

# Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde

## 3

Christiane Trevisan Slivinski  
(Organizadora)

 **Atena**  
Editora

Ano 2019

Christiane Trevisan Slivinski  
(Organizadora)

# Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde 3

Atena Editora  
2019

2019 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)

I34 Impactos das tecnologias nas ciências biológicas e da saúde 3  
[recurso eletrônico] / Organizadora Christiane Trevisan Slivinski. –  
Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (Impactos das  
Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde; v. 3)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-037-7

DOI 10.22533/at.ed.377191601

1. Ciências biológicas. 2. Farmacologia. 3. Saúde. 4. Tecnologia.  
I. Slivinsk, 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.

2019

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

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

## APRESENTAÇÃO

A tecnologia está ganhando cada dia mais espaço na vida das pessoas e em tudo que as cerca. Compreende-se por tecnologia todo o conhecimento técnico e científico e sua aplicação utilizando ferramentas, processos e materiais que foram criados e podem ser utilizados a partir deste conhecimento. Quando, para o desenvolvimento da tecnologia estão envolvidos sistemas biológicos, seres vivos ou seus metabólitos, passa-se a trabalhar em uma área fundamental da ciência, a Biotecnologia.

Toda produção de conhecimento em Biotecnologia envolve áreas como Biologia, Química, Engenharia, Bioquímica, Biologia Molecular, Engenharia Bioquímica, Química Industrial, entre outras, impactando diretamente no desenvolvimento das Ciências Biológicas e da Saúde. A aplicação dos resultados obtidos nos estudos em Biotecnologia está permitindo um aumento gradativo nos avanços relacionados a qualidade de vida da população, preservação da saúde e bem estar.

Neste ebook é possível identificar vários destes aspectos, onde a produção científica realizada por pesquisadores das grandes academias possuem a proposta de aplicações que podem contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos que a natureza nos oferece, bem como encontrar novas soluções para problemas relacionados à manutenção da vida em equilíbrio.

No volume 2 são apresentados artigos relacionados a Bioquímica, Tecnologia em Saúde e as Engenharias. Inicialmente é discutida a produção e ação de biocompostos tais como ácido hialurônico, enzimas fúngicas, asparaginase, lipase, biossurfactantes, xilanase e eritritol. Em seguida são apresentados aspectos relacionados a análise do mobiliário hospitalar, uso de oxigenoterapia hospitalar, engenharia clínica, e novos equipamentos utilizados para diagnóstico. Também são apresentados artigos que trabalham com a tecnologia da informação no desenvolvimento de sistemas e equipamentos para o tratamento dos pacientes.

No volume 3 estão apresentados estudos relacionados a Biologia Molecular envolvendo a leptospirose e diabetes melitus. Também foram investigados alguns impactos da tecnologia no estudo da microcefalia, agregação plaquetária, bem como melhorias no atendimento nas clínicas e farmácias da atenção básica em saúde.

Em seguida discute-se a respeito da utilização de extratos vegetais e fúngicos na farmacologia e preservação do meio ambiente. Finalmente são questionados conceitos envolvendo Educação em Saúde, onde são propostos novos materiais didáticos para o ensino de Bioquímica, Biologia, polinização de plantas, prevenção em saúde e educação continuada.

Christiane Trevisan Slivinski

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A SOS BOX PATTERN FOR LEPTOSPIRA SPP.	
Livia de Moraes Bomediano	
Renata Maria Augusto da Costa	
Ana Carolina Quirino Simões	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916011</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>7</b>
ANÁLISE IN SILICO DO GENE LIPID TRANSFER PROTEIN SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO	
Renan Gonçalves da Silva	
Jóice de Oliveira Leite Silva	
Lucas de Faria Nogueira	
Cyro Bueno Neto	
Sonia Marli Zingaretti	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916012</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>16</b>
ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE DELEÇÃO DOS GENES GSTM1 E GSTT1 E <i>DIABETES MELLITUS</i> EM IDOSOS: ESTUDO PILOTO	
Layse Rafaela Moroti – Perugini	
Luana Oliveira de Lima	
Audrey de Souza Marquez	
Regina Célia Poli-Frederico	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916013</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>25</b>
CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA	
Dalila Bernardes Leandro	
Jessyca Kalynne Farias Rodrigues	
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916014</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>41</b>
POLIMORFISMOS NO GENE DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL2)	
Carmem Gabriela Gomes de Figueiredo	
Maria Soraya Pereira Franco Adriano	
Claudence Rodrigues do Nascimento	
Luciane Alves Coutinho	
Marizilda Barbosa da Silva	
Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916015</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>52</b>
SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS POR ALGORITMO GENÉTICO NA CLASSIFICAÇÃO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA	
Lucas de Souza Rodrigues	
Cristina Sady Coelho da Rocha	
Murilo Eugênio Duarte Gomes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.3771916016</b>	

<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>61</b>
MICROCEPHALY BRAIN UNFINISHED Cicera Páz da Silva Italo Marcos Páz de Andrade <b>DOI 10.22533/at.ed.3771916017</b>	
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>67</b>
O SUJEITO DA CLÍNICA E A CLÍNICA RELACIONAL: CONTRIBUIÇÕES PARA A CLÍNICA DE ATENÇÃO BÁSICA DO SUS Rita de Cássia Gabrielli Souza Lima <b>DOI 10.22533/at.ed.3771916018</b>	
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>79</b>
AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA EM SAÚDE: PERFIL DO USUÁRIO BRASILEIRO DO PROGRAMA FARMÁCIA POPULAR COM HIPERTENSÃO ARTERIAL DIAGNOSTICADA Simone Bezerra Franco Ronni Geraldo Gomes de Amorim Marília Miranda Forte Gomes <b>DOI 10.22533/at.ed.3771916019</b>	
<b>CAPÍTULO 10</b> .....	<b>91</b>
ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA COM SORO DO LÁTEX DE <i>HIMATANTHUS SUCUUBA</i> Janeth Silva Pinheiro Marciano Renan Gonçalves da Silva Juliana da Silva Coppede Sonia Marli Zingaretti <b>DOI 10.22533/at.ed.37719160110</b>	
<b>CAPÍTULO 11</b> .....	<b>98</b>
PERFIL DO CONSUMO DE ÁLCOOL POR ESTUDANTES DE FISIOTERAPIA DE UMA UNIVERSIDADE PRIVADA DE SALVADOR Aísa de Santana Lima Ana Paula Amaral de Brito Átina Carneiro Rocha Gleice de Jesus Oliveira <b>DOI 10.22533/at.ed.37719160111</b>	
<b>CAPÍTULO 12</b> .....	<b>111</b>
USO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA REMOÇÃO DE FÁRMACOS Caroline Aparecida Vaz de Araujo Elidiane Andressa Rodrigues Giselle Maria Maciel Priscila Ayumi Sybuia Wagner Mansano Cavalini Cristina Giatti Marques de Souza <b>DOI 10.22533/at.ed.37719160112</b>	

**CAPÍTULO 13 ..... 118**

ANORMALIDADES ERITROCÍTICAS EM *Sciades herzbergii* E FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE RIOS DA ILHA DO MARANHÃO

Natália Jovita Pereira  
Nayara Duarte da Silva  
Sildiane Martins Cantanhêde  
Janderson Bruzaca Gomes  
Ligia Tchaicka  
Débora Martins Silva Santos

**DOI 10.22533/at.ed.37719160113**

**CAPÍTULO 14 ..... 130**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES: CORDYCIPIACEAE) E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Pogostemon cablin* (LAMIALES: LAMIACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus* (GALLIFORMES: PHASIANIDAE)

Lucas Trentin Larentis  
Tainá dos Santos  
Alanda de Oliveira  
Patricia Franchi de Freitas

**DOI 10.22533/at.ed.37719160114**

**CAPÍTULO 15 ..... 135**

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DO ISOLADO JUANT028 NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Igor Shoiti Shiraishi  
Wellington Luiz de Oliveira  
Robert Frans Huibert Dekker  
Aneli de Melo Barbosa-Dekker  
Juliana Feijó de Souza Daniel

**DOI 10.22533/at.ed.37719160115**

**CAPÍTULO 16 ..... 144**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATO VEGETAL DE *Cymbopogon winterianus* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE AVE

Gabrielly Cristina Galvão  
Juliana Marceli Hofma Lopes  
Letícia Mencatto Bueno  
Patricia Franchi de Freitas

**DOI 10.22533/at.ed.37719160116**

**CAPÍTULO 17 ..... 150**

EXTRATO DE *Fusarium graminearum* É UMA ALTERNATIVA NÃO TÓXICA PARA USO COMO CORANTE NATURAL: OBTENÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Brenda Kischkel  
Beatriz Paes Silva  
Fabiana Gomes da Silva Dantas  
Kelly Mari Pires de Oliveira  
Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  
Melyssa Negri

**DOI 10.22533/at.ed.37719160117**

**CAPÍTULO 18 ..... 166**

O USO DE HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO NO BRASIL E NO MUNDO E SEUS IMPACTOS AO MEIO AMBIENTE E SAÚDE HUMANA

Yuri Dornelles Zebral

Adalto Bianchini

**DOI 10.22533/at.ed.37719160118**

**CAPÍTULO 19 ..... 178**

AVALIAÇÃO DE LINGUIÇA TOSCANA ADICIONADA DE INULINA COMO SUBSTITUTO DA GORDURA E INGREDIENTE FUNCIONAL PREBIÓTICO

Fabiane Ferreira dos Santos

Rosires Deliza

Simone Pereira Mathias

**DOI 10.22533/at.ed.37719160119**

**CAPÍTULO 20 ..... 191**

QUALIDADE DA DIETA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Olívia Farias dos Santos

Cecília Fischer Fernandes

Cristielle Aguzzi Cougo de Leon

Fernanda Vighi Dobke

Sandra Costa Valle

Renata Torres Abib Bertacco

**DOI 10.22533/at.ed.37719160120**

**CAPÍTULO 21 ..... 199**

CONSTRUINDO RELAÇÕES DE CUIDADO POR MEIO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE: O PAPEL DO FISIOTERAPEUTA NA ESCOLA REGULAR

Maria Bethânia Tomaschewski Bueno

Tatiane Barcellos Corrêa

**DOI 10.22533/at.ed.37719160121**

**CAPÍTULO 22 ..... 209**

ESTUDO DOS PADRÕES DE POLINIZAÇÃO DE *Apis mellifera* L. EM PLANTAS DA CAATINGA, COMO ESTRATÉGIA PARA A CONSTRUÇÃO DE UM MATERIAL DIDÁTICO

Fernanda Kamila Oliveira de Aquino

Raíza Lorena Peixoto

Larissa Mércia Peixoto

George Machado Tabatinga Filho

Ileane Oliveira Barros

**DOI 10.22533/at.ed.37719160122**

**CAPÍTULO 23 ..... 224**

IMAGENS ANALÓGICAS EM LIVROS DIDÁTICOS DE BIOLOGIA

Francisco Alves Santos

Andréa Pereira Silveira

Isabel Cristina Higino Santana

**DOI 10.22533/at.ed.37719160123**

**CAPÍTULO 24 ..... 234**

SITUAÇÃO DA PREVENÇÃO DE DOENÇAS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS, MORADORAS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DE UM SERVIÇO DE ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE

Déborah Silveira König  
Juvenal Soares Dias da Costa  
Denise Silva da Silveira  
Cintia Müller Leal  
Ubirajara Amaral Vinholes Filho

**DOI 10.22533/at.ed.37719160124**

**CAPÍTULO 25 ..... 239**

UMA NOVA ABORDAGEM PARA A ORIENTAÇÃO SEXUAL NA ESCOLA ESTADUAL NESTOR LIMA, NATAL RN.

