Figura 2. Mortalidade de larvas de terceiro instar de *Duponchelia fovealis* pulverizadas com suspensão de esporos de *Beauveria bassiana* na concentração de  $1,5 \times 10^7$  conídios/mL.

A mortalidade confirmada, verificada pela extrusão de micélios dos cadáveres dos insetos que permaneceram em câmara úmida, foi significativamente diferente entre os isolados ( $F=17.48$ , g.l.=13,56,  $P<0,0001$ ). A diferença entre a mortalidade e a mortalidade confirmada foi de apenas 13 % para o isolado SA11F5 e 11% para SA115F4, para os demais isolados as diferenças entre mortalidade e mortalidade confirmada variou entre 20 e 100%. Apesar dos isolados SA115F2 e SA111F1 terem 100% de mortalidade confirmada não foram selecionados devido a mortalidade sobre larvas de 3º instar de *D. fovealis* ser inferior a 10% (Figura 2).

#### 4 | CONCLUSÃO

O conhecimento da diversidade de fungos que incidem em áreas de morangueiro é importante para o desenvolvimento de estratégias de conservação. Além disso, o direcionamento de pesquisas para seleção e conhecimento do potencial de destes micro-organismos pode disponibilizar linhagens promissoras para emprego em programas de controle biológico.

#### REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba (SP): Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, P.T.

**Manual: Isolamento de microorganismos endofíticos.** Calq, Piracicaba, 2002.

BARNETT, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3 ed. Burgess Publ., Minneapolis, 1972.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D.E.; ZAWADNEAK, M.A.C. **Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro.** Embrapa, Brasília, 2015.

CARVALHO, S.P. Histórico e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Revista de Horticultura Brasileira**, v.29, n.2, CD-ROM, 2011.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi.** ASM, Utrecht, 2000.

FAN, Y.; ORTIZ-URQUIZA, A.; KUDIA, R.A.; KEYHANI, N.O. A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, *Bbcsa1*, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v.158, p.1843–1851, 2012.

JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In Ekesi, S., & Maniania, N.K. (Eds.): **Use of entomopathogenic fungi in biological pest management.** Research Signpost, Kerala, 91–144, 2007.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** 2018. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em maio de 2018).

OLIVEIRA, R.C.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, L.F.A. Entomopathogenic fungi selection to control *Oligonychus yothersis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in Paraguay tea crops (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). **Neotropical Entomology**, v.33, n.3, p.347–351, 2004.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: Uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52–76, 2012.

ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E.; SPIELMAN, L.J. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi.** APS Press, St Paul, 1987.

SHANG, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LU, Y.; WANG, C. MrSkn7 controls sporulation, cell wall integrity, autolysis, and virulence in *Metarhizium robertsii*. **Eukaryotic Cell**, v.14, p.396–405, 2015.

SUN, B.D.; LIU, X.Z. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.100–108. 2008.

TUININGA, A.R.; MILLER, J.L.; MORATH, S.U.; DANIELS, T.J.; FALCO, R.C.; MARCHESE, M.; ... STAFFORD III, K.C. Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: Prevalence and methods. **Journal of Medical Entomology**, v.46, n.3, p.557–565, 2009.

URIBE, D.; KHACHATOURIANS, G.G. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation. **Mycological Research**, v.108, n.9, p.1070–1078, 2004.

VALERO-JIMÉNEZ, C.A.; WIEGERS, H.; ZWAAN, B.J.; KOENRAADT, C.J.M.; VAN KAN, J.A.L. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.133, p.41–49, 2016.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p. 1-20, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J. (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, 315–322, 1990.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553–596, 2007.

## COMPARAÇÃO ENTRE O TESTE DA CAMINHADA DE SEIS MINUTOS E O *INCREMENTAL SHUTTLE WALK TEST* SOB AS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

### **Valmir Ferreira da Silva Júnior**

Faculdade Natalense de Ensino e Cultura/  
Universidade Paulista (FANEC/UNIP)  
Natal/RN

### **Gabriel Martins de Araújo**

Faculdade Natalense de Ensino e Cultura/  
Universidade Paulista (FANEC/UNIP)  
Natal/RN

### **Catharine Angélica Carvalho de Farias**

Faculdade Natalense de Ensino e Cultura/  
Universidade Paulista (FANEC/UNIP)  
Natal/RN

### **Francisco Assis Vieira Lima Júnior**

Centro Universitário do Rio Grande do Norte  
(UNIRN)  
Natal/RN

### **Rodrigo Augusto Xavier de Sousa Barros**

Faculdade Natalense de Ensino e Cultura/  
Universidade Paulista (FANEC/UNIP)  
Natal/RN

### **Rêncio Bento Florêncio**

Faculdade Natalense de Ensino e Cultura/  
Universidade Paulista (FANEC/UNIP)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
(UFRN)  
Natal/RN

funcional, destacando-se entre eles o Teste da caminhada dos seis minutos(TC6m) e o *Incremental Shuttle Walk test(Shuttle)*. O objetivo foi comparar o TC6m e o *Shuttle* sob as variáveis hemodinâmicas em adultos jovens saudáveis. Estudo analítico observacional de caráter transversal. A coleta de dados foi realizada em dois dias distintos, com sujeitos de ambos os gêneros acima de 18 anos, através da antropometria, perfil de atividade física(IPAQ), TC6m e *Shuttle*. Foram avaliados 50 sujeitos [25 Mulheres(GF) e 25 Homens(GM)]. Observamos diferenças estatísticas significativas( $p < 0.05$ ) no momento pré-teste para as seguintes variáveis: altura, peso, frequência cardíaca(FC) de repouso, pressão arterial(PA) sistólica e PA diastólica. Para a distância predita caminhada em ambos os testes, tanto o GF como o GM apresentaram maiores valores para o TC6m (GF: TC6m vs *Shuttle*,  $90.2 \pm 13.7$  vs  $82.2 \pm 11.8$ ,  $p = 0.04$ ; GM: TC6m vs *Shuttle*,  $96.4 \pm 10.5$  vs  $65.5 \pm 16.9$ ,  $p < 0.0001$ ). Os indivíduos demonstraram maiores valores atingidos para FC no TC6m quando comparado ao *Shuttle* [GF: diferenças estatisticamente significativas( $p < 0.05$ ) na FC (1°, 2°, 3° e 4° min), FC final e FC de recuperação no 2° minuto pós teste; GM: diferenças significativas a FC(1° e 2° min), FC de recuperação no 1° minuto pós teste(FC recup 1° min), e o **delta de recuperação** da FC no primeiro minuto

**RESUMO:** O teste de esforço submete o indivíduo a um estresse físico programado podendo ser utilizado para avaliar a capacidade

pós teste( $\Delta$  FCrecup1), $p<0.05$ ]. A comparação do *Shuttle* com o TC6m mostra que os dois testes assumem valores semelhantes ao seu final, com valores de distância caminhada, FC e sensação de dispneia superior no TC6m.

**PALAVRAS-CHAVE:** teste de esforço, Fisioterapia, caminhada, hemodinâmica, aptidão cardiorrespiratória.

**ABSTRACT:** The stress test submitted the subject to a scheduled physical stress podcast was used to evaluate a functional capacity, such as the Six-minute Walk Test(6MWT) and Incremental Shuttle Walk Test(*Shuttle*). The aim was to compare 6MWT and Shuttle under hemodynamic variables in healthy young individuals. A Cross-sectional observational analytical study. Data collection was performed on two distinct days, with subjects of both genders over 18 years of age, through anthropometry, physical activity profile(IPAQ), 6MWT and Shuttle. Fifty subjects were evaluated [25 women (GF) and 25 men (GM)]. We observed significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) at the pre-test for the following variables: height, weight, rest heart rate(HR), systolic blood pressure(BP) and diastolic BP. For the predicted walking distance in both tests, both GF and GM presented higher values for 6MWT (GF: TC6m vs *Shuttle*,  $90.22 \pm 13.76$  vs  $82.17 \pm 11.86$ ,  $p=0.04$ ; GM: TC6m vs *Shuttle*,  $96.36 \pm 10.55$  vs  $65.52 \pm 16.93$ ,  $p < 0.0001$ ). The individuals showed higher values achieved for HR on 6MWT when compared to *Shuttle* [GF: statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in HR (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> min), final HR and recovery HR In the 2nd minute post test; GM: significant differences in HR (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> min), recovery HR at 1 min post test (HR recovery 1 min), and HR recovery delta in the first minute post test ( $\Delta$ FCrecovery 1),  $p < 0.05$ ]. Comparison of Shuttle with the 6MWT shows that the two tests assume values similar to their end, with values of walking distance, HR and sensation of upper dyspnea in the 6MWT.

**KEYWORDS:** stress test, Physical Therapy, hiking, hemodynamics, cardiorespiratory fitness.

## 1 | INTRODUÇÃO

A baixa capacidade física, associada ao sedentarismo, tem uma importante relação com alta morbimortalidade e diminuição da qualidade de vida em indivíduos saudáveis. Deste modo, é essencial atentar-se para modos de avaliar a capacidade física, e assim identificar indivíduos que precisem de intervenções com a finalidade de trazer melhoras da tolerância ao exercício (Aquino *et al.*, 2010).

O teste de esforço submete o indivíduo a um estresse físico programado e personalizado podendo ser utilizado para avaliar a capacidade funcional (CF), a resposta clínica, hemodinâmica e metabólica ao esforço. Visto que o ato de andar é uma das principais atividades da vida diária (AVD's), os testes de caminhada têm sido propostos para medir o estado ou a capacidade funcional de pacientes. Dentre os principais testes de esforço podemos citar o teste de caminhada de seis minutos

(TC6m) e o *Incremental Shuttle Walk Test* (ISWT). Nos últimos anos, o uso de testes de exercício é reconhecido como um método conveniente na avaliação de alterações que ocorrem em nosso organismo em função da necessidade de se conhecer as reservas de vários sistemas corporais (Roberta *et al.*, 2012).

O TC6m foi originalmente desenvolvido para avaliar a CF, monitorar a efetividade de tratamentos diversos e estabelecer o prognóstico de pacientes com doenças cardiorrespiratórias, que apresentam intolerância ao exercício físico devido ao mau funcionamento dos sistemas respiratório e/ou cardiovascular e à disfunção dos músculos esqueléticos periféricos e respiratórios (Dourado, 2011). O consumo de oxigênio durante o TC6m corresponde a um exercício submáximo, tendo em vista que esse consumo atinge um índice alto, mas que não chega ao valor máximo. Além disso, o mesmo reflete de maneira mais acurada as limitações às AVD's, já que caminhar é uma atividade que quase todos os pacientes são capazes de realizar, exceto aqueles mais afetados por alguma doença (Aquino *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2011).

O ISWT, ou *Shuttle*, foi desenvolvido para avaliar a CF de exercício em indivíduos com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). O caráter incremental do *Shuttle* produz respostas fisiológicas próximas às observadas no teste de exercício cardiopulmonar (TECP), e tem se mostrado útil para quantificar os benefícios de programas de caminhada desenvolvidos para indivíduos saudáveis. Apesar da ampla utilização do Shuttle em ambientes clínicos, poucos estudos avaliaram valores de referência e respostas fisiológicas ao teste (Roberta *et al.*, 2012). Além de ser simples e de baixo custo, o *Shuttle* também tem se mostrado útil para quantificar os benefícios de programas de caminhada desenvolvidos para indivíduos saudáveis (Rondelli *et al.*, 2009).