Francicleide Venâncio Bezerra Alves  
Gabriel Henrique Santana da Silva  
Kaline Karla Gomes dos Santos  
Rosangela Lopes Dias

**DOI 10.22533/at.ed.37719160125**

**CAPÍTULO 26 ..... 252**

UTILIZAÇÃO DE ESTUDO DE CASO NO TÓPICO SISTEMA REPRODUTOR HUMANO NO ENSINO MÉDIO

Messias Rodrigues Arruda  
Isabel Cristina Higino Santana  
Andréa Pereira Silveira

**DOI 10.22533/at.ed.37719160126**

**CAPÍTULO 27 ..... 263**

INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA DO PIBID CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM SALA DE RECURSO MULTIFUNCIONAL

Emellyn Gabriela Ioris  
Claudinei de Freitas Vieira  
Leide Daiane Nascimento Mascarello  
Michele Potrich

**DOI 10.22533/at.ed.37719160127**

**CAPÍTULO 28 ..... 268**

UTILIZAÇÃO DO LÚDICO NO ENSINO DE BIOQUÍMICA: JOGOS DE ENCAIXE PARA DEMONSTRAÇÃO DIDÁTICA DE MUDANÇAS ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DA GLICÓLISE

Maria Julia Sousa da Fonseca  
Rebeca Eller Ferreira  
Luis Flávio Mendes Saraiva

**DOI 10.22533/at.ed.37719160128**

**SOBRE A ORGANIZADORA ..... 273**

## A SOS BOX PATTERN FOR LEPTOSPIRA SPP.

### Lívia de Moraes Bomediano

Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências  
Sociais Aplicadas – UFABC  
Santo André – SP

### Renata Maria Augusto da Costa

Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC  
Santo André – SP

### Ana Carolina Quirino Simões

Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências  
Sociais Aplicadas – UFABC  
Santo André – SP

**ABSTRACT:** Leptospirosis is an important zoonosis classified as a neglected tropical disease, responsible for serious public health problems resulting in costs to the economy. The disease is caused by pathogenic bacteria of the *Leptospira* genus which comprehends both pathogenic species and saprophytic ones. The SOS response is a bacteria defense mechanism against DNA damage caused by ultraviolet radiation, high concentrations of O<sub>2</sub> and Fe inside the cell and antibiotics. This system is well studied in *Escherichia coli* where more than 40 genes, including *recA*, *dinP*, *uvrA* and *recN* genes, were found to be involved in this kind of response and regulated by *lexA* and *recA* regulators. In *Leptospira spp* this response is not well characterized, especially regarding the saprophytic species. This study characterized

a SOS box motif in three leptospira species using genes regulated by *lexA* previously studied in *Leptospira interrogans* with ChIP-Seq experiment (chromosome immunoprecipitation coupled with massive parallel sequencing experiment) when exponential culture of bacteria were irradiated (IR) or not (NI) to a UV-C germicidal lamp (254nm), to a dose known to kill 50 - 60% of cells. MEME generated the SOS box motif that was subsequently used within MAST to search for this pattern in the genomes of *Leptospira borgpetersenii serovar serovar bovis*, *Leptospira interrogans serovar Copenhageni Fiocruz* and *Leptospira biflexa serovar Patoc Patoc Ames 1*. The SOS box motif retrieved genes known to be regulated by *lexA*, therefore indicating that the SOS box identified can be used to identified other genes involved in the SOS response.

**KEYWORDS:** genomics, SOS response, *Leptospira spp*.

### 1 | INTRODUCTION

Considered as an emerging zoonotic disease, leptospirosis is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. It is an endemic disease throughout the world with the highest incidence in tropical regions where the climate, hot and humid, is ideal for the survival

and reproduction of leptospira bacteria (Haake, 2015). The disease is maintained in nature by chronic infection in renal tubules of animal hosts, also called reservoirs or maintenance hosts.

The leptospiral major reservoirs are small mammals and rodents. These can be infected by the bacteria still in the growth phase and expelling leptospores in their urine for life (Haake, 2015). The leptospirosis infection involves a complex pathogen-host relationship. The host activates its immunological response while the pathogen uses its virulence factors to overcome the challenge of the immune defense of the host in an attempt to colonize the tissue. The pathogen interaction with the host in leptospirosis is not well known and there is no explanation for the development gap and aggressiveness of the disease in some patients while others are completely asymptomatic. It is very important to study the many forms that these bacteria can defend itself from the stress agents that can lead them to cell death.

The bacteria in general have a defense mechanism to DNA damage and injury called SOS response. A variety of stress agents can activate such response, for example, ultraviolet radiation, high oxygen and iron concentrations inside the cell, antibiotics, among others. The DNA lesion lead to blockage of the replication fork, since the DNA polymerase is unable to handle this kind of damage (Friedberg, 2006). The SOS response aims to start DNA replication before the cell dies. It has been well studied *Escherichia coli* and 40 genes were found to be involved in this response (Courcelle, 2001).

The expression of these genes is regulated by the *lexA* repressor and the recombinase *recA*. In *Escherichia coli*, genes regulated by the *lexA* are involved with the inhibition of cell division, translesion synthesis and excision repair. The *lexA* repressor is bound to the promoter region, also called SOS box region of the genes that belongs to the system, repressing the transcription of these genes. In a situation of stress which causes DNA damage, blockage of replication fork leads to the formation of single stranded DNA (ssDNA). The recombinase *recA* then links itself up with these single stranded DNA, changing its conformation to the active state. This new conformation of the recombinase *recA*, activated, binds to the *lexA* repressor leading to its auto cleavage, releasing the SOS box region and allowing transcription of the genes that composes the system.

After the repair of DNA damage, *recA* levels in their active conformation fall and it sets *lexA* free to repress again the genes and the system returns to its non-induced state. The activation of the SOS system leads to the freezing of the cell cycle for the translesion synthesis and repair of DNA lesion to occur. These events can increase the number of mutations, gene rearrangements and activation of virulence genes and its very important to be studied in pathogenic and saprophytic organisms.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

**Selection of genomic regions of the training set to MEME** – A previous work from our group (Fonseca, 2015). found which genes are regulated by *lexA* in *Leptospira interrogans serovar Copenhageni Fiocruz L1-130* by ChIP-Seq (chromosome immunoprecipitation coupled with massive parallel sequencing experiment) when exponential culture of bacteria were irradiated (IR) or not (NI) to a UV-C germicidal lamp (254nm), to a dose known to kill 50 - 60% of cells (5 J.m<sup>2</sup>). The cross-linked lysates preparation and immunoprecipitation were performed as described by Lins and Grossman (Alseth, 2006) and immunoprecipitation were performed with anti-LexA1 mouse serum (Fonseca, 2015). Sequencing was performed in a HiSeq 2500 (Illumina) platform. The peak-calling tool from CisGenome (Hedge, 2010) was used to define enriched regions in each immunoprecipitated sample, using the total sample as background control. Only regions with fold enrichment of at least 2-fold, present in both immunoprecipitated samples and absent from total samples were selected. The most enriched binding sites for *lexA* were selected to continue the investigation of the SOS box. These sequences were used as a training set to the MEME Suite (Bailey, 2015) to identify a consensus SOS motif.

**Identification of the SOS box in *Leptospira* genomes** – FASTA sequences from these genes were submitted to the software and the resulting matrix with the SOS box pattern was submitted to the MAST (Bailey, 2015) software to find homologous pattern in genes of the other three species of leptospira, i.e., *Leptospira biflexa serovar Patoc Patoc 1 Ames*, *Leptospira biflexa serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)'*, *Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601*, *Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130* and *Leptospira borgpetersenii serovar hardjo bovis*.

## 3 | RESULTS

The strategy to define SOS box from *Leptospira interrogans* revealed one motif considered for further studies, shown in Figure 1. This motif had the best score and p-value which is a measure of significance of a data set used to evaluated how significant is that data in compare to other results. The lower the p-value, the more significant is the data. In this case, the motif shown in figure 1 had the lowest p-value and was chosen as a model for the search in the other species aside *Leptospira interrogans*.

Figure 2 shows how conserved is the SOS box motif in all the species studied for the main genes of the system which are the two regulators *lexA* and *recA* and *recN* and *dinP* genes, involved with the DNA repair. It also shows that there is the same number of spacers between the most conserved parts of the box. For example, from the first cytosine (blue) to the adenine (red), number seven of the motif, there is a great degeneration (spacers) in these nucleotides in all studied genes.

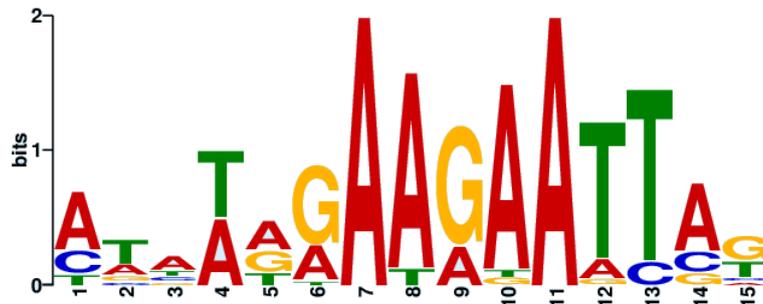


Figure 1: The best SOS box pattern found in the analysis. In the x axis is the position of the bases in the motif and in the y axis is the number of bits, representing the logo (graphical representation of the sequence conservation of nucleotides) during the scan for the consensus motif by MEME.



Name	Strand	Sequence
recACopenhageni	-	TAAAATATAT CTAAGTATTTGTATAG CAAAAATTTG
lexAAmes	+	CGCCCATTTT C TATTATCTGTTTAG TATGAAAGAC
lexAHardjo	+	CATTATTCA CTACTAAGTTGTTTAG TATGAAAGAT
lexACopenhageni	+	CATCTATTCA CTACTAAGTTGTTTAG TATGAAAGAC
recAHardjo	-	TAAAATATAT GTAATTATTTGTATAG CAAAAATTTG
recNbiflexaAmes	-	TACAAGTAGT CAATAAAATTTTTTAG AAAACTTAAA
recNCopenhageni	+	AAAAATGATT GCAATCATTGTATAG CAATTAAATA
dinPFiocruz	+	TTGAAAAAGA CATTACAAATGTTTAG CTATTATAA
recAbiflexaAmes	+	TAAAAAATA CTATACAAGTACTTAC ATTTTGTTTA
uvrAbiflexaAmes	-	TATCGTGTTT CGAATTCTTTTTTTAC TTCTTTTTTT

Figure 2: The SOS box found present in the main genes studied in *Leptospira* species with conserved regions alongside their promoter region.

Another important result is presented in figure 3. It shows the position of the motif found in each studied gene in the studied species. The recA, recN and lexA SOS boxes are well conserved in the studied species.



Figure 3: Position of the SOS box pattern in the genome for the studied species for the main genes of the SOS system. The horizontal line represents the genome length and the circled areas show the conservation of the position of the pattern for each gene among the species.

The homologous pattern found for SOS box in the studied genomes through MAST software are shown in Figure 4. The horizontal line represents the entire length

of the genome of the bacteria. The black blocks represent the positions where the software found the studied SOS box homologue. Each black block has a p-value that corroborate with each position. The start and end positions of the pattern in the genome is also shown alongside with length of the genomes.

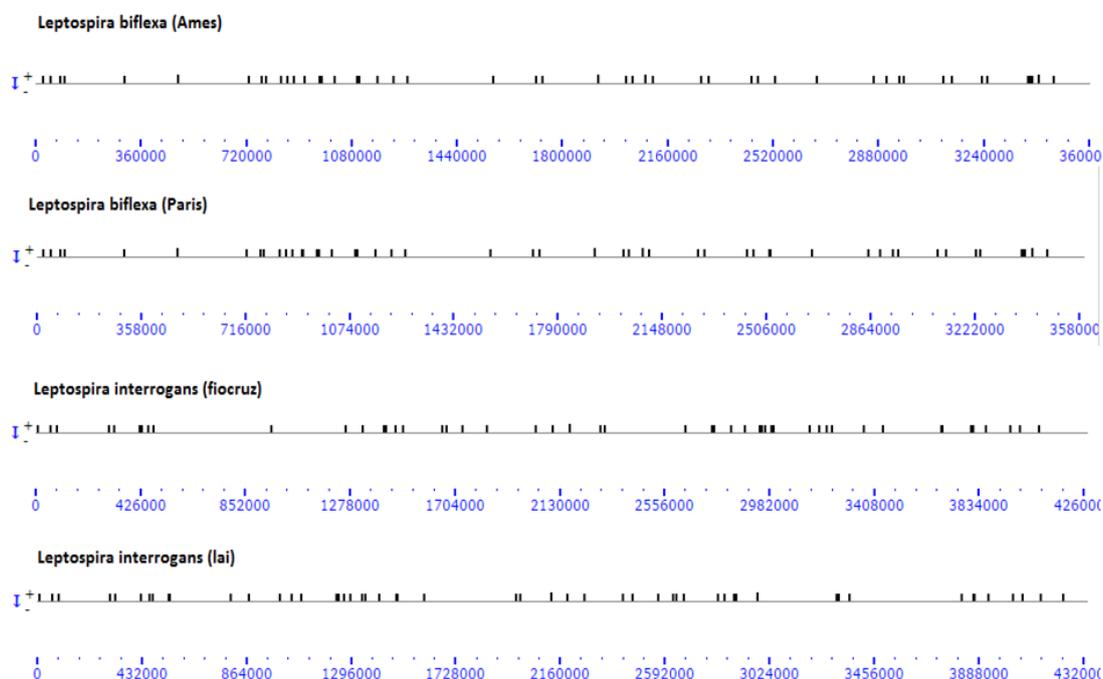


Figure 4: Homologous pattern found for SOS box in the studied genomes through MAST software.

## 4 | DISCUSSION

The motif found by MEME software with the best p-value based on the list of the genes regulated by *lexA* in *Leptospira interrogans* is CTAAGAAGAATTAG. Figure 2 shows the promoter region of the main genes (*lexA*, *recA*, *recN* and *dinP*) of the SOS system for the studied species. There are conserved nucleotides alongside the promoter, as well as conserved spacers between these nucleotides. This is an important result because it confirms the presence of the pattern in the *Leptospira* studied genomes.

For *lexA* and *recN* genes the SOS box position in different species remained conserved. The analysis revealed a downstream position for the motif for *lexA*, *recN*, *uvrA* and *dinP* genes and an upstream position for *recA* gene. The position of the motif found among species also appear, in general, very similar and it infers that this region remained conserved and that there was no significant breaks or insertions in the *Leptospira* species studied, which could alter the regulation of transcription of these genes in *lexA*.

Saprophytic bacteria showed a similar distribution of the studied SOS box pattern and it was found 44 locations (figure 4) where the same pattern appears. As for pathogenic bacteria, the distribution of the pattern is different in some positions, but it

has the same number of positions where the pattern appears in a total of 47 (figure 4). These positions with the motif, as well as their p-values were well annotated and stored for future reference.

## 5 | CONCLUSION

The computational analysis and experimental validations performed so far confirm the existence of a SOS box pattern between these three species of the genus *Leptospira*: *Leptospira borgpetersenii* serovar *serovar bovis*, *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* Fiocruz and *Leptospira biflexa* serovar *Patoc Patoc Ames 1*. The box in these species remained well preserved, consisting in a motif and characterized region where *lexA* can bind to regulate the SOS system genes. A further study using the MAST tool with the SOS box used for this study may reveal other genes involved with the SOS response for these *Leptospira* species.

## 6 | ACKNOWLEDGEMENTS

Professor Paulo Lee Hoo, his PHD student, Luciane Schons da Fonseca and researcher Josefa Bezerra da Silva, all from Butantan Institute, collaborated to this work with the results of the ChIP-seq experiment and the list of the genes regulated by *lexA* in *Leptospira interrogans*.

## REFERENCES

- ALSETH, Ingrun et al. A new protein superfamily includes two novel 3-methyladenine DNA glycosylases from *Bacillus cereus*, AlkC and AlkD. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1602-1609, 2006.
- BAILEY, Timothy L. et al. The MEME suite. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W39-W49, 2015.
- COURCELLE, Justin et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 41-64, 2001.
- FONSECA, Luciane Schons da. **Characterization of the SOS response in *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni***. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FRIEDBERG, Errol C. et al. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. **DNA repair**, v. 5, n. 8, p. 986-996, 2006.
- HAAKE, David A.; LEVETT, Paul N. Leptospirosis in humans. In: **Leptospira and leptospirosis**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 65-97.
- HEGDE, Muralidhar L.; HAZRA, Tapas K.; MITRA, Sankar. Functions of disordered regions in mammalian early base excision repair proteins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 21, p. 3573-3587, 2010.

## ANÁLISE IN SILICO DO GENE LIPID TRANSFER PROTEIN SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO

### Renan Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
(UNESP) – São Paulo

### Jóice de Oliveira Leite Silva

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

### Lucas de Faria Nogueira

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

### Cyro Bueno Neto

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
(UNESP) – São Paulo

### Sonia Marli Zingaretti

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

**RESUMO:** As respostas de plantas ao estresse abiótico são muitas vezes complexas, por isso, nos últimos anos, muito se tem feito para isolar genes induzidos durante o déficit hídrico, a fim de estudar a função de produtos gênicos e os caminhos que conduzem à indução. Analisar *in silico* a expressão de genes pode contribuir de forma expressiva para elucidar as rotas de defesa das plantas, contribuindo sobremaneira para o melhoramento da cultura. O estudo teve como objetivo compreender *in silico* a relação da proteína LTP e a tolerância ao estresse por seca. A sequência do gene *LTP* foi adquirida no BCCCenter e o sequenciamento foi realizado para confirmação e caracterização da molécula de interesse. A análise *in silico* foi realizada mediante utilização dos softwares

de bioinformática. O sequenciamento resultou em mais de 1200 bp, com o frame 1 (+) apresentando o domínio da proteína, que contempla proteínas de transferência lipídica. É classificada no clã protéico da prolamina. A estrutura secundária da proteína compreende em grande parte folhas beta (79), seguido por hélices alfa (50). De acordo com o “software Aramemnon” a indução do gene *LTP* em *Arabidopsis* na condição de estresse osmótico acontece por toda a planta, incluindo sistema radicular, hipocótilo e folhas, com indução máxima para os tempos analisados em 12 e 24 horas. A proteína LTP em condições de estresse por seca, possivelmente está envolvida com a transferência de lipídios para a contribuição da tolerância das plantas ao estresse.

**PALAVRAS-CHAVE:** estresse abiótico, *in silico*, gene.

**ABSTRACT:** Plant responses to abiotic stress are often complex, so in recent years much has been done to isolate genes induced during water deficit in order to study the function of gene products and the pathways leading to induction. Analyzing *in silico* the expression of genes can contribute in an expressive way to elucidate the routes of defense of the plants, contributing greatly to the improvement of the culture. The objective of this study was to understand *in silico* the relationship of LTP protein (Lipid Transfer

Protein) and the tolerance to drought stress. The *LTP* gene sequence was purchased from BCCCenter and sequencing was performed for confirmation and characterization of the molecule of interest. The *in silico* analysis was performed using the bioinformatics software BlastX, Bioedit, Pfam 30.0, SMART, CFSSP, Aramemnon 8.1. Sequencing resulted in more than 1200 bp, with frame 1 (+) showing the protein domain, which contemplates lipid transfer proteins. It is classified in the prolamin protein clan. The secondary structure of the protein largely comprises beta sheets (79), followed by alpha helices (50). According to the “Aramemnon software” the induction of the *LTP* gene in *Arabidopsis* in the osmotic stress condition occurs throughout the plant, including root system, hypocotyl and leaves, with maximum induction for the analyzed times in 12 and 24 hours. The LTP protein under drought stress conditions is possibly involved with lipid transfer to the contribution of plant tolerance to stress.

**KEYWORDS:** abiotic stress, *in silico*, gene.

## 1 | INTRODUÇÃO

O rendimento das culturas é influenciado negativamente por vários fatores ambientais, como a seca, salinidade, temperatura e toxicidade por alumínio (LAWLOR e CORNIC, 2002). Estima-se que os estresses em geral podem reduzir a produtividade em até 70% (MAYBANK et al., 1995). O estresse abiótico afeta a planta em diferentes níveis, como promovendo a redução das taxas de assimilação de CO<sub>2</sub>, o tamanho das células de folhas, a taxa de transpiração, a taxa de crescimento das plantas, entre outros (SOLARI et al., 2006).

Muitos estudos tem isolado genes induzidos durante o déficit hídrico, principalmente porque se objetiva compreender a função de produtos gênicos e os caminhos que conduzem essa indução. As mudanças na expressão gênica são fundamentais para as respostas que ocorrem durante o estresse (BRAY, 1993).

Essas mudanças em resposta ao estresse hídrico podem promover a capacidade da planta de responder adequadamente a esse efeito deletério, promovendo a qualificação das funções desta para sua sobrevivência. No entanto, a indução de genes específicos pode ser enganadora, uma vez que é possível que as alterações de expressão possam ser resultado de danos celulares, devido ao fato de que plantas submetidas ao estresse hídrico sofrem uma ruptura nos processos fisiológicos e metabólicos que pode ser interpretada como uma resposta à injúria. Essas alterações podem levar à indução de genes específicos que não estão envolvidos na promoção da adaptação ao estresse (BRAY, 2002). De maneira geral, os produtos gênicos induzidos pelo estresse podem ser classificados de dois modos: genes que protegem a planta diretamente contra o estresse e genes que regulam a expressão de outros genes (BRAY, 1997; SHAO et al., 2007).

É possível observar que genes apresentam perfis de expressão distintos, ou seja, mRNAs de genes estresse-induzidos diminuem quando as plantas são liberadas

das condições de estresse. No entanto, os padrões de expressão desses genes são complexos, com alguns genes respondendo muito rapidamente ao déficit hídrico e outros que são induzidos lentamente depois do acúmulo de ABA (ácido abscísico) (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996).

Por meio de análises *in silico* resultados bastante satisfatórios são obtidos a respeito de um gene. Estudos *in silico* podem ser ferramentas adicionais para a compreensão da funcionalidade, isolamento e posterior análise gênica (SOUSA, 2012). Essas ferramentas auxiliam na caracterização de um gene, fornecendo informações acerca da sua estrutura, função, localização celular, expressão diferencial e outras características (HULM et al., 2017).

As proteínas de transferência de lípidos de plantas, também conhecidas como LTPs, são um grupo de proteínas altamente conservadas de cerca de 9kDa encontradas em tecidos de plantas superiores. Como o próprio nome indica, as proteínas de transferência lipídica são responsáveis pelo transporte de fosfolípidos e outros grupos de ácidos graxos entre as membranas celulares, sendo também capazes de ligar grupos acilo (KADER, 1996).

Normalmente, a maioria dos lípidos não saem espontaneamente das membranas porque a sua hidrofobicidade as torna pouco solúveis em água. Os LTPs facilitam o movimento de lípidos entre membranas por ligação e solubilização. Essas proteínas apresentam tipicamente especificidade larga do substrato e assim podem interagir com uma variedade de lipídios diferentes (CHENG et al., 2004). Tais proteínas podem estar envolvidas na biossíntese de cutina, formação de cera superficial, crescimento mitocondrial, reações de defesa de patógenos e adaptação às mudanças ambientais (KADER, 1997).

Embora sejam necessários testes biológicos e funcionais da proteína para entender como os nsLTPs estão ligados às respostas de estresse por seca, alguns estudos relacionam a expressão do gene em resposta a esse estresse abiótico, entre eles podemos citar: HINCHA et al., (2001) relatam que nsLTPs purificados confirmaram seu papel na tolerância ao estresse abiótico assim como o aumento nos níveis de transcrição de *nsLTPs* em resposta à seca, sal e frio detectado em outros estudos (JUNG et al., 2003). A estabilização das membranas, deposição da cutícula e/ou alterações na organização da parede celular também têm sido reivindicadas como suas funções putativas nas respostas a esses fatores de estresse.

Em tabaco, genes *nsLTP* induzidos durante a seca promoveram a deposição de cera cuticular (CAMERON et al., 2006), assim como a superexpressão do gene *caLTP1* da pimenta em *Arabidopsis* aumentou sua tolerância ao NaCl e seca em vários estádios vegetativos de crescimento (SAROWAR et al., 2009).

O trabalho teve como objetivo analisar *in silico* a sequência do gene *Lipid Transfer Protein (LTP)* de cana-de-açúcar e compreender sua relação com o estresse por seca.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O clone da sequência *LTP* selecionado foi adquirido do Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCCenter) e posteriormente sequenciado para confirmação do mesmo. O sequenciamento foi feito em sequenciador automático pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo, no CREBIO – Centro de Recursos Biológicos, UNESP, Jaboticabal.

A análise *in silico* foi realizada mediante utilização dos softwares de bioinformática BlastX, Bioedit, Pfam 30.0 (EMBL-EBI, 2016 - <http://pfam.xfam.org/>), SMART (2017 - <http://smart.embl-heidelberg.de/>), CFSSP (2017 - <http://www.biogem.org/tool/choufasman/index.php>), Aramemnon 8.1 (2017 - <http://aramemnon.uni-koeln.de/>).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Obtenção e sequenciamento do gene *LTP*

O clone de *Escherichia coli* portadora do plasmídeo pSPORT1 contendo o gene *LTP* completo (amostra 5, Figura 1) foi obtido do “BCCCenter”, quantificado e a integridade foi averiguada por eletroforese em gel de agarose 1%.

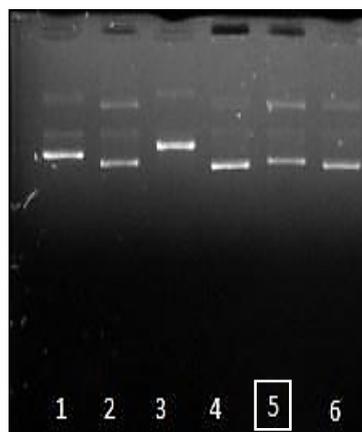


Figura 1. Integridade do clone *LTP* obtido do BCCCenter. Gel de agarose 1%. (1) - Cinnamoyl-CoA reductase; (2) - S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAM*); (3) - Pyruvate kinase; (4) – calmodulina; (5) - Lipid Transfer protein (*LTP*); (6) - Ubiquitina (*UBQ*).

A quantificação da amostra 5 foi feita por espectrofotômetro GeneQuant™ 1300 (GE Healthcare, USA) resultando em 125 ng/μl de DNA. O resultado do sequenciamento e da análise realizada estão apresentados na Figura 2. Na Figura 2a está apresentada a sequência de nucleotídeos obtida bem como seu eletroferograma (Figura 2b).