Alguns autores já demonstraram que o *Shuttle* exige um maior esforço do sujeito, aproximando-se mais das respostas observadas no TECP, enquanto que o TC6m se apresenta como um teste submáximo pelo fato de cada sujeito ditar seu próprio ritmo. Porém a literatura ainda é escassa de estudos que comparem os dois testes quanto à repercussão hemodinâmica em sujeitos saudáveis (Rondelli *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013; Britto *et al.*, 2006). Portanto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma comparação entre o teste da caminhada de seis minutos (TC6m) e o *Incremental Shuttle Walk test* (ISWT) sob as variáveis hemodinâmicas em indivíduos saudáveis:

## 2 | METODOLOGIA

Estudo analítico observacional de caráter transversal para avaliar as variáveis hemodinâmicas (pressão arterial, frequência cardíaca e saturação periférica de oxigênio) em indivíduos saudáveis submetidos ao TC6m e o ISWT. Seguindo a resolução de nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), parecer nº 1.731.087,

todos os sujeitos foram informados sobre o objetivo do estudo, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

## 2.1 Seleção da Amostra

O recrutamento da amostra aconteceu por conveniência entre alunos de uma instituição de ensino superior, pertencentes a ambos os gêneros, divididos em grupo feminino e masculino, e submetidos à coleta de dados de identificação, antropometria e Questionário internacional de atividade física (IPAQ), validado para população brasileira (Pardini *et al.*, 1997). Para a coleta de dados de identificação e antropométricos foi utilizado um questionário elaborado pelos pesquisadores.

Como critérios de inclusão, foram adotados: indivíduos acima de 18 anos, autodeclarados como saudáveis, sem diagnóstico prévio de patologias cardiorrespiratórias e/ou ortopédicas, não tabagistas e que não façam uso de drogas ilícitas. Foram excluídos do estudo os indivíduos que apresentaram quaisquer dificuldades de deambulação e que desistiram durante os procedimentos de coletas.

## 2.2 Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ)

O IPAQ foi utilizado para avaliar o nível de atividade física dos voluntários do estudo. Trata-se de um instrumento de fácil aplicação, boa precisão e baixo custo. Oferece dados sobre duração da atividade, frequência, intensidade e tipo de atividade, sendo possível classificar as atividades em leves, moderadas e vigorosas.

Aversão curta do IPAQ é composta por quatro questões abertas e suas informações permitem estimar o tempo despendido, por semana, em diferentes dimensões de atividade física (caminhada e esforços físicos de intensidades moderada e vigorosa) e de inatividade física (posição sentada) (Pardini *et al.*, 1997).

## 2.3 Teste da Caminhada dos Seis minutos (TC6m)

O TC6m foi realizado em um ambiente fechado, plano em toda sua extensão de 30 m de comprimento, demarcados de 3 em 3 m, superfície resistente e raramente percorrida para que não houvesse interrupções. O momento de fazer a curva foi marcado com um cone que estava localizado meio metro antes do início e final do percurso. O indivíduo realizou o teste duas vezes (com intervalo de 30 minutos) (Singh *et al.*, 2014), sendo considerado para análise aquele com maior distância percorrida, e foi orientado a caminhar em ritmo próprio o mais rápido que pudesse sem correr, durante os seis minutos, sendo permitido andar devagar, parar, relaxar quando necessário e retornar à caminhada quando sentir-se apto a reassumir o ritmo. O avaliador demonstrou o percurso antes de iniciar o teste e observou o indivíduo parado ao lado do corredor do teste, sem acompanhamento (Aquino *et al.*, 2010; Dourado, 2011).

Ao final do teste a distância total percorrida foi anotada e calculada, os resultados foram comparados com valores de referência para adultos utilizando a equação proposta

por Iwama *et al.* (2009) com base em estudo prévio para a população brasileira.

## 2.4 Incremental Shuttle Walk Test (ISWT)

O ISWT foi realizado no mesmo local que o TC6m. O percurso foi demonstrado ao avaliado pelo examinador antes de iniciar o teste, e cada indivíduo realizou o teste apenas uma vez. Para a realização do teste o sujeito foi instruído a caminhar indo e vindo em uma pista plana de 10m de comprimento com aumentos progressivos de cadência até não ser mais capaz de manter o ritmo. O início e final do percurso assim como o momento de realizar a curva foram marcados com um cone que estava localizado meio metro antes do início e final do percurso. A cadência do sujeito avaliado foi determinada pela emissão de um sinal sonoro, que indicou o momento em que o indivíduo deveria estar no cone e trocar de direção e, conseqüentemente, a cadência também seria alterada. Os sinais sonoros foram gravados em um pen drive e reproduzidos antes do teste para os avaliados (Rondelli *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013). O teste foi interrompido quando o indivíduo não conseguia dar a volta no cone antes do sinal sonoro, por duas vezes consecutivas.

Os valores preditos foram calculados utilizando a equação de referência para a população brasileira proposta por Jürgensen *et al.* (2011).

## 2.5 Desenho do estudo

Após a leitura e assinatura do TCLE os indivíduos, divididos em grupo feminino e grupo masculino, foram orientados quanto aos procedimentos da coleta. Na avaliação inicial registrou-se idade, altura, peso, relação cintura- quadril(C/Q) e o índice de massa corporal (IMC) aplicando valores de corte recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007). O peso foi verificado em balança digital da (Marca FILIZOLA®), a altura obtida por meio de fita antropométrica (Marca Sanny medical de 2m®). Antes e após cada teste foi avaliada a saturação periférica de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) e a frequência cardíaca (FC) por meio de um pulsioxímetro de dedo (Fingertip Pulse Oximeter®), a pressão arterial (PA) com auxílio de esfigmomanômetro (Marca PA. MED, Modelo Premium®), e de estetoscópio (Marca Spirit, Modelo deluxe series®), e a fadiga e dispneia por meio da Escala de Borg modificada.

Ao final de cada teste, anotou-se o valor das mesmas variáveis, número de voltas dadas, assim como o número de metros da última volta e fadiga e dispneia por meio da Escala de Borg (Nosedá *et al.*, 1992).

## 2.6 Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão. O teste de *Kolmogorov-Sminorv* foi aplicado para verificar a normalidade dos dados, seguido pelo teste *t* de *Student* para comparar as variáveis antropométricas e dos valores alcançados em ambos os testes de caminhada. Correlação de Pearson foi usada para determinação de correlação entre as variáveis distância caminhada, relação cintura-quadril e índice

de massa corpórea (IMC). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como critério para significância estatística. O programa GraphPad Prism 5.0® foi usado para todas as análises (GraphPad software, San Diego, California/USA). O tamanho da amostra foi calculado usando o software G\*Power (G\*Power 3.1.9.2, Kiel, Germany).

### 3 | RESULTADOS

A amostra final foi composta por 50 sujeitos (25 mulheres e 25 homens), que realizaram em dois dias distintos o TC6m e o ISWT. A média e o desvio-padrão da distância caminhada no TC6m e *Shuttle* foram considerados para calcular o tamanho da amostra. Foi encontrado um *d* de *Cohen* de 1.42, considerando um  $\alpha$  menor que 0.05 ( $p < 0,05$ ) com 0.99 de poder. O resultado encontrado indica um efeito muito grande (Cohen, 1988). A amostra ideal calculada para o presente estudo foi de 17 sujeitos em cada grupo.

Todos os participantes toleraram bem os testes, sem nenhuma desistência durante o procedimento de coleta. Com relação aos dados antropométricos, observamos diferenças estatísticas significativas apenas para as variáveis: altura ( $p < 0,0001$ ), peso ( $p = 0,01$ ), frequência cardíaca de repouso (FC) [ $p = 0,01$ ], pressão arterial sistólica (PAS) [ $p = 0,007$ ] e pressão arterial diastólica (PAD) [ $p = 0,003$ ], como descrito na tabela 1.

Variáveis	Mulheres (n=25)	Homens (n=25)	<i>p</i> valor
Idade (anos)	23,36 ± 4,72	22,48 ± 3,98	0,63
Altura (m)	1,62 ± 0,07	1,73 ± 0,07	< 0,0001 *
Peso (kg)	65,48 ± 12,61	74,5 ± 11,8	0,01*
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,65 ± 3,75	25,33 ± 3,68	0,52
C/Q	0,77 ± 0,07	0,80 ± 0,05	0,20
SpO <sub>2</sub> (%)	99,08 ± 1,15	98,72 ± 0,98	0,11
FC (bpm)	84,56 ± 7,57	78,44 ± 9,89	0,01 *
PAS (mmHg)	116,8 ± 8,52	122,4 ± 5,23	0,007 *
PAD (mmHg)	78,8 ± 9,71	86 ± 5,77	0,003 *

Tabela 1. Dados antropométricos e caracterização da amostra total.

Valores expressos em média ± desvio-padrão. IMC: índice de massa corpórea; C/Q: relação cintura-quadril; SpO<sub>2</sub>: Saturação periférica de oxigênio; FC: frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica;  $p < 0,05$  (Teste t de student não pareado e Mann-Whitney).

Os indivíduos do gênero feminino (GF) caminharam, em média, 591 ± 60,6 metros no TC6m, contra 450,24 ± 91,77 metros no *Shuttle* ( $p = 0,0001$ ). Já os do gênero masculino caminharam em média, 604,6 ± 12 metros no TC6m, contra 481 ± 27,36 no *Shuttle* ( $p = 0,0001$ ). Quando analisada a distância predita (Dist. % pred) caminhada em ambos os testes, tanto o grupo feminino como o grupo masculino (GM) apresentaram maiores valores para o TC6m (GF: TC6m *versus Shuttle*, 88,29 ± 12,31

vs 73,99 ±15,34, p =0,0007; GM: TC6m versus Shuttle, 94,48± 9.53 vs 59,77 ± 16,69, p<0,0001), como observado nas tabelas 2 e 3.

Os indivíduos demonstraram, ao final dos dois testes, maiores valores atingidos para FC no TC6m quando comparado ao Shuttle. Com relação ao GF observou-se diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na FC (1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º min), como também na FC média, FC final e no delta de recuperação d FC no 1º e 2º minuto pós teste [Tabela 2]. Ao compararmos a pressão arterial (PA) antes e após a realização dos testes, foi observado diferença estatística significativa apenas no GM para PAD após o TC6m (p = 0,02) [Tabela 2 e 3].

Variáveis	TC6m	ISWT	p valor
Distância (m)	591 ± 60,6	450,24 ± 91,77	0,0001*
Dist. (%pred)	88,29 ± 12,31	73,99 ± 15,34	0,01*
Dispneia (inicial)	0,08 ± 0,4	0,00 ± 0,00	>0,999
Dispneia (final)	5,36 ± 2,5	4,40 ± 2,50	0,180
Fadiga (inicial)	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00	>0,999
Fadiga (final)	4,80 ± 2,06	3,76 ± 1,83	0,06
SpO <sub>2</sub> (inicial)	98,48 ± 1,72	98,24 ± 0,93	0,06
PAS inicial (mmHg)	116,8 ± 8,5	115,2 ± 5,1	0,424
PAS final (mmHg)	128,4 ± 9,4	124,4 ± 9,6	0,180
PAD inicial (mmHg)	79,2 ± 9,5	82 ± 8,6	0,282
PAD final (mmHg)	90 ± 5	87,2 ± 5,4	0,08
FC (inicial)	89,36 ± 10,3	83,08 ± 8,06	0,02
FC (1º min)	113,96 ± 14,23	95,8 ± 10,81	<0,0001*
FC (2º min)	119,24 ± 25,14	102,84 ± 11,93	0,004*
FC (3º min)	123,04 ± 16,64	106,24 ± 13,76	<0,0001*
FC (4º min)	126,52 ± 17,61	111,64 ± 16,29	0,001*
FC (5º min)	127,40 ± 28,56	117,96 ± 20,31	0,009*
FC (6º min)	135,72 ± 12,88	122,80 ± 21,72	0,01*
FC (Média)	121,76 ± 13,86	111,44 ± 17,63	0,02*
FC (Final)	135,56 ± 13,31	119,16 ± 19,42	0,001*
FC (Recup 1º min)	104,44 ± 10,93	99,92 ± 11,62	0,162
FC (Recup 2º min)	94,64 ± 9,15	92,08 ± 10,53	0,478
Δ FCrecup <sub>1</sub>	31,12 ± 9,48	19,24 ± 16,42	0,002*
Δ FCrecup <sub>2</sub>	40,92 ± 10,46	27,08 ± 17,28	0,001*

Tabela 2. Comparação do Teste da caminhada dos seis minutos (TC6m) com Incremental Shuttle Walk Test (ISWT) no grupo feminino.