(a)

**Primer (24mer) – Amostra 5-M13R-24**

```
NNNNTNNNANNTNNNTCTCACTATAGGGAAGCTGGTACGCCTGCAGGTACCGGTCCGGAAT
TCCCGGGTCGACCCACGCGTCCGGAGTCACACCCACCACTAGCTACACTCCACACTCACA
CACGTCTCGGACTCTCGGTCAGGGCAACGACGACAACGACGATGGCTGTGCTGAACAGCA
GCAGGAAGACGGTGGTGGCCCTGGCCGTGGTGGTGGCGGGCGGGCGCTGGCGTC
GTCCGCGTCGGCGGGCAGTCACTTGCAGGGCAGGTGGGGTGGTGGTGGCGGGCGGGCGCTCC
CGTACGCGACGGGGAGGGCCAGCACGCTTCCCGCCTCGTGCTGCTCCGGCGTGCAGCAG
CCTCAACAGCGCGGGCGCGGACCAGTCCGACCGCCAGGCGGGCGTGGCGTGCCTCAAG
AGCCTCGCCAACAGCGTCAAGAGCGTCAACATGGGCACCGTCGCCACCATCCCCGGCAA
GTGCGGGCTCTCCGTGGGCTTCCCATCAGCATGTCCACCGACTGCAACAAGGTCAGCTA
AATGATGAAATCTACGACGTTAGTACCAGTGCACGTGATGAAGCTATCAAGCCAGGAAAATA
AAATAAATTGTGGTAACAGGAGGAGCAGCATGCATGCGGTATCTATATAGTATTACAGAGTATT
ATATGTAAACCCTGTGCACTGTGTATGTGGGCATATACATGGCTATATGTATGTGTGGCTTG
CAGTGCTACCTAGCTAGCTTCTCATCATGTGCTCATGTATGCGGGTGTGTGTGTGTGAACA
GCCAGTACACTGTTGACTGTTGAGTGGCTTCGATCGACCTACTTGTTCGGATAGTTAATGGT
TTGCTATATAGTGGTGCTTGTCTAATAATCNGANNATAAAAAATAATNNTAAAGAATAACATAA
ATAAAAATAAAAAACAATAATAACATATATATTGGGGGCGGGCCCGCTTCTAGAAGAATCCAAG
CTTACGTTACGCCGTGCATGGCGACGTCAATAGCTTCTTTCTAATAGTGGTCACCTAAATTCA
ATCACTGGGCGGTGTTTTAACACGTCGTGGACTGGGNAACCCCTTGGCGTTACCCAAC
TTAATCGCCTTGCAGCACAAATCCCCTTCNNGGCTGGGCGTAATAGCGAAGAAGCCCGCAA
CGATCGCCTTCCAACAGTTGGCCANCCTNAATGGNANNNNNNCNNCCNGNNNNNNNATN
NNNNNNNTGNNGTACGCAACNNNAGCNNNNNNNNNCANGGGCCCCNN
```

(b)

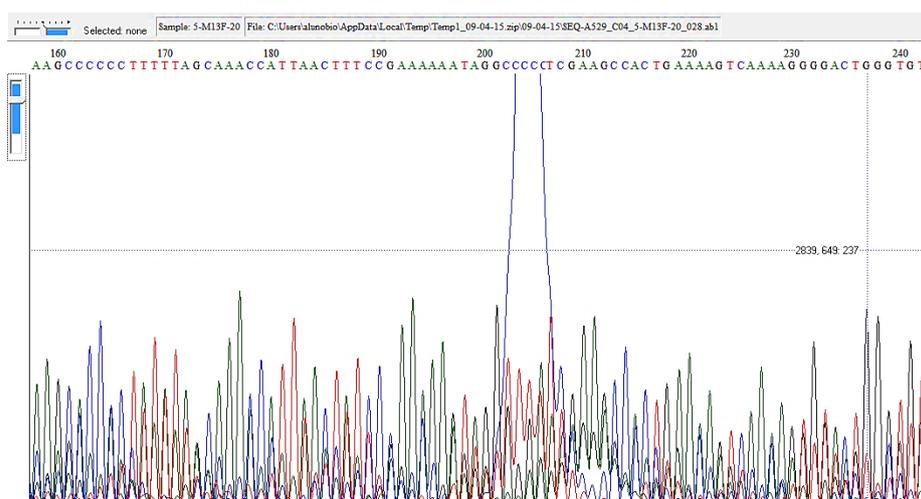


Figura 2. Resultado do sequenciamento da amostra 5 (confirmação do gene *LTP*). (a) Sequência obtida utilizando o primer 24mer; (b) Eletroferograma do sequenciamento do gene *LTP*. Fonte: BlastX (2016) e Bioedit (2016).

### 3.2 Caracterização *in silico* do gene *LTP* e proteína

A sequência codificadora do gene *LTP* apresenta seis frames. O frame 1 (+) apresenta o domínio da proteína, pertencente a família *Tryp\_alpha\_amyl* (PF00234), que contempla proteínas de ação inibitória de proteases, de reserva (armazenamento de sementes) e de transferência lipídica. É classificada no clã proteico da *prolamina* (CL0482) (Figura 3).

Frame (sense)	Família	Descrição	Clã
1 (+)	<i>Try_alpha_aml</i> (PF00234)	Inibidor de protease/ reserva/LTP	<i>Prolamina</i> (CL0482)
#HMM	Crdvllqcsqvava1apcaglqqsccqppqgCCqLkq1.....peqcrCeairavveSiilqqqlaqleeIrskaagt1pamCnvnvpp		
#MATCH	C++v +lapc ++ ++++++ ++CC++++ 1	+++crC + a++ +	+++ +++++p +C+v+v +
#PP	44444.....45*****988999988877766.....9*****9866		
#SEQ	CGQVC-----SSLAPCIPYATGRASTLPASCCSGVRSlnsaartssdrQAACRCLKSLANSVK-----SVNMGTVATIPGKCGVSVGF		

Figura 3. Frame identificador do domínio da proteína de *LTP*, família e clã proteico. (a) Frame identificado correspondente ao domínio da proteína; (b) Família e clã da proteína; na caixa cinza esta representado o alinhamento realizado pelo software para identificação da família e clã.

Fonte: software Pfam 30.0 (EMBL-EBI, 2016). Fonte: Hulm et al. (2017).

Em se tratando do clã, o grupo *prolamina*, representa as principais proteínas de armazenamento de sementes (como no milho e sorgo). São proteínas hidrofóbicas ricas em prolina e glutamina (GIBBON; LARKINS, 2005).

Visto que as plantas possuem uma cutícula na superfície de suas folhas que fornece uma barreira protetora contra as adversidades ambientais, como o estresse pela seca, o acúmulo de lipídios cuticulares pode estar contribuindo para a tolerância de plantas ao estresse por deficiência hídrica. Ou seja, a expressão do gene *LTP* e consequentemente a presença da proteína, está estritamente relacionado ao estresse por seca. No trabalho de Wei e Zhong (2014) o gene *ZmLTP1.2* foi significativamente induzido no meristema de folhas estressado pela seca, assim como, um gene de stress-resposta, *ZmLTP1.1*, também aumenta seu nível de expressão no meristema de folhas estressado pela seca.

Analisando a sequência de aminoácidos da *LTP*, a estrutura secundária da proteína compreende em grande parte folhas beta (79), seguido por hélices alfa (50) (Figura 4). O modelo tridimensional de *Arabidopsis* (*AtDIR1*) segue a dobra geral de nsLTPs com cinco hélices alfa estabilizadas por ligações dissulfeto em torno de uma cavidade central. As estruturas cristalinas dos LTPs das plantas são constituídas por quatro ou cinco hélices alfa, com uma cavidade hidrofóbica central onde ocorre a ligação lipídica (MALDONADO et al., 2002; NIEUWLAND et al., 2005; LASCOMBE et al., 2008).

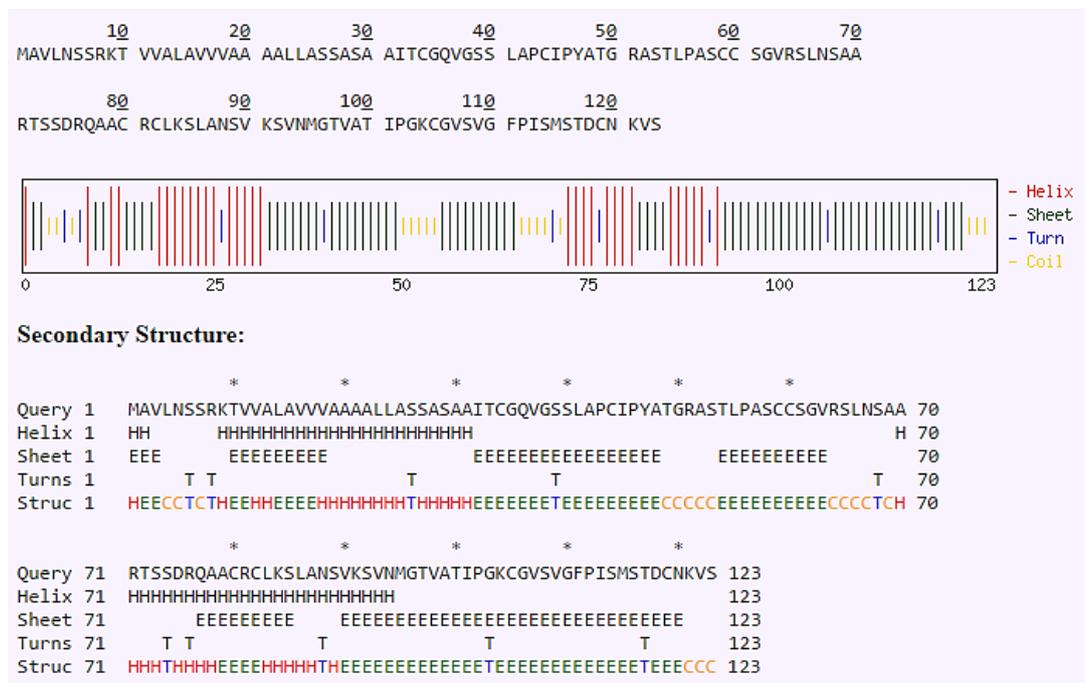


Figura 4. Estrutura secundária da proteína LTP (cana-de-açúcar). Fonte: análise realizada pelo software CFSSP (2017).

Utilizando-se o software Aramemnon 8.1, que com base em trabalhos publicados indica a expressão de genes em determinadas condições, foi possível averiguar a expressão do gene *LTP* em *Arabidopsis* na condição de estresse osmótico, induzido por manitol. De acordo com o proposto por Kilian et al. (2007) e Winter et al. (2007), observa-se que em experimentos de estresse osmótico (300 mM de manitol) o gene *LTP* é induzido por toda a planta de *Arabidopsis*, incluindo sistema radicular, hipocótilo e folhas, com indução máxima para os tempos analisados em 12 e 24 horas (Figura 5).

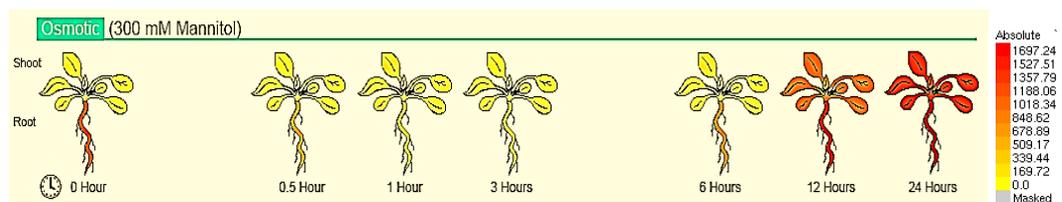


Figura 5. Expressão do gene *LTP* em *Arabidopsis*. Planta submetida ao estresse osmótico, induzido por manitol. Fonte: análise pelo software Aramemnon 8.1 (2003).

## 4 | CONCLUSÕES

O gene *LTP* e seu produto gênico foram caracterizados por softwares e indicam que a proteína atua no meio extracelular, potencialmente promovendo o acúmulo de lipídios cuticulares. A expressão diferencial desse gene pode estar associado ao estresse osmótico, ou seja, a indução ou repressão do gene *LTP* pode estar contribuindo para a tolerância das plantas ao estresse por deficiência hídrica, seca, entre outros.

## REFERÊNCIAS

- BRAY, E. A. **Molecular responses to water deficit**. *Plant Physiology*, v. 103, p.1035- 1040, 1993.
- BRAY, E. A. **Plant responses to water deficit**. *Trends in Plant Science*, v.2, p.48-54, 1997.
- BRAY, E. A. **Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data**. *Annual of Botany*, v. 89, p. 803-811, 2002.
- CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMAERT, L. B. **Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco**. *Plant Physiol*, v. 140, p. 176-183, 2006.
- CHENG, H. C.; CHENG, P. T.; PENG, P.; LYU, P. C.; SUN, Y. J. **Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa***. *Protein Science*, v.13, n.9, p.2304-2315, 2004.
- GIBBON, B. C.; LARKINS, B. A. **Molecular genetic approaches to developing quality protein maize**. *Trends in Genetics*, v.21, n.4, p.227-233, 2005.
- HINCHA, D. K.; NEUKAMM, B.; SROR, H. A.; SIEG, F.; WECKWARTH, W.; RECKELS, M.; LULLIEN-PELLERIN, V.; SCHRODER, W.; SCHIMITT, J. M. **Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family**. *Plant Physiol*, v. 125, p. 835-846, 2001.
- HULM, L. C.; SILVA, R. G.; MARCIANO, J. S. P.; ZINGARETTI, S. M. **Análise *in silico* do gene “Lipid Transfer Protein” (LTP) de cana-de-açúcar**. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB*, v.9, p. 1-5, 2017.
- JUNG, H. W.; KIM, W.; HWANG, B. K. **Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses**. *Plant Cell Environ*, v. 26, p. 915-928, 2003.
- KADER, J. C. **Lipid-Transfer Proteins in Plants**. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v.47, p.627-654, 1996.
- KADER, J. C. **Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins**. *Trends in Plant Science*, v.2, n.2, p. 66-70, 1997.
- KILIAN, J.; WHITEHEAD, D.; HORAK, J.; WANKE, D.; WEINL, S.; BATISTIC, O.; D'ANGELO, C.; BORNBERG-BAUER, E.; KUDLA, J.; HARTER, K. **The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses**. *The Plant Journal*, v. 50, n. 2, p. 347-363, 2007.
- LASCOMBE, M. B.; BAKAN, B.; BUHOT, N.; MARION, D.; BLEIN, J. P.; LARUE, V.; LAMB, C.; PRANGE, T. **The structure of “defective in induced resistance” protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein**. *Protein Sci*, v. 17, p. 1522-1530, 2008.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. **Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants**. *Plant Cell Environ*, v. 25, p. 275–294, 2002.
- MALDONADO, A. M.; DOERNER, P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J.; CAMERON, R. K. **A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis***. *Nature*, v. 419, p. 399-403, 2002.
- MAYBANK, J.; BONSAI, B. R.; JONES, J.; LAWFORD, R. G.; O'BRIEN, E. G. **Drought as a natural**

**disaster.** Atmosphere-Ocean, v. 33, p.195–222, 1995.

SOLARI, L. I.; JOHNSON, S.; DEJONG, T. M. **Relationship of water status to vegetative growth and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks.** Tree Physiol, 26, p.1333–1341, 2006.

NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B. A.; FASOLINO, A.; HILBERS, C. W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. **Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco.** Plant Cell, v. 17, p. 2009-2019, 2005.

SAROWAR, S.; KIM, Y. J.; KIM, K. D.; HWANG, B. K.; OK, S. H.; SHIN, J. S. **Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco.** Plant Cell Rep, v. 28, p. 419-427, 2009.

SHAO, H. B.; GUO, Q. J.; CHU, L. Y.; ZHAO, X. N.; SU, Z. L.; HU, Y. C.; CHENG, J. F. **Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress** Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, v. 54, p. 37–45, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Molecular responses to drought and cold stress.** Curr Opin Biotechnol, v. 7, p. 161-167, 1996.

SOUSA, C. S. **Caracterização *in silico* de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja.** Viçosa: UFV, 94 (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

WEI, K.; ZHONG, X. **Non-specific lipid transfer proteins in maize.** BMC Plant Biology, v. 14, 2014.

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAK, H.; AMMAR, R.; WILSON, G. V.; PROVART, N. J. **An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets.** Plos one, v. 2, n. 8, 2007.

## ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE DELEÇÃO DOS GENES GSTM1 E GSTT1 E *DIABETES MELLITUS* EM IDOSOS: ESTUDO PILOTO

### **Layse Rafaela Moroti – Perugini**

Universidade Norte do Paraná – Centro de Pesquisa Biológica.

Londrina – PR

Email: lah.moroti@hotmail.com

### **Luana Oliveira de Lima**

Universidade Norte do Paraná – Centro de Pesquisa Biológica.

Londrina – PR

### **Audrey de Souza Marquez**

Universidade Norte do Paraná – Centro de Pesquisa Biológica.

Londrina – PR

### **Regina Célia Poli-Frederico**

Universidade Norte do Paraná – Centro de Pesquisa Biológica e Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Londrina – PR

**RESUMO:** *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença que acomete grande parte da população mundial. Podendo apresentar como causa três fatores principais: estilo de vida, exposição ambiental e suscetibilidade genética. Para os fatores genéticos, pode-se observar que os polimorfismos são capazes de exercer grande influência para o desenvolvimento desta doença. A Glutathione S-Transferase (GST), por estar envolvida

na biotransformação de xenobióticos e produtos reativos de processos intracelulares responsáveis pelo estresse oxidativo, podem estar associados com DM tipo 2 (DM2). Há evidências de que a ausência de uma ou mais formas de GST estejam associadas à redução da produção de insulina e do mau funcionamento das células  $\beta$  pancreáticas. Assim, o objetivo do trabalho foi a investigação do polimorfismo dos genes GSTM1 e GSTT1 e DM. Foram avaliados 78 idosos, com idade igual ou superior a 60 anos. O perfil genético foi analisado através reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de eletrofore. Como resultado, pudemos observar que para o gene GSTM1 notou-se ausência deste em 9 indivíduos diabéticos do total portador da doença, 47,4%; no entanto, 18 dos indivíduos com esta mesma alteração, mas sem diabetes apresentaram 46,2%;  $p=0,239$ . Para o gene GSTT1 observou-se ausência em 10 dos indivíduos diabéticos, 52,6%; para os indivíduos não diabéticos, 9 não apresentaram a deleção deste gene, 23,1%;  $p=0,080$ . Concluímos, que apesar do estudo não ter apresentado resultado significativo, notou-se que a deleção de tais genes possui associação do polimorfismo com a susceptibilidade ao DM2; sendo necessário ampliação da amostra.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Diabetes mellitus*, polimorfismo, GSTM1, GSTT1.

**ABSTRACT:** Diabetes *mellitus* (DM) is a condition that affects a large part of the world population. It can present as cause three main factors: lifestyle, environmental exposure and genetic susceptibility. For the genetic factors, it can be observed that the polymorphisms are capable of exerting great influence for the development of this disease. Glutathione S-Transferase (GST), being involved in the biotransformation of xenobiotics and reactive products of intracellular processes responsible for oxidative stress, may be associated with type 2 DM (DM2). There is evidence that the absence of one or more forms of GST is associated with reduced insulin production and malfunctioning of pancreatic  $\beta$  cells. Thus, the objective of the work was to investigate the polymorphism of genes GSTM1 and GSTT1 and DM. A total of 78 elderly individuals, aged 60 years or over, were evaluated. The genetic profile was analyzed through polymerase chain reaction (PCR) followed by electrophoresis. As a result, we could observe that for the GSTM1 gene, it was observed absence of this in 9 diabetic individuals of the total disease carrier, 47.4%; however, 18 of the individuals with this same alteration, but without diabetes presented 46.2%;  $p = 0.239$ . For the GSTT1 gene, absence was observed in 10 of the diabetic subjects, 52.6%; for non-diabetic subjects, 9 did not present the deletion of this gene, 23.1%;  $p = 0.080$ . We conclude that although the study did not present a significant result, it was noted that the deletion of such genes has an association of the polymorphism with the susceptibility to DM2; being necessary to increase the sample.

**KEY WORDS:** *Diabetes mellitus*, polymorphism, GSTM1, GSTT1.

## 1 | INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma grande adversidade enfrentada pela saúde pública, uma vez que apresenta altos índices de morbimortalidade, atingindo diversas pessoas e apresentando como causa fatores tanto genéticos, como ambientais.<sup>6</sup>

Devido aos sintomas brandos da DM, a Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>20</sup>, aponta que aproximadamente 50% das pessoas que possuem diabetes não receberam diagnóstico no início da doença; e segundo SILVA<sup>18</sup>: “O diagnóstico de diabetes é feito com um atraso médio de quatro a sete anos”.

Esta doença ocorre devido a uma má atividade metabólica crônica do pâncreas, de natureza hiperglicemiante, com alterações metabólicas de carboidratos, proteínas e lipídios, resultantes de uma anormalidade na secreção de insulina, na ação da mesma, ou em ambas as condições<sup>12</sup>.

Qualificado como uma alteração heterogênea, Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) apresenta redução da sensibilidade tissular à insulina e implicância na produção. A possibilidade para o desenvolvimento desta enfermidade aumenta em indivíduos sedentários, obesos, com hipertensão arterial, glicemia plasmática de jejum  $\geq 100$  mg/dl, dieta inadequada, envelhecimento, além da herança genética<sup>17</sup>.

Sabe-se que os cromossomos homólogos são bastantes semelhantes entre si,

mas em certo local do cromossomo (*loci*) pode ocorrer uma variação na sequência do DNA (Ácido desoxirribonucleico). Assim, se essa variabilidade for notada em uma frequência maior que 1% da população, pode ser chamado esse ocorrido de polimorfismo genético.<sup>17</sup>

Esta alteração genética envolvendo genes relacionados a detoxificação celular pode contribuir no desenvolvimento da DM. Neste sentido, o gene Glutathione S-transferase (GST) pode estar relacionado à suscetibilidade ao *Diabetes mellitus* (DM) quando mutado, por codificar uma proteína com perda de sua atividade enzimática. Esta enzima, está associada a mecanismos antioxidantes protetores do organismo; ou seja, participam do sistema de defesa celular que combate o estresse oxidativo detoxificando o organismo através da eliminação de radicais livres e intermediários reativos de oxigênio<sup>4</sup>.

A grande família da Glutathione S-transferase pode ser subdividida nas seguintes classes: *alpha*, *mu*, *kappa*, *omega*, *pi*, *sigma*, *theta* e *zeta*. Estas classes se encontram, ainda, subdivididas respectivamente por: GSTA, GSTM, GSTK, GSTO, GSTP, GSTS, GSTT e GSTZ.<sup>1</sup>

Dentre as principais classes existentes, destacam-se; a classe  $\mu$  (*mu*), GSTM, apresenta, ao menos, 5 diferentes genes: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5; visto que são encontrados no braço do cromossomo 1; e a classe theta, observado apenas dois genes, GSTT1 e GSTT2; encontrados no cromossomo 22q.<sup>16</sup>

BID<sup>4</sup> et al afirmam que o:

*“Diabetes mellitus está associada a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e uma redução na defesa antioxidante. O estresse oxidativo torna-se evidente, como resultado da acumulação de EROs em condições de inflamação e Diabetes mellitus tipo 2.”*

Como a GST apresenta enzimas que atuam na desintoxicação multifuncional, preservando as células propensas ao estresse oxidativo<sup>1</sup>; o mesmo grupo, GST, pode apresentar-se também polimórfico, devido a variações genéticas próprias na ação metabólica enzimática levando a produção de substâncias danosas ao DNA; assumindo a possível causa de nocividade ao estresse oxidativo nas célula  $\beta$ .<sup>19</sup>

Reis<sup>16</sup> explica a respeito do gene GSTM1 em relação sua localização e polimorfismo da seguinte forma:

*“...situado no locus 1p13.1 (...) possui dois alelos funcionais (GSTM1\*A e GSTM1\*B) e eficientes na atividade metabólica. (...) O gene GSTM1 pode apresentar um polimorfismo genético caracterizado pela deleção total, resultando no genótipo homocigoto nulo GSTM1\*0 (nulo 0/0), caracterizando um indivíduo sem atividade enzimática.”*

Da mesma forma como ocorre a deleção total do gene GSTM1; ocorre também a do gene GSTT1, sendo observado então genótipo GSTT1 nulo ou 0/0 e por consequência também se apresenta sem atividade enzimática.<sup>14</sup>

Pinheiro<sup>14</sup> descreve as funções exercidas tanto dos genes GSTM1 quanto do GSTT1:

“Os alelos funcionais de GSTM1 são ativos na destoxicação de diversas substâncias presentes da fumaça do cigarro, (...) que são agentes oxidantes potencialmente genotóxicos, enquanto GSTT1 apresenta importante atividade na destoxicação de lipídios peroxidados e produtos de oxidação do DNA.”

Entre as classes humanas primárias do sistema, os genes GSTM1 e GSTT1 exibem uma deleção polimórfica que leva a uma falta de isoformas ativas quando em homozigose, conhecido como o genótipo nulo. No caso de GSTT1 nulo a deleção em homozigose é observada em uma frequência entre 20-70% em diferentes populações, já para GSTM1 a frequência apresentada está entre 11-38%<sup>2</sup>.

Sabendo-se a respeito de ação dos genes e o polimorfismo que os mesmos podem apresentar, entende-se que a deleção de uma ou mais formas de GST pode levar a célula a uma maior propensão ao estresse químico e oxidativo; alterando então, a ação celular. Desta forma, um polimorfismo gênico assume grande importância na predisposição à diversas patologias<sup>19</sup>.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS:

A amostra foi obtida através Projeto EELO (Estudo do Envelhecimento e Longevidade), um estudo transversal, realizado entre setembro de 2009 a janeiro de 2013 realizado na Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR) que teve como objetivo avaliar fatores sociodemográficos e indicadores das condições de saúde da população idosa em Londrina, Paraná, Brasil. Mais informações estão disponíveis na página <http://www2.unopar.br/sites/eelo>. O projeto EELO possui uma amostra total de 506 idosos, sendo, portanto, representativo da população total de 43.610 idosos de Londrina.

A amostra do Projeto EELO foi alcançada com base nos cadastros individuais do Programa de Saúde da Família (PSF) em 38 Unidades Básicas de Saúde (UBSs) da zona urbana de Londrina/PR. A partir da população de pessoas idosas do município, levando em consideração um intervalo de confiança de 95% e erro amostral de 5%. A classificação dos idosos foi definida de forma aleatória sistemática estratificada considerando-se o gênero e as cinco regiões do município, sendo: 15% da região central, 27% da região norte, 23% da região sul, 19% da região leste e 16% da região oeste. Os idosos que não participaram de todas as coletas, cujas variáveis eram necessárias a esta investigação foram excluídos desta análise. Assim, foi realizado inicialmente um estudo piloto com 78 idosos com idade igual ou superior a 60 anos, que fossem considerados fisicamente independentes, não importando o gênero; além de participarem do estudo de forma voluntária.

Todos participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido seguindo a resolução CNS nº466/12. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR (Universidade Norte do Paraná) certificado pelo Conselho Nacional de Saúde (PP/070/09).

Para o diagnóstico de Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) foram coletados relatos dos próprios participantes e realizadas análises de prontuário; assim como também por meio de exames sanguíneos (glicemia de jejum e hemoglobina glicada).