Valores expressos em média ± desvio-padrão. IMC: índice de massa corpórea; C/Q: relação cintura-quadril; SpO<sub>2</sub>: Saturação periférica de oxigênio; FC: frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; \* p < 0,05 (Teste t de student não pareado e Mann-Whitney).

Variáveis	TC6m	ISWT	p valor
Dist. (m)	604,6 ± 12	481 ± 27,36	0,0001*
Dist. (%pred)	94,48 ± 9,53	59,77 ± 16,69	0,0001*
Dispneia (inicial)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	>0,999
Dispneia (final)	3,72 ± 0,39	4,08 ± 0,48	0,56
Fadiga (inicial)	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00	>0,999
Fadiga (final)	3,12 ± 0,44	3,76 ± 0,43	0,30
SpO <sub>2</sub> (inicial)	98,5 ± 0,8	98,36 ± 0,9	0,57
PAS inicial (mmHg)	122 ± 5,2	123 ± 7,2	0,747
PAS final (mmHg)	133 ± 5,4	136 ± 12,3	0,293
PAD inicial (mmHg)	86 ± 5,8	86 ± 7,6	0,666
PAD final (mmHg)	95 ± 5,1	90 ± 7,6	0,027
FC (inicial)	86,68 ± 11,4	78,36 ± 9,01	0,006
FC (1º min)	113 ± 18	94,68 ± 13,12	0,0001*
FC (2º min)	119,8 ± 20,5	99,84 ± 12,03	0,0001*
FC (3º min)	122,3 ± 20,9	105,2 ± 13,79	0,001*
FC (4º min)	126 ± 22,7	110,6 ± 17	0,009*
FC (5º min)	126,3 ± 22,1	114,3 ± 19,28	0,04
FC (6º min)	129,2 ± 24,3	118,7 ± 23,46	0,12
FC (Média)	119,6 ± 18,3	107,8 ± 16,71	0,02*
FC (Final)	129 ± 24,4	120,2 ± 26,44	0,22
FC (Recup 1º min)	100,4 ± 24,3	90,72 ± 15,94	0,10
FC (Recup 2º min)	89,92 ± 17,6	84,8 ± 13,41	0,25
Δ FCrecup <sub>1</sub>	28,7 ± 16,8	29,52 ± 22,67	0,88
Δ FCrecup <sub>2</sub>	39,12 ± 15,5	35,44 ± 24,88	0,53

Tabela 3. Comparação do Teste da caminhada dos seis minutos (TC6m) com o Incremental Shuttle Walk Test (ISWT) no grupo masculino.

Valores expressos em média ± desvio-padrão. FC: Frequência cardíaca; SpO<sub>2</sub>: Saturação periférica de oxigênio; FC: frequência cardíaca; Δ FCrecup<sub>1</sub>: delta da frequência cardíaca no primeiro minuto pós teste menos a frequência cardíaca final; Δ FCrecup<sub>2</sub>: delta da frequência cardíaca no segundo minuto pós teste menos a frequência cardíaca final; \* p < 0,05 (Teste t de student não pareado).

Durante o teste e o delta de recuperação da frequência cardíaca no primeiro ( $\Delta$  FCrecup<sub>1</sub>) e segundo minuto ( $\Delta$  FCrecup<sub>2</sub>) pós teste, com  $p < 0,05$  [Tabela 3]. Não houve qualquer complicação percebida durante a realização dos testes de campo, referente a sintomas que pudessem interromper a realização dos mesmos e interferir nos resultados (mal-estar, síncope, dor precordial ou outros referidos espontaneamente pelos indivíduos).

Ao analisarmos a distância caminhada com a relação cintura-quadril, observamos que existe correlação negativa entre a distância caminhada em porcentagem do predito apenas no GF ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,01$ ; correlação moderada) [Figura 1.B]. Podemos observar que os indivíduos com menor relação C/Q, apresentam uma tendência a caminharem mais metros, quando comparados com os que apresentaram uma relação C/Q maior no GF, o que não apresentou uma mesma tendência para o GM.

Porém, quando analisamos as mesmas distâncias caminhadas com o IMC dos sujeitos, observamos que tanto o GF como o GM apresentaram correlação negativa entre o IMC e distância caminhada em metros no TC6m ( $r = -0,5$  e  $p = 0,01$ ;  $r = -0,4$  e  $p = 0,03$ ; Figura 2.A e 2.E, respectivamente). E adicionalmente, o GF ainda apresentou correlação negativa entre o IMC e a porcentagem do predito para os metros caminhados no TC6m ( $r = -0,4$ ;  $p = 0,03$ ) [Figura 2.B]. Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada para o *Shuttle*.

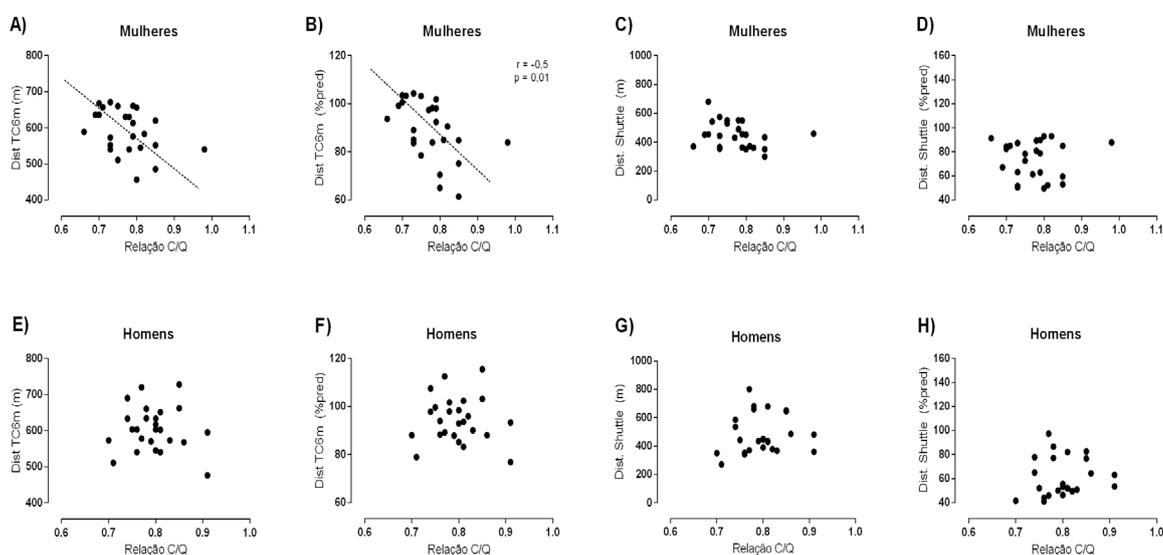


Figura 1. Correlação entre a distância caminhada em metros e porcentagem do predito para ambos os testes, nos grupos feminino e grupo masculino, e relação cintura-quadril (C/Q).

Dist. TC6m (m): Distância caminhada no teste da caminhada dos seis minutos em metros; Dist. TC6m (%pred): porcentagem do predito da distância caminhada no TC6m; Dist. Shuttle (m): Distância caminhada no teste da caminhada com carga progressiva em metros; Dist. Shuttle (%pred): porcentagem do predito da distância caminhada no Shuttle;  $r$ : correlação de Pearson;  $p < 0,05$ .

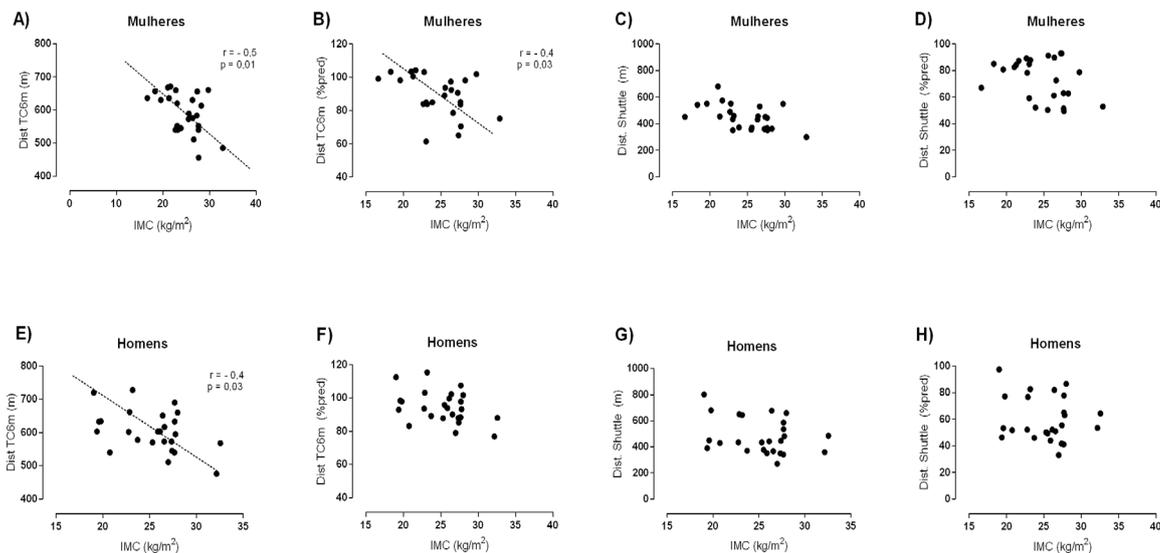


Figura 2. Correlação entre a distância caminhada em metros e porcentagem do predito para ambos os testes, nos grupos feminino e grupo masculino, e índice de massa corporal (IMC).

Dist. TC6m (m): Distância caminhada no teste da caminhada dos seis minutos em metros; Dist. TC6m (%pred): porcentagem do predito da distância caminhada

no TC6m; Dist. Shuttle (m): Distância caminhada no teste da caminhada com carga progressiva em metros; Dist. Shuttle (%pred): porcentagem do predito da distância caminhada no Shuttle; r: correlação de Pearson;  $p < 0,05$ .

Em relação aos resultados obtidos após aplicação do IPAQ, observamos que no GF 68% dos indivíduos foram classificados como ativos e 32% sedentários, já no GM 52% foram classificados com ativos e 48% sedentários [Figura 3]. Desta forma o GF possui um maior número de indivíduos ativos, comparado com o GM, porém esses dados não prejudicaram nosso estudo, tendo em vista que o GF apesar de ser mais ativo que o masculino, não obteve maior desempenho em relação à distância percorrida nos dois testes realizados.