De acordo com os valores estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (2014)<sup>15</sup> foram analisados os dados obtidos; sendo que os idosos foram subdivididos em três grupos: aqueles não diabéticos (glicemia  $\leq$  99 mg/dL e hemoglobina glicada  $<$  6,5%), os idosos pré-diabéticos (glicemia entre 100 mg/dL e 125 mg/dL) e por fim, os diabéticos (glicemia  $\geq$  126 mg/dL e hemoglobina glicada  $>$  6,5%).

A partir de uma seleção aleatória, obtivemos um grupo de 78 idosos subdivididos em três grupos: não diabéticos (n=39), pré-diabéticos (n=20) e diabéticos tipo 2 (n=19).

A obtenção do DNA foi realizada à partir de leucócitos do sangue periférico por punção venosa em tubos contendo EDTA (0,6%) e fazendo uso do kit de extração de DNA Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Os DNAs extraídos foram armazenados em um ultrafreezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  até que fossem realizadas as análises do polimorfismo. A qualidade e quantidade de DNA foi mensurada por meio da análise de absorvância em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific) a 260nm e 280nm. Em seguida, realizou-se a diluição do DNA em água ultra pura Milli-Q® para que se obtivesse uma concentração final de 30ng/uL.

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase PCR – Multiplex com o volume final de 15uL e contendo: 100ng de DNA da amostra, tampão de reação 1X (Tris-HCL 20mM pH8,4; KCl 50mM), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM de cada dNTP, 10pMol de cada primer, 1U de AmpliTaq Gold DNA polimerase, H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Controle negativo da reação (H<sub>2</sub>O ultrapura estéril) e positivo (gene CYP1A1) formando uma fração não polimórfico de 312pb. Condições: 94°C por 5 minutos para pré-desnaturação, 30 ciclos de 94°C por 5 minutos; 59°C por 1 minutos e 72°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto para extensão final.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em (gel de agarose (2%) e corados com (Sybr Safe). As frações de 215pb e 480pb foram observadas e anotadas como GSTM1 e GSTT1 positivo, respectivamente. Ausência de amplificação das variantes, com controle interno (312pb), indicou genótipos nulos para cada variante ou ambas. Os resultados foram processados para confecção de um banco de dados.

Foi utilizado o pacote estatístico Statistical Package for Social Science -SPSS, versão 20, com digitação única, propiciando à pesquisa uma maior fidedignidade e confiabilidade a pesquisa; e foi adotado o nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

### **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Dos 78 indivíduos avaliados, 63 eram mulheres e 15 homens (Figura 1). A presença de DM foi observada em 19 indivíduos sendo 20 indivíduos pré-diabéticos e

ausência de diabetes em 39 participantes a pesquisa (Figura 2). Em relação à idade: 46,2% apresentaram idade <65 anos, 35,9% estavam com idade entre 65-74 anos e 17,9% tinham idade superior à 74 anos.

A presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram mais prevalentes na população estuda (59% e 67%, respectivamente) como pode ser observado nas figuras 3 e 4.

Quanto a distribuição dos genótipos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação a DM2 pode ser observado que para o gene *GSTM1* notou-se ausência deste em 9 indivíduos diabéticos (47,4%); no entanto 46,2% dos indivíduos com genótipo nulo estavam livres da doença ( $p=0,239$ ). Para o gene *GSTT1* observou-se o genótipo nulo em 10 dos indivíduos diabéticos, 52,6%; para os indivíduos não diabéticos e 23,1% não apresentaram a deleção deste gene ( $p=0,08$ ). A relação entre tais genes e o sexo dos indivíduos não apresentou significância estatística.

Figura 1.

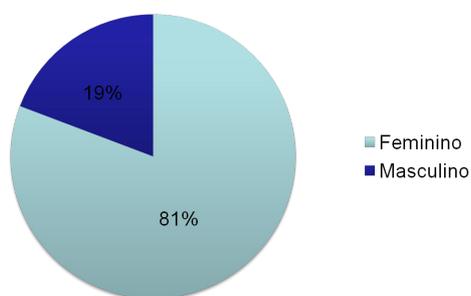


Figura 1. Distribuição do gênero na população estudada.

Figura 2.

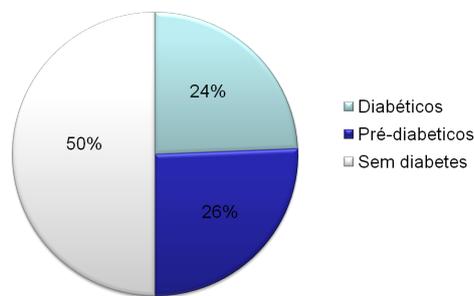


Figura 2. Distribuição do DM2 na população estudada.

Figura 3.

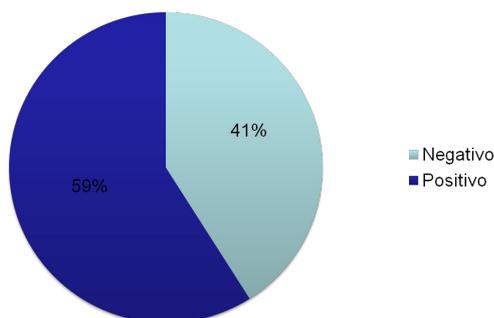


Figura 3. Frequência dos genótipos do gene *GSTM1*.

Figura 4.

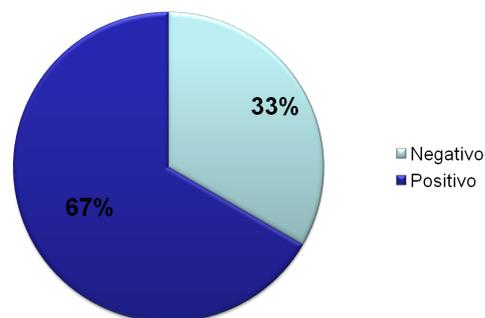


Figura 4. Frequência dos genótipos do gene *GSTT1*.

Em relação aos polimorfismos; existem diversos estudos comprovando a relação existente entre tais genes alterados e o DM2.<sup>13,15,23</sup>

Raza<sup>15</sup> et al afirmam em seus estudos que a deleção do polimorfismo de *GSTT1* e *GSTM1*, tem sido associada ao diabetes tipo 2 e que tais genótipos nulos estão

associados ao desenvolvimento de tal doença.

Em uma meta-análise realizada por Zhang<sup>23</sup> et al, é relatado que tanto o gene GSTT1 como o GSTM1 nulos, são considerados fatores de risco para a evolução do DM.

Na análise feita por Amer<sup>1</sup> et al, observa-se uma considerável significância na frequência de polimorfismos de GSTM1 e GSTT1, sendo  $p=0.003$  e  $p=0.027$  respectivamente, em pacientes portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2 em relação ao grupo controle do trabalho realizado; comprovando mais uma vez a associação do polimorfismos destes genes com DM.

Em um estudo realizado na população Iraniana, aponta que o polimorfismo de deleção do gene GSTT1 aumenta a suscetibilidade ao *Diabetes mellitus* tipo 2; esclarecendo também que há uma maior frequência de genótipos nulos em indivíduos com a patologia adquirida em comparação a pessoas saudáveis<sup>11</sup>.

Para Pinheiro<sup>14</sup>, em seu trabalho realizado com 120 indivíduos diabéticos consegue apresentar, também, a associação do polimorfismo de GSTT1 e o DM2, apresentando um resultado significativo de  $p<0,01$ ; porém para a deleção de GSTM1, não apresentou um resultado de significância sugerindo maiores estudos para que se possa determinar esta associação.

Já em um estudo realizado na população turca a respeito da deleção de GSTM1, Yalin<sup>21</sup> et al. afirma que este polimorfismo seria de grande importância para a identificação de uma predisposição ao *Diabetes mellitus* tipo 2.

Outros trabalhos também apontam esta associação do polimorfismo, seja do gene GSTT1 ou GSTM1, por vezes de ambos os genes; ao *Diabetes mellitus* tipo 2, como por exemplo o de Burin<sup>5</sup>, o de Colombo<sup>7</sup> e D'Alo<sup>8</sup>, entre outros.

Sabendo que a DM pode acarretar uma série de complicações, uma meta-análise sugere que há um risco significativamente aumentado para nefropatia diabética para o genótipo nulo GSTM1, bem como a combinação de alelos nulos para GSTM1 e T1<sup>13</sup>.

Yang<sup>22</sup> et al ainda afirmam que o genótipo nulo GSTT1 apresentou maior risco de desenvolver nefropatia diabética (OR = 2,18,  $p = 0,004$ ) do que indivíduos com hipertensão.

Além disso, um estudo mexicano relatou que o polimorfismo de deleção de GSTM1 parece estar envolvido com doença renal em estágio final<sup>10</sup>.

A correlação da associação de variáveis clínicas com o polimorfismo GST em pacientes diabéticos mostrou que o genótipo GSTT1-nulo se relaciona com níveis maiores de triglicerídeos e colesterol de muito baixa densidade (VLDL), enquanto o genótipo GSTM1-nulo se correlaciona com um aumento de hemoglobina glicada, glicemia de jejum e sistólica; e níveis pressóricos diastólicos quando comparados ao presente genótipo. Permitindo então dizer que a ausência de GSTM1 e GSTT1 pode contribuir para complicações decorrentes diabetes tipo 2, como dislipidemia (GSTT1), descompensação glicêmica e até mesmo para hipertensão (GSTM1)<sup>14</sup>.

## 4 | CONCLUSÃO

Embora os resultados do presente estudo não tenham atingido significância estatística, notou-se que a deleção de tais genes possui associação do polimorfismo com a susceptibilidade ao DM2 sendo necessário ampliação do tamanho amostral para estudos futuros confirmarem estes achados.

## REFERÊNCIAS

ARMER, M.A.; et al. **Influence of Glutathione S-Transferase Polymorphisms on Type-2 *Diabetes mellitus* Risk.** Gen Mol Research. 10 (4): 3722-3730. Oct, 2011.

ARRUDA, V.R.; et al. **Prevalence of Homozygosity For The Delet Alleles of Glutathione S-Transferase Mu (GSTM1) and Theta (GSTT1) Among Distinct Ethnic Groups From Brazil: Relevance to Environmental Carcinogenesis?** Clin Genet. 54: 210-214. 1998.

BANERJEE, M.; VATS, P. **Reactive Metabolites and Antioxidant Gene Polymorphisms in Type 2 *Diabetes mellitus*.** Red Biol 2. (2014) 170-177. Oct, 2013.

BID, H.K.; et al. **Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 *Diabetes mellitus* in north Indian population.** J Post Med. v. 56, n.3, p.176- 181, 2010.

BURIM, R. V.; et al. **Polymorphisms in Glutathione S-Transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and Cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and Susceptibility to Cirrhosis and Pancreatitis in Alcoholics.** Mut. 19, 291-98. Jul, 2004.

COELHO, M. S.; Silva; D.M.G.V.; Padilha, M.I.S. Representações Sociais do Pé Diabético para pessoas com ***Diabetes mellitus*** tipo 2. Rev. esc. enferm. USP vol.43 no.1. Mar, 2009.

COLOMBO, J.; et al. **GSTT1, GTM1 and CYP2E1 Genetic Polymorphisms in Gastric Cancer and Chronic Gastritis in Brazilian Population.** World J Gastroenterol. 10: 1240-1245. Mai, 2004.

D'ALO, F.; et al. **Polymorphisms CYP1A1 and Glutathione S-Transferase and Susceptibility to Adult Acute Myeloid Leukemia.** Haemat. 89 (6): 664-70. Jul, 2004.

GIEBULTOWICZ, J.; et al. **Blood ALDH1 and GST Activity in Diabetes Type 2 and its Correlation with Glycated Hemoglobin.** Exp Clin Endocrinol Diabetes 2014; 122: 55-59. Nov, 2013.

Gutiérrez-Amavizca, B. E.; et al. **Contribution of GSTM1, GSTT1, and MTHFR polymorphisms to end-stage renal disease of unknown etiology in Mexicans.** Indian journal of nephrology. v. 23, n. 6, p. 438–43. Nov-dez, 2013.

MOHAMMADHOSAIN, et al. **“Evaluation of glutathione S-transferase T1 deletion polymorphism on type 2 *Diabetes mellitus* risk in Zoroastrian females in Yazd, Iran.”** Indian journal of endocrinology and metabolism. 19 (1): 124-8. Jan-Feb, 2015.

OLIVEIRA, G.C. et. al. **Functional capacity in patients with *Diabetes mellitus* in Matinhos city, Paraná.** Fisioter. Pesqui. vol.19 no.4. Oct.-Dec, 2012.

Orlewska, J.; Orlewska, E. **Effects of genetic polymorphisms of glutathione S354 transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) on the risk of diabetic nephropathy: A meta analysis.** Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej. v. 125, n. 9, p. 649–658. Ago, 2015.

Pinheiro, D.S.; et al. **Evaluation of Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Deletion Polymorphisms on Type-2 *Diabetes mellitus* Risk.** P One. 8(10): e76262. Out, 2013.

RAZA, S.T.; et al. **Association of Glutathione S-transferase (GTM1 and GSTT1) and FTO Gene Polymorphisms With Type 2 *Diabetes mellitus* Cases in Northern India.** BJMG. 17(1) 47-54. Dez, 2014.

REIS, A. A. S.; et al. **The Implications of Genetic Polymorphism of GST Gene in The Pathogenesis of Type 2 *Diabetes mellitus*.** Rev Un Vale do R V. Três Corações. V.9,n.2, p.92-100. Ago-Dez, 2011.

ROCHA, A.P.; et al. **Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide.** Arq Bras Endocrinol Metab. vol.51, n.5, pp.723-730. Jul, 2007.

SILVA, C.B.; et al. **Comparison of the Walked Distance in Three Modalities of Six-Minute Walk Test With Predictive Equations.** ASSOBR Cien. 3(3):19-29.Dez, 2012.

WANG, G. ZHANG, L. LI, Q. **Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and NQO1 genes and *Diabetes* risk in chinese population.** Bioc and Bioph R Com. v.341,p. 310- 313. Mar, 2006.

World Health Organization – **Genetics and *Diabetes*.** Acessado em: 26 agosto, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/genomics/about/Diabetis-fin.pdf>>.

YALIN, S.; et al. **Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms in Turkish Patients With *Diabetes mellitus*.** Cell Biochem Funct 25: 509 – 13. Set-Out, 2007.

Yang, Y.; et al. **Glutathione S-transferase T1 deletion is a risk factor for developing end-stage renal disease in diabetic patients.** Int J Mol Med, v. 14, n. 5, p. 855–859. Nov, 2004.

ZHANG, J.; et al. **Null Genotypes of GSTM1 and GSTT1 Contribute to Increased Risk of *Diabetes mellitus*: a Meta-Analysis.** Gen. 518: 405-11. Abr, 2013.

## CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA

### **Dalila Bernardes Leandro**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
– Programa de Pós-Graduação em Genética.  
Recife/PE

### **Jessyca Kalynne Farias Rodrigues**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
– Graduação em Biomedicina. Laboratório de  
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Recife/PE

### **Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
– Programa de Pós-Graduação em Genética.  
Recife/PE

**RESUMO:** A técnica de CRISPR/cas9 (Agrupamentos regularmente interespaciaados de pequenas repetições palindrômicas associados à endonuclease Cas9) é relativamente recente e tem se mostrado muito promissora para edição do DNA de vários organismos. O sistema CRISPR/Cas9 foi descrito originalmente como “sistema imune adaptativo” de alguns procaríotos, defendendo estes de vírus e plasmídeos invasores. Esta técnica permite a clivagem específica de uma determinada região da dupla cadeia de DNA com grande eficiência, permitindo assim, a inserção ou deleção de sequências de DNA alvo. Recentemente sua aplicabilidade foi estendida à edição gênica. Este trabalho tem como objetivo revisar alguns aspectos da tecnologia CRISPR/Cas9,

descrevendo sua importância e utilização como ferramenta de edição do DNA. A técnica CRISPR/Cas9 promete grandes avanços na terapia gênica e no tratamento contra infecções de alguns patógenos. Sua capacidade de edição do DNA possibilita remover genes causadores de uma determinada anomalia ou até mesmo, substituí-los por genes saudáveis. Além disso, pesquisas apontam para a possibilidade do uso desta tecnologia na produção de modelos animais de estudo, plantas transgênicas, tratamento de doenças genéticas hereditárias, terapia do câncer, entre outros. Outra aplicação abordada neste trabalho, é sua utilização na remoção do provírus em pessoas infectadas pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agindo principalmente nos reservatórios virais. Contudo, apesar de uma técnica extremamente inovadora, a CRISPR/Cas9 ainda requer grandes estudos com o intuito de avaliar seus efeitos a longo prazo tanto no indivíduo quanto em sua linhagem germinativa e garantir que não ocorra uma clivagem inespecífica do DNA.

**PALAVRAS-CHAVE:** CRISPR/Cas9, Terapia Gênica, ferramenta de edição do DNA.

**ABSTRACT:** The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with the Cas9 endonuclease) technique is relatively recent and has been promising for DNA editing of several organisms.

CRISPR/Cas9 system was originally described as an adaptive immune system of some prokaryotes, due to the defense against invasive viruses and plasmids. This technique allows the specific cleavage of a specific region of the double strand of DNA with great efficiency, thus allowing the insertion or deletion of DNA target sequences. Its applicability, recently, has been extended to genic edition. This study aims to review some aspects of CRISPR/Cas9 technology, describing its importance and use as a DNA editing tool. The CRISPR/Cas9 technique promises great advances in gene therapy and in treatment of some pathogens infections. The CRISPR/Cas9 ability to edit DNA makes it possible to remove genes that cause a particular anomaly or even replace them with healthy genes. In addition, researches indicates the possibility of to use this technology in production of animal models, transgenic plants, treatment of hereditary genetic diseases, cancer therapy, and others applications. Another application discussed in this paper is the use of CRISPR/Cas9 in the removal of provirus in people infected with HIV (Human Immunodeficiency Virus), acting mainly in viral reservoirs. However, despite an extremely innovative technique, CRISPR/Cas9 technology still requires large studies in order to evaluate their long-term effects in both individual and germ line and to ensure that a nonspecific DNA cleavage does not occur.

**KEYWORDS:** CRISPR/Cas9, Gene Therapy, DNA editing tool.

## 1 | INTRODUÇÃO

CRISPR/Cas9 é uma promissora ferramenta de edição do DNA que permite clivar especificamente uma determinada região da dupla cadeia de DNA com maior rapidez, eficiência, relativa facilidade de manipulação e baixo custo quando comparada a técnicas anteriormente utilizadas como ZFNs (*Zinc-finger nucleases*) ou TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). O sistema CRISPR/Cas9 é um conjunto formado por uma endonuclease denominada Cas9, cuja função é cortar a dupla cadeia de DNA em um local específico, e uma sequência de RNA que age como um guia, direcionando a endonuclease para o local onde deve ocorrer a clivagem (SHUI et al., 2016).

Naturalmente, CRISPR/Cas9 faz parte do “sistema imune adaptativo” de alguns procariotos, defendendo estes de vírus ou plasmídeos invasores. Assim, provavelmente sua eficácia advém do fato de que este não foi um sistema criado em laboratório mas, um sistema naturalmente desenvolvido e aprimorado ao longo da evolução por bactérias e archaeas, ou seja, resultado milhões de anos de adaptação (SHUI et al., 2016).

Esta ferramenta promete avanços promissores em terapia gênica, sendo capaz de corrigir falhas genéticas no DNA, editando-o. Através desta técnica, é possível, por exemplo, remover genes causadores de uma determinada anomalia e substituí-los por genes saudáveis. Estudos recentes apontam para a possibilidade de uma utilização futura desta tecnologia em casos como, correção da distrofia muscular de Duchenne, ou silenciamento de genes específicos do *Aedes aegypti* (LI et al., 2015; LONG et al., 2016; JUPATANAKUL et al., 2017).

Outro exemplo de aplicação bastante interessante é o uso do complexo CRISPR/Cas9 para remoção do genoma viral inserido no genoma do hospedeiro em pessoas infectadas pelo HIV (provírus), agindo principalmente nos reservatórios virais onde antirretrovirais não atuam efetivamente. Estima-se que tal reservatório de células latentes infectadas pode permanecer neste estado por décadas, constituindo a maior barreira para a cura efetiva da infecção pelo HIV. Assim, avaliar novas estratégias promissoras que busquem solucionar este problema, é imprescindível (JEROME, 2016).

Porém, apesar de uma técnica extremamente inovadora, interessante e promissora, ainda são necessários maiores estudos para avaliar, principalmente os efeitos a longo prazo da utilização do sistema CRISPR/Cas9 na edição de genomas humanos (WANG et al., 2016).

## 2 | OBJETIVO

Apresentar a tecnologia CRISPR/Cas9 descrevendo sua importância e crescente utilização como ferramenta de edição do DNA, bem como suas principais aplicabilidades.

## 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Técnicas de edição do genoma

A terapia gênica é baseada no princípio da manipulação genética de RNA ou DNA para a prevenção e tratamento de doenças humanas. Esta abordagem permite inserir, deletar, substituir ou silenciar genes, e diferentes técnicas podem ser empregadas. A primeira técnica de edição gênica amplamente utilizada foi baseada no uso das endonucleases de restrição FokI, denominadas *Zinc-finger nucleases* (ZFNs) (BHAKTA et al., 2013; CATHOMEN; JOUNG, 2008; GONZALEZ et al., 2010; KIM et al., 2011; KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996; TOWNSEND et al., 2009; WOOD et al., 2011).

Em seguida, com uma abordagem não muito diferente, foram desenvolvidas as Nucleases Efetoras Ativadoras de Transcrição (TALENs) (BOCH et al., 2009; BRIGGS et al., 2012; CERMAK et al., 2011; DENG et al., 2012; KIM et al., 2013; MOSCOU; BOGDANOVA, 2009; REYON et al., 2012; SCHMID-BURGK et al., 2013). E recentemente, foi descoberto o sistema CRISPR/Cas9, que forneceu uma alternativa para ZFNs e TALENs na edição de genomas (PENNISI, 2013). Quanto a função, os três sistemas são similares, pois todos são capazes de induzir quebras na dupla fita de DNA direcionadas que ativam vias de resposta a este dano, permitindo alterações personalizadas do genoma. Porém, quanto ao modo de ação, o sistema CRISPR/Cas9 age de forma bastante diferente dos dois anteriores (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Em ambos, ZFNs e TALENs, as proteínas precisam ser construídas para clivar especificamente uma dada região do DNA alvo. Ou seja, a cada região que se objetiva

editar, será necessário todo o processo de engenharia, seleção e validação de tais proteínas. Porém, o sistema CRISPR/Cas é muito mais simples, já que, sempre será utilizada a mesma endonuclease para cortar a dupla fita de DNA, a Cas. O que sofrerá modificação, de acordo com a região específica a qual se tencione clivar, será o RNA guia (gRNA), uma sequência simples de RNA que é desenhada para ser exatamente complementar a região do genoma a qual se deseja editar. Assim, esta sequência será responsável por guiar a endonuclease até a região correta, sendo sua construção relativamente barata, simples e rápida. Como apenas o RNA programável é necessário para gerar especificidade de seqüência, o CRISPR/Cas9 é facilmente aplicável e menos dispendioso de tempo e custo (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Assim, a principal vantagem do sistema CRISPR/Cas9 é esta simplicidade, comparando às ZFNs ou TALENs, nas quais a engenharia é muito mais complexa, demorada e dispendiosa. Além disto, outro fator fundamental a se considerar, é que o sistema CRISPR/Cas9 possibilita o uso de vários gRNAs com diferentes alvos, permitindo modificações genéticas simultâneas em múltiplos sítios alvos diferentes (CONG et al., 2013).

Outra particularidade do sistema CRISPR/Cas é que, apesar de aprimorado em laboratório, é proveniente do sistema natural de defesa bacteriano, portanto, resultado de milhares de anos de evolução. O que faz dele, um sistema muito seguro e intensamente testado pela natureza (WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Existem diferentes tipos de sistema CRISPR/Cas que utilizam diferentes proteínas Cas e moléculas de gRNA, podendo ser divididos em duas classes principais, classes 1 e 2. O sistema de classe 1 refere-se à utilização de múltiplos complexos protéicos para a edição, enquanto que o sistema de classe 2 refere-se ao uso de uma única nuclease. Estas classes ainda podem ser subdivididas em diferentes tipos de acordo com as proteínas específicas que são usadas. Por exemplo, no sistema de classe 2 tipo V é utilizada a nucleasse Cpf para realizar a clivagem, enquanto que o tipo II utiliza a Cas9. Porém, dentre todos os sistemas, CRISPR/Cas9 é o mais bem caracterizado e, portanto, amplamente utilizado (MAKAROVA et al., 2011; WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Além da Cas9 e do gRNA, este sistema necessita de um terceiro elemento; uma pequena sequência de nucleotídeos denominada Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM) que auxilia o reconhecimento do local de clivagem. Outra peculiaridade é que o gRNA, apesar de ser uma sequência contínua, é formado por duas regiões com funções bem distintas. Existe uma parte que se liga a endonuclease, CRISPR RNA (crRNA), enquanto a outra parte da sequência, o crRNA trans – ativador (tracrRNA), irá direcionar a Cas9 para a região específica de interesse no genoma ou na sequência de DNA. Esta interação entre o complexo Cas9/gRNA com a sequência de DNA alvo, promove a alteração conformacional na Cas9 capaz de ativar a endonuclease, induzindo a quebra da dupla fita de DNA (JINEK et al., 2012).