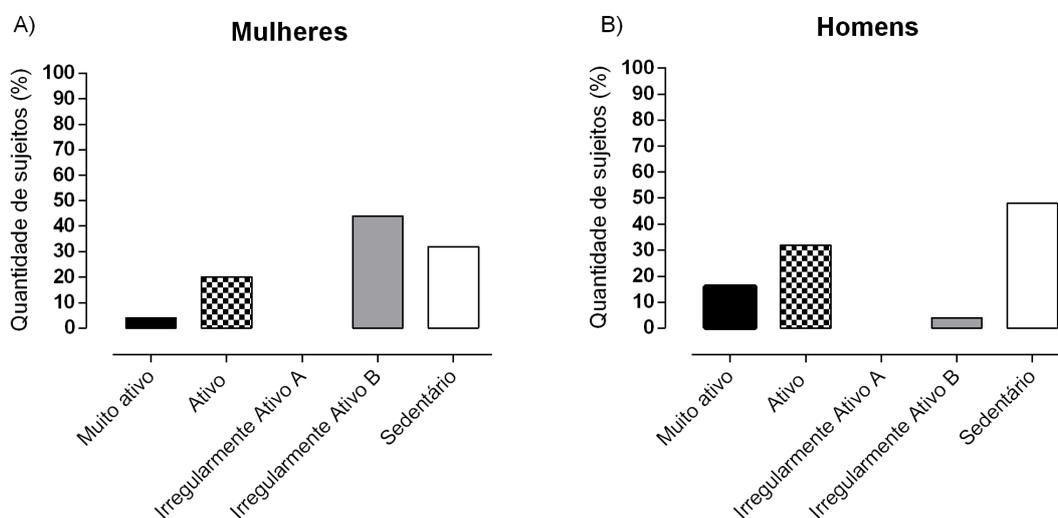


Figura 3. Classificação dos sujeitos quanto ao nível de atividade física pelo questionário IPAQ.

## 4 | DISCUSSÃO

O TC6m é uma forma de avaliação clínica realizada por meio de um esforço submáximo, visto que os indivíduos escolhem a sua própria intensidade de exercício e não alcançam a capacidade máxima, refletindo melhor a CF para as AVD's (Morales-Blanhir *et al.*, 2011). Já o *Shuttle* foi desenvolvido para avaliar a CF de exercício em pacientes com DPOC e é considerado um teste incremental máximo, pois o paciente é impelido a andar de acordo com velocidades crescentes padronizadas, em níveis, com duração de um minuto em cada nível, impostas por um sinal sonoro ao redor de um circuito de dez metros em cada sentido (Pires *et al.*, 2007).

Quando comparado o GF com o GM, as diferenças antropométricas observadas já eram esperadas, no que diz respeito à altura e peso corporal. Os indivíduos de ambos os grupos também foram classificados como eutróficos quando descrito o IMC, já esperada por se tratar de uma população saudável.

Corroborando com estudo de Rosa *et al.* (2008) que avaliaram 24 sujeitos (17 homens) com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), no qual os indivíduos tanto do grupo masculino como feminino, caminharam uma maior distância no TC6m em comparação ao *Shuttle*, podendo-se afirmar que o TC6m apesar de ser classificado como teste submáximo possui uma boa aplicabilidade e fácil aprendizado quando comparado ao *Shuttle*.

O *Shuttle* é, classicamente, caracterizado como um teste incremental que assume valores muito próximos ao máximo. No mesmo estudo Rosa *et al.* (2008), citado anteriormente, os autores demonstraram que ao final dos dois testes, os sujeitos atingiram maiores valores no TC6m, em comparação com o *Shuttle*, com relação à FC. Esses achados corroboram com os nossos resultados em relação aos valores da FC obtidos pós teste em ambos os indivíduos.

Fernandes *et al.* (2012) em um estudo no qual avaliaram 28 estudantes (22 mulheres) entre 20 e 30 anos que realizaram o TC6m observaram que os indivíduos de ambos os gêneros, obtiveram um baixo desempenho comparado com a distância predita indicada pelas equações de referência e a distância percorrida. Contrariamente a este estudo que mostra que todos os indivíduos obtiveram bom desempenho na realização do TC6m.

A recuperação da frequência cardíaca após uma atividade aeróbica é mediada pela reativação do componente vagal e decréscimo do sistema simpático (Lima *et al.*, 2013; Almeida e Araújo, 2003). Já está descrito que a taxa de recuperação da FC parece ser um reflexo de uma recuperação mais rápida do drive simpático necessário durante o exercício e sabe-se que um aumento da atividade vagal associado a rápida recuperação da FC tem sido demonstrado com um decréscimo do risco de morte (Rosa *et al.*, 2008; Hull *et al.*, 1995). No presente estudo, todos os indivíduos de uma forma geral apresentaram uma boa recuperação da FC em ambos os testes, sugerindo um ótimo equilíbrio simpato-vagal.

Gomes *et al.* (2010) em um estudo com amostra de 149 mulheres entre 30 e 49 anos, onde avaliou aptidão cardiorrespiratória(AC) com a realização do TC6m, relacionando com a relação cintura/quadril(RCQ), mostraram que os indivíduos com menor relação C/Q desenvolveram não só uma maior AC, como também uma distância maior no TC6m, quando comparado com os que apresentaram uma relação C/Q maior. Em outro estudo Cavaglieri *et al.* (2006) avaliaram diferentes programas de exercício, com mulheres com excesso de peso, onde os resultados também foram similares. Esses resultados corroboram com os do presente estudo, no qual foi observado que os indivíduos com menor relação C/Q, apresentam uma tendência a caminharem mais metros, quando comparados com os que apresentaram uma relação C/Q maior, tanto para o TC6m(m), como para o TC6m(%pred), especialmente no GF, que apresentou uma correlação negativa estatisticamente significativa ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,01$ ) quando comparado TC6m (%pred) com a relação C/Q(Figura 1.B).

Analisando os 50 indivíduos do nosso estudo foi possível observar que aqueles que apresentaram um maior índice de massa corporal (IMC) apresentaram uma tendência a caminharem menos metros. Pires *et al.* (2007) em um estudo com 122 brasileiros saudáveis, ao avaliar o desempenho de indivíduos com diferentes IMC durante o TC6m, mostrou que os indivíduos que apresentaram um IMC maior caminharam um número menor de metros, dos que apresentaram um IMC menor. Esses achados corroboram com os resultados apresentados neste trabalho, tanto para o GM quanto para o feminino. Pode-se sugerir que um maior IMC interfira na biomecânica dos membros inferiores do indivíduo, diminuindo o tamanho da passada ou seu rendimento em relação a prática da caminhada.

Ao analisar a classificação do IPAQ observou-se que o GF possui um maior número de indivíduos ativos, comparado com o GM, porém esses dados não prejudicaram nosso estudo, tendo em vista que o grupo feminino apesar de ser mais ativo que o masculino, não obteve maior desempenho em relação à distância percorrida nos dois testes realizados. Corroborando com estudo de Fernandes *et al.* (2012) onde foi aplicado o questionário IPAQ em 28 indivíduos, e foi observado que 4 indivíduos eram sedentários, e 24 ativos, mostrou que a diferença do nível de atividade física não influencia no desempenho. Tendo em vista que o grupo ativo não obteve maiores resultados na realização dos testes.

A principal limitação do presente estudo foi a amostra, e o pouco tempo para a realização da pesquisa, que não nos permitiu recrutar um número maior de indivíduos para o estudo e também a escassez de estudos publicados na literatura abordando o *Shuttle* e suas repercussões fisiológicas. Tivemos o cuidado de incluir apenas indivíduos saudáveis que não estavam envolvidos em esportes ou atividades físicas vigorosas, bem como a divisão em dois grupos, masculino e feminino, em igual quantitativo. Desta forma tornando os nossos resultados mais fidedignos. Sugerimos que novos estudos abordando o TC6m e ISWT sejam realizados, com intuito de investigar suas repercussões hemodinâmicas e obter resultados mais fidedignos quanto à capacidade

funcional de indivíduos saudáveis, tendo em vista a importância da avaliação precoce dessa população, como ação preventiva quanto a complicações futuras, já que o sedentarismo é importante fator de risco para doenças crônicas, em especial as doenças cardiovasculares.

## 5 | CONCLUSÃO

Podemos concluir que tanto o *Shuttle* com o TC6m podem ser utilizados na avaliação da capacidade funcional de exercício em indivíduos saudáveis, sendo eles testes incrementais de campo, de fácil aplicação e baixo custo. A comparação do *Shuttle* com o TC6m mostra que os dois testes assumem valores semelhantes ao seu final, com valores de distância caminhada, FC e sensação de dispneia superior no TC6m. A implicação clínica das diferenças entre a utilização destes dois testes, como proposta de carga de treinamento para programas de reabilitação mais simples, deve ser avaliada em estudos futuros, bem como a avaliação mais detalhada das diferenças metabólicas no desempenho entre os dois.

## REFERÊNCIAS

- Almeida MB; Araújo CGS. **Effects of aerobic training on heart rate.** Rev Bras Ciênc Esporte. 2003 Mar-Abr;9(2):113-20
- Aquino ES et al. **Análise comparativa do teste de caminhada de seis minutos em crianças e adolescentes saudáveis.** Rev Bras Fisioter. 2010;14(1):75-80.
- Britto RR; Sousa LAP. **Teste de caminhada de seis minutos: uma normatização brasileira.** Fisioter Mov. 2006;19(4):49-54.
- Cavaglieri CR, Ferreira CKO, Foschini D, Donatto FF, Prestes J, Manzatto R et al. **Efeitos de diferentes programas de exercício nos quadros clínico e funcional de mulheres com excesso de peso.** Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano. 2006;8(3):58-65.
- Cohen, J. (1988). **Statistical power analysis for the behavioral sciences.** 2<sup>a</sup>. Ed. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum.
- Dourado VZ. **Equações de referência para o teste de caminhada de seis minutos em indivíduos saudáveis.** Arq Bras Cardiol. 2011;96:e128-38.
- Fernandes PM et al. **Teste de Caminhada de Seis Minutos: avaliação da capacidade funcional de indivíduos sedentários.** Rev Bras Cardiol. 2012;25(3):185-191.
- Gomes IC et al. **Aptidão cardiorrespiratória está associada à adiposidade em mulheres adultas.** Motriz: Revista de Educação Física (Online). 2010;16(2):320-325.
- Hull SS Jr et al. **Do increases in markers of vagal activity imply protection from sudden death? The case of scopolamine.** Circulation. 1995 May 15;91(10):2516-9.

- Iwama AM et al. **The six-minute walk test and body weight-walk distance product in healthy Brazilian subjects.** Braz J Med Biol Res. 2009; 42 (11): 1080-5.
- Jürgensen SP, Antunes LC, Tanni SE, Banov MC, Lucheta PA, Bucceroni AF, et al. **The incremental shuttle walk test in older Brazilian adults.** Respiration. 2011;81(3):223-8.
- Lima AGD et al. **Valores de referência para o teste de caminhada com carga progressiva em indivíduos saudáveis: da distância percorrida as respostas fisiológicas.** J Bras Pneumol. 2013;39(2):190-197.
- Morales-Blanhir JE et al. **Teste de caminhada de seis minutos: uma ferramenta valiosa na avaliação do comprometimento pulmonar.** J Bras Pneumol. 2011;37(1):110-117.
- Nosedá A et al. **Dispneia avaliada pela escala analógica visual em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica durante exercício de intensidade progressiva e alta.** Thorax. 1992;5(47):363-368.
- Organização Mundial de Saúde - OMS. **Dados de referência índice de massa corporal para idade.** 2007 [cited 2012 Apr 16].
- Pardini R, Matsudo SMM, Matsudo VKR, Araujo T, Andrade E, Braggion GF et al. **Validation of international physical activity questionnaire (IPAQ): pilot study in Brazilian young adults.** Medicine e Science in Sports and Exercise. 1997;29(6):5-9.
- Pires SR et al. **Teste de caminhada de seis minutos em diferentes faixas etárias e índices de massa corporal.** Rev Bras Fisioter. 2007;11(2):147-151.
- Roberta MM et al. **Comparação das variáveis hemodinâmicas durante o teste de caminhada de seis minutos e o teste de escada em adultos saudáveis,** Ter Man. 2012; 10(49):311-316.
- Rondelli RR et al. **Uma atualização e proposta de padronização do teste de caminhada de seis minutos.** Fisioter Mov. 2009;22(2):249-259.
- Rosa FW et al. **Evaluating physical capacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: comparing the shuttle walk test with the encouraged 6-minute walk test.** J Bras Pneumol. 2008;32:106-13.
- Singh SJ, Puhan MA, Andrianopoulos V, Hernandez NA, Mitchell KE, Hill CJ et al. **An official systematic review of the European Respiratory Society/American Thoracic Society: measurement properties of field walking tests in chronic respiratory disease.** Eur Respir J. 2014 Dec;44(6):1447-78.
- Soares MR; Pereira CA. **Teste de caminhada de seis minutos: valores de referência para adultos saudáveis no Brasil.** J Bras Pneumol. 2011;37(5):576-83.

## EFEITOS DA INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA NO DESEMPENHO MOTOR DE ESCOLARES COM DESORDEM COORDENATIVA DESENVOLVIMENTAL

**Kátia Gama de Barros Machado**

Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR  
Maringá – Paraná

**Giovana Flávia Manzotti**

Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR  
Maringá – Paraná

**Siméia Palácio Gaspar**

Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR  
Maringá – Paraná

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da intervenção fisioterapêutica no desenvolvimento motor de escolares com Desordem Coordenativa Desenvolvidamental. Foram selecionadas 30 crianças de escolas públicas e privadas de Maringá identificadas com a desordem, com faixa etária de 7 a 10 anos, de ambos os gêneros, sendo excluídos do estudo indivíduos que apresentaram além do DCD, outros distúrbios de natureza neuropsiquiátrica e os deficientes visuais e mentais. Para a identificação e seleção dessas crianças foi realizada uma triagem com pais e professores, utilizando o questionário checklist “Movement Assessment Battery for Children-2”, composto de 43 questões. Após a aplicação do Checklist, as crianças que apresentaram risco ou suspeita do transtorno, passaram por uma avaliação do desempenho motor utilizando o instrumento

“Movement Assessment Battery for Children” (MABC-2), na sequência, iniciaram o tratamento fisioterapêutico, o qual constou de 10 sessões, realizadas 2 vezes por semana, com duração de 50 minutos, utilizando a psicomotricidade. Após os atendimentos, foi aplicado o mesmo instrumento de avaliação para comparação dos resultados pré e pós intervenção. Concluiu-se, portanto que a fisioterapia foi efetiva no tratamento das crianças identificadas com Desordem Coordenativa Desenvolvidamental.

**PALAVRAS-CHAVE:** fisioterapia; motricidade; tratamento.

**ABSTRACT:** This study aimed to verify the effect of physical therapy intervention in schools engine development with Developmental Disorder coordination. We selected 30 children from public and private schools in Maringa identified with the disorder, aged 7-10 years, of both genders, being excluded from the study subjects who had beyond the DCD, other neuropsychiatric nature of disorders and the disabled visual and mental. For the identification and selection of these kids a screening was held with parents and teachers, using the checklist questionnaire “Movement Assessment Battery for Children-2” composed of 43 questions. After applying the Checklist, children who had risk or suspected disorder, underwent an assessment of motor performance using the tool “Movement

Assessment Battery for Children” (MABC-2) and, as a result, began physical therapy, which It consisted of 10 sessions, held 2 times per week, lasting 50 minutes, using psychomotor. After the visits, the same evaluation tool for comparing the pre and post intervention was applied. It follows therefore that physical therapy was effective in the treatment of children identified with Developmental Disorder coordination.

**KEYWORDS:** physiotherapy; traction; treatment.

## 1 | INTRODUÇÃO

A coordenação, equilíbrio e esquema corporal aprimoram-se através das experiências motoras e o desenvolvimento desses componentes da motricidade é fundamental durante a infância para a aquisição da independência funcional e para o desenvolvimento das diversas habilidades motoras básicas, essenciais durante toda a vida, como andar, correr, saltar, galopar, arremessar e rebater (PAPEST E MARQUES, 2010).

A Desordem Coordenativa Desenvolvemental é derivada do termo em inglês “Developmental Coordination Disorder (DCD)” (PELLEGRINI et al., 2008) e constitui uma alteração com prevalência estimada em 6 % sendo a maioria meninos em idade escolar (APA, 2010).

Segundo a American Psychiatric Association (APA, 2003) tal desordem ocorre por um prejuízo no desenvolvimento da coordenação motora, sendo diagnosticada somente quando esse prejuízo interfere nas atividades escolares e cotidianas. Sua gravidade varia de moderada a severa, manifestando-se de forma isolada ou associada a outras dificuldades, tais como: déficits de linguagem, leitura e escrita.

As causas da DCD ainda não foram totalmente esclarecidas e diferentes teorias têm sido propostas, desde o desenvolvimento anormal do cérebro, distúrbio no mecanismo sensorio motor (Visser, 2003), fatores genéticos, intrauterinos e insuficiência de estímulos ambientais, que podem comprometer o desenvolvimento motor resultando em habilidades com baixo rendimento (Maldonado-Durán e Glinka, 2005).

Devido aos prejuízos acarretados pela desordem, mencionados anteriormente, salienta-se a necessidade do diagnóstico e tratamento precoce, visando proporcionar a esta população uma melhor qualidade de vida.

Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo verificar os efeitos que a intervenção fisioterapêutica pode ter no desenvolvimento motor de escolares com desordem coordenativa desenvolvimental (DCD).

## 2 | METODOLOGIA

O presente estudo caracterizado como quase experimental foi realizado na Clínica Escola de Fisioterapia do Centro Universitário de Maringá após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CESUMAR (CEP). Foram selecionadas 30 crianças identificadas com DCD, com faixa etária variando de 7 a 10 anos, sendo 15 do gênero masculino e 15 do gênero feminino. Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentaram além do DCD, outros distúrbios de natureza neurológica ou psiquiátrica, além dos deficientes visuais e mentais. Para a identificação e seleção dessas crianças, foi respondido pelos pais e professores o questionário checklist “Movement Assessment Battery for Children-2, composto de 43 questões, envolvendo situações cotidianas da performance motora da criança, como abotoar a roupa, recortar com tesouras, pegar uma bola, entre outras para identificar desordens da coordenação motora. O desempenho da criança foi pontuado pelo cuidador da criança analisando o quão eficiente a tarefa foi executada, sendo as categorias de resposta as opções: “nem um pouco”(0), “um pouco”(1) “bom” (2) e “muito bom”(3). Esta pontuação foi somada para fornecer um escore total, que foi mapeado em um sistema de “Semáforo” onde os scores indicaram se a criança se encontrava nos parâmetros normais da idade esperada (zona verde), se possuía atraso ou alguns pequenos problemas de movimento que necessitam ser monitorados (zona amarela), ou ainda um sério problema de movimento (zona vermelha). Após a aplicação do Checklist, as crianças que se enquadraram na zona amarela e vermelha do questionário, passaram por uma avaliação do desempenho motor utilizando a versão 2 do “Movement Assessment Battery for Children” (MABC-2), que avalia habilidades como: destreza manual, atividades de lançar e receber e equilíbrio, com escore padrão variando de 0 a 19 pontos, sendo que quanto maior a pontuação, melhor o resultado. Os escores relacionados a cada uma das habilidades motoras avaliadas são somados para a obtenção do escore total do teste, que por sua vez é convertido no percentil correspondente. Escores abaixo do 5º percentil são indicativos de significativa dificuldade motora, entre o 6º e 15º percentil representam um possível risco no desenvolvimento e acima do 16º percentil indicam que a criança é normal em termos de desempenho motor.

As tarefas de destreza manual envolvem atividades de velocidade e precisão, as de lançar e receber compreende tarefas de exatidão no lançamento e recebimento de objetos, enquanto o equilíbrio estático e dinâmico compreende tarefas de precisão e concentração.

Ao término das avaliações, as crianças que apresentaram escores abaixo do 5º percentil e com percentis variando de 6º e 15º, foi feito contato com os pais e ou responsáveis e solicitada à autorização para participação no estudo, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e participaram de um programa de tratamento realizado através da psicomotricidade que constou de 10 sessões, realizadas 2 vezes por semana, com duração de 50 minutos, sendo nestas

sessões enfocadas as necessidades individuais psicomotoras apresentadas por cada paciente. Posteriormente, foi reaplicada a mesma escala de avaliação inicial para efeitos de comparação dos resultados pré e pós-intervenção fisioterapêutica e, na sequência, os dados foram analisados estatisticamente através dos testes T-student e Qui-quadrado, sendo em ambos os testes adotados como nível de significância 5%.

### 3 | RESULTADOS

HABILIDADES	AMOSTRA	MÍNIMO	MÁXIMO	PERCENTIS			P-VALOR
				1º Quartil	Mediana	3º Quartil	
Destreza Manual pré	30	0,1	84,0	1,0	2,0	10,8	<b>*0,001</b>
Destreza Manual pós	30	1,0	84,0	5,0	25,0	50,0	
Lançar e Recber pré	30	1,0	91,0	5,0	20,5	37,0	<b>*0,001</b>
Lançar e REcber pós	30	1,0	84,0	22,8	56,5	75,0	
Equilíbrio pré	30	0,1	37,0	2,0	5,0	9,0	<b>*&lt;0.001</b>
Equilíbrio pós	30	2,0	75,0	16,0	37,0	50,0	

Das 30 crianças que passaram pela intervenção, 16 tinham idade entre 7-8 anos (53,4%), enquanto as demais eram de 9-10 anos (46,7%), sendo que 50% das crianças investigadas eram do gênero feminino e 50% do masculino. Quanto as variáveis motoras, ao comparar o desempenho das crianças pré e pós-tratamento, verificou-se resultados estatisticamente significantes em todas as habilidades motoras analisadas, conforme indica a tabela 1.

01 – Comparação das habilidades pré e pós tratamento.

*\*Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ , pelo teste Wilcoxon*

Ao comparar o desempenho motor entre os gêneros, considerando o pré e pós-tratamento fisioterapêutico, verificou-se diferença estatisticamente significativa apenas na habilidade de lançar e receber, sendo este resultado mais favorável nas meninas (Tabela 02).

02- Comparação das habilidades quanto ao gênero.

HABILIDADES	GÊNERO	AMOSTRA	MÍNIMO	MÁXIMO	PERCENTIS			P-VALOR
					1º Quartil	Mediana	3º Quartil	
Destreza Manual Pré	Feminino	15	0,5	50,0	1,0	2,0	9,0	0,882
	Masculino	15	0,1	84,0	1,0	1,0	16,0	
Destreza Manual Pós	Feminino	15	1,0	84,0	2,0	16,0	50,0	0,544
	Masculino	15	2,0	63,0	5,0	25,0	50,0	
Lançar e Receber Pré	Feminino	15	5,0	91,0	16,0	25,0	50,0	<b>*0,002</b>

	Masculino	15	1,0	37,0	5,0	5,0	25,0	
Lançar e Receber Pós	Feminino	15	5,0	84,0	16,0	50,0	75,0	0,916
	Masculino	15	1,0	75,0	25,0	63,0	75,0	
Equilíbrio Pré	Feminino	15	0,5	37,0	2,0	5,0	16,0	0,374
	Masculino	15	0,1	37,0	2,0	5,0	5,0	
Equilíbrio Pós	Feminino	15	2,0	75,0	16,0	37,0	50,0	0,785
	Masculino	15	9,0	63,0	16,0	37,0	50,0	

*\*Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ , pelo teste Mann-Whitney*

Quanto ao desempenho motor, pela análise das medianas, a destreza manual, foi a habilidade em que as crianças demonstraram maior déficit, seguida do equilíbrio.

#### 4 | DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a intervenção fisioterapêutica teve efeitos satisfatórios no desempenho motor das crianças com Desordem Coordenativa Desenvolvimental, o que vai ao encontro de uma revisão bibliográfica, realizada por Willriche et al. (2008), os quais concluíram que as intervenções motoras contribuem para o desenvolvimento infantil e evitam fracassos e frustrações em crianças que possuem atraso motor.

Um programa de intervenção motora realizado por Silva et al. (2011) com 6 escolares com indicativo de TDC na faixa etária de 10 anos, utilizando o MABC-2 como critério de avaliação e a abordagem da educação física desenvolvimentista, reforça os resultados do presente estudo, pois revelou que a intervenção motora foi eficaz para a melhora do desempenho motor das crianças com indicativo de TDC. No entanto, vale considerar uma limitação no estudo, pois a amostra investigada por esses autores foi bastante reduzida, com apenas 6 indivíduos.

Outra pesquisa que reforça os resultados positivos da intervenção motora e corrobora com os achados evidenciados no estudo atual, foi realizada por Braga et al. (2009), utilizando a bateria de testes TGMD-2, em 60 escolares de ambos os gêneros, com faixa etária de 6 e 7 anos, através de um programa de intervenção de 24 sessões.

No referente à habilidade motora em que as crianças obtiveram pior desempenho, verificou-se pior performance na execução de tarefas relacionadas à destreza manual, o que está em conformidade com os resultados obtidos por Pellegrini et al. (2008) o qual em seu estudo obteve também resultados menos favoráveis nas habilidades de destreza manual.

Por outro lado Silva (2009), ao avaliar 406 escolares de ambos os sexos, utilizando também o mesmo método de avaliação, em uma escola municipal de São José contradiz os nossos resultados, uma vez que estes revelaram que a destreza manual foi a habilidade em que as crianças apresentaram melhor desempenho.

No entanto, variações de resultados podem ocorrer, visto que não existe um consenso estabelecido na literatura de qual seja a habilidade que crianças com atrasos motores apresentam maior dificuldade ou um maior domínio, pois existem vários fatores como diferenças étnicas e culturais que interferem nos hábitos de vida dessas crianças, o que ajuda a explicar os resultados distintos nas discussões.

O pior desempenho motor do sexo masculino na amostra investigada, vai ao encontro da literatura, pois relata que a DCD é três ou quatro vezes mais frequente em meninos do que em meninas (Maldonado-Durán e Glinka, 2005) porém não foram encontradas validações que argumentem esse predomínio, existindo apenas estudos que apontam ser mais comum a ocorrência do transtorno em crianças nascidas de baixo peso e prematuras, sendo que os meninos nascidos nestas condições apresentam maiores riscos de danos neurológicos, o que talvez seja uma possível explicação para a maior prevalência desta desordem em crianças do sexo masculino.

Vale ressaltar que o meio ambiente e o estilo de vida afetam de modo significativo o desenvolvimento global do indivíduo. Dessa forma, devido ao fato do aumento da violência, as crianças normalmente ficam mais confinadas dentro de casa, exploram pouco as habilidades motoras grossas em seus momentos de brincadeiras e exploram mais habilidades digitais devido ao estímulo desencadeado por jogos eletrônicos (ASSIS MARTINS & OLIVEIRA, 2008).

Diante disso, considera-se que essas crianças sejam estimuladas por meio de atividades escolares e domiciliares, para que tenham autossuficiência na execução das atividades que lhe forem propostas, proporcionando através dessa estimulação plenitude e o bem-estar dessas crianças ao desempenharem suas tarefas diárias ou escolares.

Os estudos abrangendo a identificação da DCD ainda são escassos no Brasil, algumas publicações nacionais estão surgindo, divulgando este assunto que afeta um percentual relevante do público infantil (PELLEGRINI et al., 2008).

Desse modo ressaltamos a necessidade de novas pesquisas voltadas a esse assunto, para que assim crianças que sofram dessa desordem sejam reconhecidas e estimuladas precocemente, potencializando suas habilidades no desempenho das suas atividades diárias e de âmbito escolar.

Sugere-se que outros estudos sejam realizados, levando em consideração o estilo de vida e as experiências motoras desses indivíduos, para que possa ser investigado se estes aspectos estão interferindo ou até mesmo agravando o desempenho motor dessas crianças.

## 5 | CONCLUSÃO

Através desta pesquisa, constatou-se que o programa de intervenção motora foi

efetivo para a melhora do desempenho motor das crianças com DCD, influenciando positivamente nas habilidades de destreza manual, lançar e receber e equilíbrio.

No entanto, esses resultados não podem ser generalizados em virtude da amostra reduzida e da exiguidade de trabalhos que abordam os efeitos da intervenção psicomotora nos déficits motores apresentados nos indivíduos com DCD. Assim, salienta-se a necessidade de novas pesquisas com maior número de participantes, com intuito de favorecer a elaboração de estratégias de intervenção mais efetivas para a respectiva desordem.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA (American Psychiatric Association \_ APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. DSM-IV-TR. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-V) [versão on line]**. Arlington, 2010. Disponível em: <<http://www.dsm5.org/ProposedRevision/Pages/proposedrevision.aspx?rid=88>>
- BRAGA, R. K. et al. **A Influência de um programa de intervenção motora no desempenho das habilidades locomotoras de crianças com idade entre 6 e 7 Anos**. Revista da Educação Física / UEM. Maringá, v. 20, p. 171-181, jul. 2009.
- HAYWOOD, K.M.; GETCHELL, N. **Desenvolvimento motor ao longo da vida**. 3 ed. Porto Alegre : Artmed, 2004.
- MALDONADO – DURÁN, M.; GLINKA, J. **Motors Skills Disorder**. Mai., 2005. Disponível em <http://www.emedicine.com/ped/topic2640.htm>
- PAPST, J. MARQUES, I. **Avaliação do desenvolvimento motor de crianças com dificuldades de aprendizagem**. Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano P. 36-42, 2010.
- PELLEGRINI, A. M. et al. **Crianças com dificuldades de coordenação motora na periferia de uma cidade do interior de São Paulo**. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Comportamento Motor. UNESP, Rio Claro. 2008.
- SILVA, J. 2009. **Desempenho motor, desempenho acadêmico e senso de auto-eficácia de escolares do ensino fundamental**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- VISSER, J. **Developmental coordination disorder: a review of research on subtypes and comorbidities**. Human Movement Science. v.22, p. 479-493, 2003.
- WILLRICH, A. et. al. **Desenvolvimento motor na infância: influência dos fatores de risco e programas de intervenção**. Revista Neurociência, 2008.

## O MICROAGULHAMENTO ASSOCIADO AO PEELING QUÍMICO NO TRATAMENTO DE ESTRIAS CORPORAIS

### **Isabela Mascarenhas de Oliveira**

UniCesumar- Centro Universitário de Maringá  
Maringá - PR

### **Hevellyn Mayara Fernandes Pereira**

UniCesumar- Centro Universitário de Maringá  
Maringá - PR

### **Renata Cappellazzo**

UniCesumar- Centro Universitário de Maringá  
Maringá - PR

**RESUMO:** O presente estudo tem por objetivo verificar os efeitos do tratamento de estrias a partir da terapia de indução de colágeno com a associação do peeling químico. Foram selecionados seis pacientes, do sexo feminino, raça branca, com idade entre 18 a 30 anos que apresentem diagnóstico de estrias. Foram realizadas duas sessões de microagulhamento associado ao peeling químico. Inicialmente foi realizado o registro fotográfico padronizado, assim como uma escala de satisfação pessoal para determinar o quanto a alteração estética interfere na vida do indivíduo. Iniciou-se a sessão com anestesia tópica por um período de 30 minutos, seguida de assepsia da pele com clorexidine a 2%, tratamento com o microagulhamento por toda a área estriada, limpeza com soro fisiológico e aplicação do ácido conjugado mandélico (Tulípiã), que foi mantido na pele por 08 horas. Os resultados

foram comparados com os obtidos antes do início do tratamento, demonstraram uma melhora na coloração da pele e na quantidade de estrias (50%), muita melhora na espessura das estrias (44%) e no aspecto geral da pele (39%), no item tamanho das estrias o resultado de melhora foi de 33,33%. Pode-se concluir que o microagulhamento associado ao peeling químico foi eficaz para diminuir a quantidade e espessura das estrias e na melhorar da coloração e aspecto geral da pele. Conclui-se que o microagulhamento é um recurso eficiente no tratamento de estrias corporais, no entanto depende de mais estudos com maior quantidade de pacientes para uma resposta mais conclusiva sobre os resultados alcançados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dermatofuncional; Fisioterapia; Pele; Terapêutica de indução de colágeno.

**ABSTRACT:** The present study has the objective to verify the effects of stretch marks treatment from collagen induction therapy with the association of chemical peeling. Six patients were selected, of the female gender, white race, aged between 18 and 30 years who presents diagnosis of stretch marks. Were performed two sessions of microneedling associated with chemical peeling. Initially was accomplished a standerized photographic record, as well as a scale of personal satisfaction to determine

how much the esthetic alteration interferes in the life of the individual. The session started with topical anesthetic for a period of 30 minutes, followed by skin asepsis with chlorhexidine at 2%, treatment with the microneedling throughout the all the stretched mark area, cleaning of the área was made with saline solution and with an application of mandelic conjugate acid (Tulipia), which was maintained on the skin for 8 hours. The results were compared with those obtained before the start of the treatment, demonstrating an improvement on the colouration of the skin and on the quantity of stretch marks (50%), a great improvement on the thickness of the stretch marks (44%) and in the general aspect of the skin (39%), on the item the size of the stretch marks the results of improvement was of 33.33%. Can be concluded that microneedling associated with chemical peeling was effective in the decrease of the amount and the thickness of the stretch marks and in the improvement of the clouration and overall appearance of the skin. Concluides that microneedling is an efficient resource in the treatment of body stretch marks, however it depends on more studies with a bigger quantity of paticients for a more conclusive answer on the results achieved.

**KEYWORDS:** Dermato-functional; Physiotherapy; Skin; Collagen induction therapy.

## 1 | INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e uma estrutura que está em constante contato com o meio externo, ela representa 12% do peso seco corporal. Em três centímetros de diâmetro, a pele apresenta mais de três milhões de células, estando entre elas as glândulas sudoríparas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e receptores sensoriais (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

A divisão da pele é realizada a partir de duas camadas, sendo elas a epiderme que é a camada superficial composta de células intimamente unidas, e a derme, camada mais profunda composta de tecido conjuntivo denso e irregular. A epiderme é constituída por um epitélio estratificado e queratinizado composto por cinco camadas: camada germinativa, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e a camada córnea, que é a mais superficial (RIBEIRO, 2010).

De acordo com Matos (2014), algumas lesões podem ocorrer na camada dérmica, sendo uma delas a estria, lesão oriunda do rompimento das fibras colágenas e de elastina. Quando no estado recente a sua ruptura, as estrias apresentam uma coloração avermelhada por ainda estarem no processo inflamatório, sendo a intervenção estética mais fácil nessa fase pelo fato das fibras estarem tentando se reorganizar. Passado um tempo após a sua ruptura, as estrias adquirem uma coloração branco-nacaradas pela formação de cicatrizes atróficas que representam uma sequela no processo cicatricial, com perda de melanócitos e comprometimento da circulação local.

A terapia de indução de colágeno (TIC) é um tratamento eficaz que vem

sendo utilizado desde 1995 para melhora de cicatrizes e rugas a partir da geração de micropuncturas que atingem a derme e desencadeiam um sangramento com um estímulo inflamatório que resultará na produção de colágeno. Essa ruptura do colágeno subepidérmico irá causar a substituição de novas fibras de colágeno e elastina, melhorando o aspecto da pele (LIMA et al., 2013).

Fabroccini et al. (2009), acreditam que a TIC provoque a remoção do colágeno danificado e induza a produção de mais colágeno logo abaixo da epiderme, sendo esse procedimento realizado sob anestesia tópica, rolando o aparelho sobre a pele para frente e para trás, com a mesma pressão, em várias direções, para que se obtenha uma distribuição uniforme dos furos. A epiderme é perfurada pela trajetória que as agulhas de aproximadamente 1,5 a 2 milímetros realizam na pele, ocasionando a separação das células, enganando o corpo com a simulação de uma lesão para que inicie o processo de inflamação que culminará na cicatrização e na produção do novo colágeno.

A cicatrização pós microagulhamento é composta por três fases: inflamação, formação do tecido de granulação e remodelamento da matriz. Na primeira fase ocorre a vasoconstrição seguida por vasodilatação que será responsável pelo eritema, ocorrendo a ativação dos neutrófilos, fibroblastos, linfócitos e granulócitos com estímulo de mediadores inflamatórios, preparando o local para formação do tecido de granulação. A segunda fase é composta pela reparação dos tecidos lesados e formação de novos capilares e substituição dos neutrófilos por monócitos que estimulam o fator de crescimento dos fibroblastos e induz a produção de colágeno, que inicialmente é do tipo III. Já na última fase, fibroblastos e queratinócitos produzem enzimas que determinam a arquitetura da matriz celular, resultando na cicatrização e maturação do colágeno de tipo III para o tipo I que é mais duradouro (CACHAFEIRO, 2015).

O peeling é um processo químico usado no tratamento para estrias, onde os processos de renovação celular são acelerados, causando mudança na pele por meio de alguns mecanismos que irão realizar a remoção das células danificadas atingindo camadas específicas, realizando a indução dos processos inflamatórios até a necrose celular, estimulando a produção de colágeno (BORELLI, 2007).

Segundo Rotta (2008), o peeling químico consiste na aplicação de agentes que irão provocar a destruição controlada de partes da epiderme ou derme, seguindo uma forma acelerada de esfoliação capaz de provocar uma maior formação de tecido novo.

Sabe-se também, que o peeling pode ser classificado de acordo com a profundidade que irá atingir na pele, podendo ser dividido em superficiais, médios e profundos, sendo capaz de ter efeitos totalmente diversos com os mesmos agentes (BORELLI, 2007).

Segundo Velasco et al. (2004), o peeling superficial é geralmente epidérmico e não apresenta complicações ao paciente, pode ser utilizado em todos os tipos de pele e em qualquer área do corpo. O peeling médio tem ação na derme papilar e o peeling profundo tem ação na derme reticular. É permitido ao fisioterapeuta realizar apenas o

peeling superficial.

Sendo a estria uma alteração na pele decorrente de um processo de estiramento e rompimento da derme reticular, será que a terapia de indução de colágeno (TIC) associada ao peeling químico é realmente capaz de melhorar o aspecto macroscópico da estria?Parte superior do formulário

Parte inferior do formulário

Parte superior do formulário

Parte inferior do formulário

O presente estudo tem por objetivo verificar os efeitos do tratamento de estrias a partir da terapia de indução de colágeno com a associação do peeling químico.

## 2 | DESENVOLVIMENTO

O presente estudo foi conduzido de Agosto de 2016 a Setembro de 2017 no Centro Universitário Cesumar (UNICESUMAR), na clínica escola de fisioterapia dermatofuncional desta instituição, após ter sido encaminhado para a plataforma Brasil e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos.

Foram selecionados seis pacientes, do sexo feminino, raça branca, com idade entre 18 a 30 anos que apresentaram diagnóstico de estrias. As estrias tratadas estavam tanto em seu estágio inicial (rosadas) quanto mais desenvolvidas (brancas ou nacaradas). Foram realizadas duas sessões de microagulhamento associado ao peeling químico. Os critérios de exclusão estão listados na tabela 01.

Tabela I – Critérios de exclusão
- Formas raras e severas de cicatrizes queloidianas
- Diabetes
- Doença neuromuscular
- Distúrbio hemorrágico
- Doença vascular do colágeno
- Corticoterapia aguda ou crônica
- Terapêutica aguda ou crônica com anticoagulante
- Presença de cânceres de pele
- Verrugas
- Ceratose solar
- Infecção cutânea
- Gravidez

Tabela 01: Critérios de exclusão para a realização do estudo.

Depois de realizada a seleção das pacientes, as mesmas foram esclarecidas sobre todos os detalhes do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As pacientes foram inicialmente avaliadas através do registro fotográfico padronizado, respeitando a mesma distância e luminosidade. As fotos foram sempre realizadas no mesmo local, com cor de fundo azul, utilizando a mesma câmera digital e um avaliador independente, que não participou do tratamento e análise dos resultados.

Uma escala de satisfação pessoal foi aplicada para determinar o quanto a alteração estética interfere na vida do indivíduo. A escala é composta por uma linha reta, numerada de 0 a 10, onde o zero representa nenhuma satisfação e o número 10 representa o máximo de satisfação.

Durante a primeira sessão, cada paciente foi preparada de forma semelhante a um procedimento cirúrgico: a pele do local a ser tratado foi lavada com um sabonete pré-peeling, desinfetada com clorexidina a 2%, em seguida o anestésico dermomax foi aplicado uniformemente sobre a pele, deixando agir por 30 minutos. Cada paciente foi tratada com um cilindro rolante, equipado com 560 agulhas em oito fileiras. As agulhas usadas possuem 1,5 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro. O rolamento foi realizado com movimentos em quatro direções: verticalmente, horizontalmente, diagonalmente para a direita e para a esquerda, garantindo um padrão de perfurações uniforme. Durante o procedimento, ocorreu um leve sangramento, que foi removido da superfície da pele com solução salina estéril.

Após o término do microagulhamento e limpeza da pele, foi aplicado o peeling químico conjugado mandélico (Tulípiã). As pacientes foram orientadas a permanecerem com o composto ácido no corpo durante 08 horas, sem exposição à luz solar.

A segunda sessão do tratamento foi realizada quatro semanas depois da primeira. Antes da segunda intervenção, novas fotografias digitais de cada paciente foram obtidas, mantendo-se idênticas as configurações da câmera, iluminação e posicionamento dos pacientes. Essas fotografias serão arquivadas e comparadas com as obtidas antes do primeiro tratamento.

A última avaliação foi conduzida quatro semanas após o segundo tratamento. Novas fotografias foram tiradas e os pacientes serão questionados através da escala de satisfação pessoal. Os resultados serão comparados com os obtidos antes do início do tratamento.

As fotografias foram submetidas à análise cega, que conta com a ajuda de três professores do curso de fisioterapia do Centro Universitário Cesumar (UNICESUMAR), independente de sua especialidade. Na avaliação, utilizou-se a Escala de Melhora Estética Global – *Global Aesthetic Improvement Scale* (GAIS), conforme a tabela 02.

Tabela II – Escala de Melhora Estética Global (GAIS)	
Classificação	Descrição
Muito melhor	Resultado cosmético ótimo para TIC nesse paciente
Bem melhor	Melhora acentuada na aparência desde a condição inicial, mas não totalmente ótima para esse paciente
Melhor	Melhora óbvia na aparência desde a condição inicial, mas o retratamento é indicado
Sem alteração	Aparência essencialmente igual à condição inicial
Pior	Aparência pior que a condição inicial

Tabela 02: Escala de melhora estética global (GAIS)

Após a avaliação das imagens no estágio final do tratamento das pacientes, os resultados foram analisados estatisticamente e tabulados para verificar sua significância estatística. Os resultados foram expressos em forma de gráficos e tabelas.

### 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

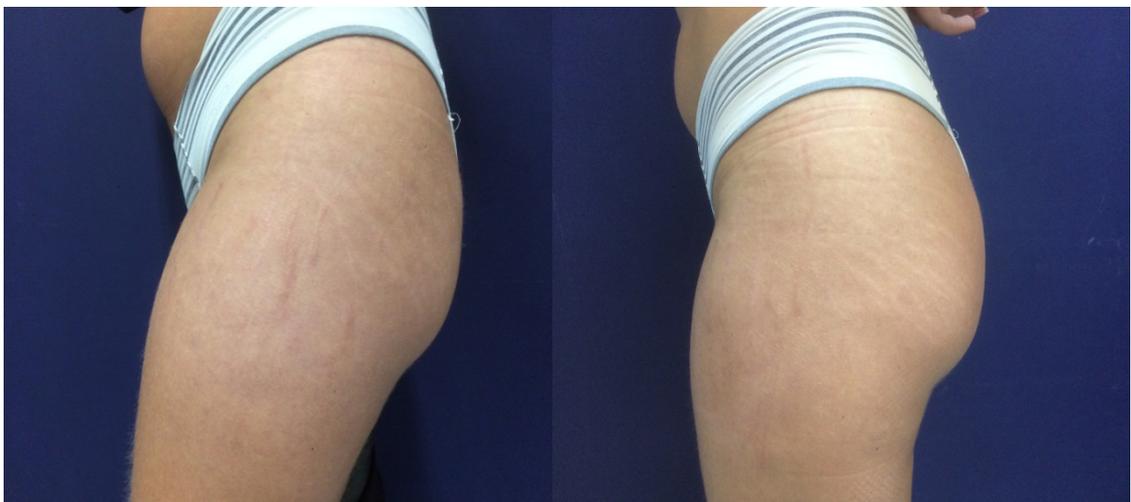
De acordo com a presente pesquisa, pode-se notar o resultado após duas sessões de microagulhamento em seis pacientes com estrias nacaradas ou violáceas, tendo resultados no tamanho, espessura, quantidade e coloração das estrias, assim como na coloração e aspecto geral da pele.

As fotos de cada paciente foram analisadas por três professoras e os resultados foram expressos em porcentagem de acordo com a análise realizada pelas mesmas. Durante o tratamento, as pacientes não apresentaram complicações como hiperpigmentação e infecção.

Houve uma melhora na coloração da pele e na quantidade de estrias de 50%, em contrapartida tiveram como resultado de muita melhora na espessura das estrias de 44% e no aspecto geral da pele de 39%. Já no tamanho das estrias o resultado ficou empatado em 33,33% na melhora, muita melhora e pouca melhora. Como resultado geral obteve-se muita melhora em 33%, melhora de 40% sobressaindo sobre muita melhora e pouca melhora de 27%, demonstrando que o trabalho obteve resultados significativos na melhora das estrias, assim como demonstrado na tabela 1.



Paciente 1- Apresentou muita melhora nos quesitos espessura das estrias, coloração da pele e aspecto geral da pele (67%) pouca melhora no tamanho das estrias (67%).



Paciente 2- Apresentou melhora na quantidade de estrias, tamanho das estrias, coloração da pele e aspecto geral da pele (100%), na espessura das estrias houve melhora (67%).

A técnica de indução de colágeno utilizando o microagulhamento, de acordo com Lima et al., (2013) é eficaz e possui vantagens como permitir o estímulo do colágeno sem remover a epiderme, tempo de cicatrização mais curto e pode ser indicado a todas as cores de pele, assim como as utilizadas nesse estudo, sendo utilizadas pele branca e morena. Classifica que a injúria provocada por uma agulha de 1,5mm é uma injúria moderada e indicada para rejuvenescimento da pele, apresentando assim uma boa resposta terapêutica.

O microagulhamento pode ter o seu efeito intensificado ainda mais pela utilização de ácidos, segundo Borges (2006) o termo peeling em inglês (to peel) significa descamar, produzindo uma renovação celular da epiderme, tendo um procedimento mais penetrante. Corroborando com o presente estudo que utilizou o microagulhamento associado peeling químico conjugado mandélico (Tulípiã), intensificando assim a renovação celular.

De acordo com Lange, Costa e Bueno (2013), a associação do microagulhamento com fatores de crescimento nas estrias atróficas obtiveram um resultado positivo depois de realizadas nove sessões, mostrando-se eficaz também na melhora da pele. Os autores verificaram a técnica de indução de colágeno associada ao óleo rosa de mosqueta nas estrias, uma vez que esse óleo possui propriedades regenerativas e cicatrizantes. Após seis sessões, observaram que a utilização do óleo junto à técnica promoveu melhora considerável no aspecto da pele.

Aust, Knobloch e Vogot (2010), utilizaram vinte e duas mulheres para o tratamento de indução de colágeno utilizando a técnica isolada de indução de colágeno em estrias. Obteve como resultados uma melhora da neovascularização e na aparência geral da pele, considerando a técnica como sendo promissora. Concordando assim com o presente estudo que demonstrou uma melhora geral de 50% na coloração da pele.

Os resultados obtidos com o presente estudo demonstraram uma diminuição na espessura das estrias grossas, mas não seu desaparecimento e um resultado mais satisfatório em estrias finas, melhorando também o aspecto geral da pele. Concordando com os achados, Luz (2014), relata que estrias mais grossas tratadas com a indução de colágeno não somem totalmente, mas reduzem consideravelmente de tamanho, já as estrias mais finas demonstram um resultado mais satisfatório por reduzirem em quantidade e melhorarem o aspecto da pele em geral.

Os resultados encontrados demonstram melhora na área estriada sendo perceptível aos pacientes, que relataram a partir da escala de satisfação de 1 a 10 onde as maiorias das pacientes relataram estarem satisfeitas com o tratamento depois de realizadas duas sessões. Concordando com os achados, Bandeira de Mello (2014), em estudo com 10 sessões de microgalvanopunturado e microagulhamento, relataram que todas as pacientes apresentaram satisfação em relação ao tratamento observando alteração visual do aspecto da pele.

Apesar de o autor (BANDEIRA DE MELLO, 2014) ter utilizado técnicas diferentes como quantidade de sessões maiores e somente o microagulhamento sem a associação de ácido ou associado a outros tipos de componentes, os mesmo demonstraram resultados semelhantes com o presente estudo, onde a maioria obteve melhora do aspecto geral da pele e melhora na espessura das estrias, demonstrando que o microagulhamento é um tratamento eficaz para estrias nacaradas e rosadas.

## Porcentagem geral

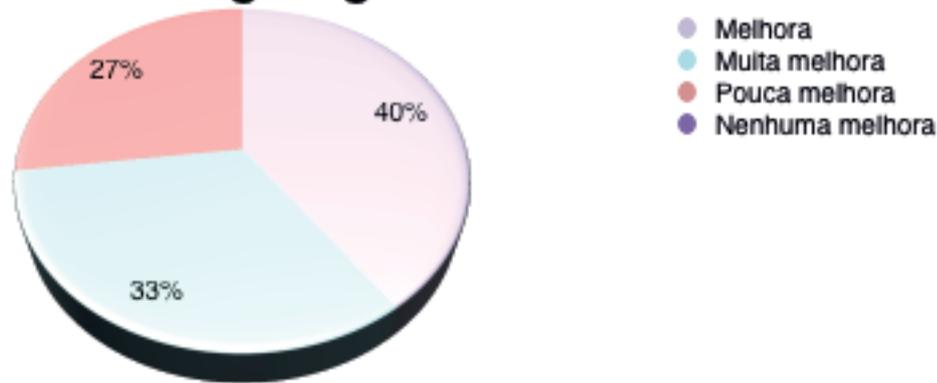


Gráfico I- Porcentagem geral nos aspectos quantidade, tamanho e espessura das estrias, assim como na coloração e aspecto geral da pele após realizadas duas sessões com microagulhamento associado ao peeling químico.

Nº DA QUESTÃO	Melhora	Muita melhora	Pouca melhora	Nenhuma melhora
Questão 1- Quantidade de estrias	50%	22%	28%	0
Questão 2- Tamanho das estrias	33,33%	33,33%	33,33%	0
Questão 3- Espessura das estrias	28%	44%	28%	0
Questão 4- Coloração da pele	50%	28%	22%	0
Questão 5- Aspecto geral da pele	39%	39%	22%	0
<b>RESULTADO GERAL</b>	<b>40%</b>	<b>33%</b>	<b>27%</b>	<b>0</b>

Tabela I- Porcentagem dos resultados em relação a avaliação das estrias considerando todas as pacientes tratadas.

## 4 | CONCLUSÃO

Com o presente estudo de caso pode-se evidenciar que o microagulhamento, considerado uma técnica nova e promissora na área de tratamentos estéticos, apresentou um bom resultado quando utilizado no tratamento de estrias corporais associado ao uso de peeling químico.

Com os resultados evidenciados a partir da finalização do tratamento com as pacientes, pode-se concluir que o microagulhamento associado ao peeling químico foi eficaz para diminuir a quantidade e espessura das estrias assim como também foi eficaz na melhora da coloração e aspecto geral da pele. Já para o tamanho das estrias

o resultado não foi muito eficaz, necessitando de um maior número de sessões para um resultado mais satisfatório.

Nota-se que o microagulhamento é um tratamento eficaz que depende de mais estudos com maior quantidade de pacientes para uma resposta mais conclusiva sobre os resultados alcançados.

## REFERÊNCIAS

AUST, M. C.; KNOBLOCH, K.; VOGT, P. M. Percutaneous collagen induction therapy as a novel therapeutic option for striae distensae. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 126, n. 4, p. 219-220, 2010. Disponível em: <[http://pdfs.journals.lww.com/plasreconsurg/201010000/Percutaneous\\_Collagen\\_Induction\\_Therapy\\_as\\_a\\_Novel.79.pdf](http://pdfs.journals.lww.com/plasreconsurg/201010000/Percutaneous_Collagen_Induction_Therapy_as_a_Novel.79.pdf)>.

BORELLI, Shirlei. **Cosmiatria em Dermatologia: Usos e Aplicações**. 3. ed. : Roca, 2007.

BORGES, Fábio dos Santos. **Dermato-funcional: modalidades Terapêuticas nas disfunções estéticas**. São Paulo: Forth, 2006.

CACHAFEIRO, Thaís Hofmann. **Comparação entre laser erbium fracionado não ablativo 1340 nm e microagulhamento para tratamento de cicatrizes atróficas de acne: ensaio clínico randomizado**. 2015. p. 104. Monografia (Pós-doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

FABROCCINI, Gabriela.; PADOVA, Maria Pia de.; VITA, Velório de.; FARDELLA, Nunzio.; PASTORE, Francesco.; TOSTI, Antonella. **Tratamento de rugas periorbitais por terapia de indução de colágeno**. Itália, 2009, p. 1-6, abril/maio, 2009.

GUIRRO, Elaine; GUIRRO, Rinaldo. **Fisioterapia dermato-funcional**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2002.

LANGE, A. N.; COSTA, R.; BUENO, J. S. Tratamento da pele estriada pelo método de microagulhamento associado ao uso do óleo de rosa mosqueta. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA E SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2013, Curitiba. **Caderno de Resumos**, Curitiba, 2013. p. 76. Disponível em: <[http://www.uniandrade.br/docs/Livro\\_de\\_Resumos\\_11\\_Semana\\_IC\\_2013.pdf](http://www.uniandrade.br/docs/Livro_de_Resumos_11_Semana_IC_2013.pdf)>.

LIMA, Emerson Vasconcelos de Andrade; LIMA, Mariana de Andrade; TAKANO, Daniela. **Microagulhamento: estudo experimental e classificação da injúria provocada**. 2012. 5 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Santa Casa de Misericórdia do Recife, Recife, 2013. Disponível em: <<http://www.skinmedical.com.br/microagulhamento.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2013.

LUZ, Michele Ribeiro de; OLIVEIRA, Silvia Patrícia. **Tratamento com microagulhamento em estrias atróficas: galvanopuntura x dermaroler**. 2014. Disponível em: <<http://tcconline.utp.br/media/tcc/2017/05/TRATAMENTO-COM-MICROAGULHAMENTO-EM-ESTRIAS-ATROFICAS.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2017.

MATOS, Simone Pires de. **Cosmetologia aplicada**. : Saraiva, 2014.

MELLO, S. M. B. de. et al. **A influência do uso de contraceptivo oral no resultado do tratamento fisioterapêutico de estrias**. Revista de trabalhos acadêmicos-universo Recife, v. 1, n. 1, 2014.

RIBEIRO, Claudio de Jesus. **Cosmetologia aplicada a Dermoestética**. : Pharmabooks, 2010.

ROTTA, Osmar. **Dermatologia: Clínica, cirúrgica e geriátrica**. : Manole, 2008.

VELASCO, Maria Valéria Robles.; RIBEIRO, Maria Elizette.; BEDIN, Valcenir.; OKUBO, Fernanda Rumi.; STEINER, Denise. **Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol**. Rio de Janeiro, 2001, p. 1-9, jan./fev., 2004.

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

**Christiane Trevisan Slivinski** - Possui Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2000), Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2007) e Doutorado em Ciências - Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (2012). Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biotecnologia, atuando principalmente nos seguintes temas: inibição enzimática; fermentação em estado sólido; produção, caracterização bioquímica e purificação de proteínas (enzimas); e uso de resíduo agroindustrial para produção de biomoléculas (biosurfactantes). É professora na Universidade Estadual de Ponta Grossa nas disciplinas de Bioquímica e Química Geral desde 2006, lecionando para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, Farmácia, Educação Física, Enfermagem, Odontologia, Química, Zootecnia, Agronomia, Engenharia de Alimentos. Também leciona no Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE desde 2012 para os cursos de Fisioterapia, Odontologia, Farmácia, Nutrição, Enfermagem e Agronomia, nas disciplinas de Bioquímica, Fisiologia, Biomorfologia, Genética, Metodologia Científica, Microbiologia de Alimentos, Nutrição Normal, Trabalho de Conclusão de Curso e Tecnologia de Produtos Agropecuários. Leciona nas Faculdades UNOPAR desde 2015 para o curso de Enfermagem nas disciplinas de Ciências Celulares e Moleculares, Microbiologia e Imunologia.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-85107-74-1