O aparecimento destas técnicas de edição do genoma tem contribuído para o

estudo e possível tratamento de várias doenças, tanto virais quanto genéticas, como será apresentado ao longo deste trabalho. Porém, muitos são os problemas que necessitam ser resolvidos até que se consiga aprimorar estas técnicas de edição de genoma suficientemente para sua aplicação segura em seres humanos (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

## 3.2 Principais aplicabilidades do sistema CRISPR/Cas9

### 3.2.1 Desenvolvimento de modelos animais de estudo

Um campo de estudo onde se observa uma crescente utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 é em modelos animais de estudo. Esta ferramenta tem permitido promover modificações no genoma em linhagens germinais de diversos modelos animais como mosca das frutas, zebrafish, nematódeos, sapos, salamandras e até organismos mais complexos como porcos e macacos. Em camundongos, esta técnica tem sido amplamente utilizada com o intuito de gerar modelos murinos humanizados (a partir da inserção de genes humanos) o que possibilita estudos mais aprofundados, com uma resposta mais próxima do que seria observado em humanos. Assim, esta tecnologia permitiu enormes avanços no campo da biologia experimental que poucos anos atrás, seriam impensáveis (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). A partir do contínuo aprimoramento da técnica, é possível observar o crescente aumento da eficácia da edição gênica nestes modelos animais. Como exemplo, podemos analisar o estudo de Bassett e colaboradores (2013), no qual foi utilizado um sistema CRISPR/Cas9 melhorado baseado em injeção de RNA, que foi altamente eficiente para criar a mutagênese desejada no genoma de *Drosophila melanogaster*. Neste experimento, através da injeção direta do gRNA e de mRNA de Cas9 no embrião, os pesquisadores induziram mutagênese nos locais-alvo em até 88% das moscas injetadas. Além disto, as mutações geradas foram transmitidas de forma estável para 33% da prole total através da linhagem germinativa. Este são resultados bastante promissores no que concerne a modificações gênicas em modelos animais, quando comparado as técnicas anteriores utilizadas para este fim (BASSETT et al., 2013). Assim, a tecnologia CRISPR/Cas9 representa uma maneira rápida e fácil de gerar animais geneticamente modificados, principalmente em modelos murinos, promovendo um avanço significativo de achados imunológicos, ramo de pesquisa altamente dependente de modelos animais sofisticados (HOCHHEISER et al., 2018).

### 3.2.2 Tratamento de algumas doenças

Além do uso da tecnologia CRISPR/Cas9 em modelos animais, outra relevante área onde a aplicação deste sistema vem sendo avaliado, é no tratamento de algumas doenças. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de uma utilização futura

desta tecnologia em várias doenças hereditárias e infecciosas por meio de diferentes abordagens. Como, por exemplo, a correção da distrofia muscular de Duchenne (LI et al., 2015; LONG et al., 2016), manipulação de genes específicos do *Aedes aegypti* (JUPATANAKUL et al., 2017), doenças hematológicas (CANVER et al., 2015; LIU et al., 2017), tratamento da infecção pelo HIV (EBINA et al., 2013), entre outros. Citaremos algumas destas utilizações ao longo deste texto.

### 3.2.2.1 Doenças genéticas hereditárias

Algumas aplicações da tecnologia CRISPR/Cas9 com relevância para a saúde humana incluem a capacidade de corrigir mutações genéticas responsáveis por doenças hereditárias. Alguns exemplos que serão abordados no texto, onde o uso desta técnica vem sendo avaliado com tal propósito, são no tratamento de anemia falciforme, distrofia muscular de Duchenne, fibrose cística e algumas doenças oculares.

Dois estratégias têm sido utilizadas para o tratamento da anemia falciforme usando o sistema CRISPR/Cas9: a correção da mutação que ocasiona a doença ou a indução da expressão de hemoglobina fetal (HbF). Na correção da mutação, a abordagem utilizada é o uso do sistema CRISPR/Cas9 para alteração de células-tronco hematopoiéticas que após a modificação são transplantadas para o paciente (DEVER et al., 2016). Já a segunda estratégia, indução da expressão de HbF, envolve o BCL11A, um regulador transcricional que age como um forte silenciador deste tipo de hemoglobina. Assim, a supressão de BCL11A por meio do sistema CRISPR/Cas9, pode levar ao aumento na produção de HbF, sendo, portanto, uma possível estratégia no tratamento da anemia falciforme (CANVER et al., 2015; LIU et al., 2017). Já as abordagens utilizadas para tratar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) incluem: correção de mutações pontuais, remoção completa do éxon alterado ou ainda a restauração do quadro de leitura (EL REFAEY et al., 2017; LI et al., 2015; ZHU et al., 2017). Recentemente, Li et al. (2015) demonstraram a correção precisa da distrofia muscular de Duchenne em células-tronco pluripotentes induzidas humanas (iPSC) com o uso das tecnologias de edição gênica TALEN e CRISPR/Cas9 (LI et al., 2015).

No que concerne a outras patologias, estudos envolveram o uso da tecnologia CRISPR/Cas9 mediada por HDR no tratamento da Fibrose Cística (FC), e apresentaram resultados promissores. Tais estudos objetivavam corrigir em iPSCs, a mutação DF508 no gene CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) presente em 90% dos pacientes com FC (FIRTH et al., 2015).

Nas doenças oculares, a catarata foi o primeiro distúrbio editado pelo sistema CRISPR/Cas9 para fins terapêuticos. Wu e colaboradores (2013) corrigiram uma mutação dominante no gene *Crygc*, em camundongos, via modificação de alelos mutantes, mediada por recombinação homóloga direta (HDR). Além desta, outras patologias como Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), Distrofia Corneana Epitelial de Meesmann (MECD), e Retinite Pigmentosa (RP) vem sendo estudadas e avaliadas quanto a possível utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 para

seus respectivos tratamentos (PEDDLE; MACLAREN, 2017).

### 3.2.2.2 Combate às infecções virais

Dentre as muitas outras pesquisas que envolvem o uso da tecnologia CRISPR/Cas9, podemos destacar o trabalho de combate à transmissão da dengue desenvolvido por pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (Unesp). Este estudo identificou, no mosquito *Aedes aegypti*, genes que podem estar ligados à resistência a dengue. E a partir da tecnologia CRISPR/Cas9, objetivaram inserir genes mutantes em outros *Aedes aegypti* que não possuem esta resistência. Este tipo de pesquisa pode impactar futuramente o campo da saúde pública, uma vez que diminuiria os casos de dengue, caso a tecnologia fosse empregada (JUPATANAKUL et al., 2017).

Outra importante virose para a qual tal sistema CRISPR/Cas9 é cogitado como uma estratégia de tratamento, é a infecção pelo HIV. Neste contexto, duas diferentes estratégias estão sendo avaliadas na tentativa de combater tal infecção. A primeira abordagem consiste no uso de células-tronco hematopoiéticas modificadas (HSC) derivadas de medula óssea ou sangue periférico com o intuito de desativar genes do hospedeiro que sejam necessários ao vírus. Em um estudo de 2014, pesquisadores utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 com RNA guia desenvolvido para interromper eficientemente o gene *CCR5* em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras (MANDAL et al., 2014). Assim, este sistema poderia gerar camundongos transplantados que são funcionalmente resistentes à infecção por um HIV R5 trópico. Até agora, esta abordagem tem sido usada apenas em laboratório em modelos animais. Porém, sua aplicabilidade é inviável, em particular para uma grande população de indivíduos HIV positivos. Além dos efeitos colaterais, procedimento complexo e alto custo do transplante autólogo, outra grande limitação é o potencial escape viral da restrição de entrada baseada no *CCR5* (DIDIGU et al., 2014).

Já a segunda estratégia envolve o provírus, estado no qual o genoma viral (HIV) se encontra integrado ao genoma do hospedeiro em uma condição de latência. Neste caso, o alvo é o próprio DNA viral integrado, onde se objetiva promover mutações no genoma viral integrado capazes de silenciar o vírus, ou ainda, remover o vírus pela clivagem do provírus de células infectadas. Como exemplo, podemos citar o uso recente do sistema CRISPR/Cas9 para remover todo o genoma do HIV-1, abrangendo as LTRs 5' e 3' completas do DNA proviral integrado. Foram utilizadas células TCD4+ humanas infectadas pelo HIV-1 proviral nas quais foi aplicada a tecnologia CRISPR/Cas9. A técnica foi considerada segura neste experimento, uma vez que não foram observados efeitos fora do alvo (KAMINSKI et al., 2016). Além disto, a excisão do DNA proviral não provocou nenhum efeito deletérico significativo na saúde celular nos vários índices avaliados, como, viabilidade celular, progressão do ciclo celular e apoptose. Outro ponto extremamente importante foi a expressão contínua do gRNA e Cas9 nestas células T, onde o HIV-1 foi eliminado, que mostrou proteção contra novas infecções pelo HIV-1 quando desafiadas (HU et al., 2014; LIAO et al., 2015). Além

disto, CRISPR/Cas9 também foi usado com sucesso para ativar células infectadas em estado latente com o objetivo de promover uma melhor detecção dessas células pelo sistema imune efetor (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Atualmente, não existem ensaios clínicos em andamento CRISPR/Cas9 como intervenção terapêutica anti-HIV. Isto não é surpreendente, dado o difícil processo e rede reguladora em torno da aprovação para a execução de um ensaio clínico. No entanto, todos estes estudos pré-clínicos demonstram a importância desta abordagem como ferramenta para uma possível intervenção terapêutica anti-HIV (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; WANG et al., 2014). Além disto, outro ponto de resistência ao uso desta tecnologia em tratamentos que envolvam o HIV é a grande capacidade mutacional do vírus. No intuito de reduzir este escape viral, uma nova abordagem utilizada é a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 multiplex, no qual múltiplos gRNAs são direcionados para diferentes regiões conservadas do genoma viral (TER BRAKE et al., 2006).

É importante ressaltar que, especificamente para o tratamento do HIV, esta é uma alternativa bastante promissora, pois representa a remoção do provírus integrado ao genoma do hospedeiro presentes no reservatório em estado de latência. Problema que, sem dúvida, representa a maior barreira para a cura definitiva do HIV/AIDS, para o qual ainda não foi encontrada nenhuma solução viável (EBINA et al., 2013).

Além destes dois exemplos, estratégias CRISPR/Cas9 também foram aplicadas a vários outros patógenos virais, incluindo Papilomavírus Humano (HPV), Vírus da Hepatite B (HBV), alguns tipos de Herpesvírus, John Cunningham Vírus (JC) e Vírus da Hepatite C (HCV) (MOLLANOORI; TEIMOURIAN, 2018; SOPPE; LEBBINK, 2017), apresentando resultados promissores.

### *3.2.2.3 Terapia do câncer*

Outra abordagem que tem sido avaliada é a utilização do sistema CRISPR/Cas para o tratamento de determinados tipos de câncer. O câncer inclui alterações complexas com múltiplas mutações, translocações, perdas e ganhos cromossômicos. Assim, a habilidade de identificar e corrigir tais mutações é um objetivo importante em seu tratamento. Neste contexto, o sistema CRISPR/Cas tem mostrado um potencial promissor para atuar nesta correção. Vários cientistas, em todo o mundo, estão usando tal sistema para abordar o tratamento de variados tipos de câncer a partir de diferentes perspectivas de pesquisa (RATAN et al., 2018).

Um dos exemplos mais recentes, é a sua utilização para alterar geneticamente receptores de células T (TCRs) com o intuito de que apresentem um maior reconhecimento e maior afinidade a células tumorais. Um dos maiores progressos na imunoterapia personalizada do câncer, foi a produção do receptor de antígeno quimérico (CAR). CARs são proteínas de fusão manipuladas que incorporam um domínio de reconhecimento de antígeno para um alvo específico (isto é, um antígeno de tumor) e um domínio de sinalização de células T. Eles são únicos, pois agem independentemente do complexo principal de histocompatibilidade (ABATE-

DAGA; DAVILA, 2016; RESTIFO; DUDLEY; ROSENBERG, 2012). Na terapia celular autóloga (TART), as células são removidas, projetadas geneticamente para atacar antígenos específicos do câncer alvo, a partir do sistema CRISPR/Cas e, em seguida, transferidas de volta para o paciente (MOLLANOORI; TEIMOURIAN, 2018; ZYCH; BAJOR; ZAGOZDZON, 2018).

Até a presente data, as células T modificadas por CAR foram aplicadas a vários tumores malignos, embora a investigação e aplicação tenham sido mais robustas em malignidades hematológicas de células B. Em 2014, Maude e colaboradores publicaram um estudo crucial em que trinta pacientes foram tratados com células T autotransportadas anti-CD19 com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) recidivante/refratária. Notavelmente, 90% dos pacientes tratados tiveram uma remissão completa (MAUDE et al., 2014). Com este sucesso impressionante, células T CAR foram aplicadas a neoplasias adicionais, incluindo Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e linfomas não-Hodgkin. Recentemente, Turtle e colaboradores (2017) trataram vinte e quatro pacientes de LLC de alto risco, dos quais setenta e um por cento tiveram uma resposta completa ou parcial à terapia e em muitos desses pacientes, nenhuma doença residual foi detectada após tal tratamento (TURTLE et al., 2017). Assim, recentemente, após demonstrar esta significativa eficácia clínica, este novo agente terapêutico foi aprovado pela FDA para o tratamento de DLBCL recidivante/refratária e leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA). No entanto, a possibilidade de efeitos fora do alvo e toxicidade, continuam sendo investigados. Embora a mutagênese insercional não tenha sido observada nas terapias de células T modificadas por CAR até o momento, esta possibilidade existe e deve ser considerada (BEAR et al., 2012; DOTTI et al., 2014; HACKETT et al., 2013).

Valletta e colaboradores (2015), restauraram a função do gene *ASXL1* em uma linhagem de células de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que não expressavam o modificador epigenético ASXL1. O ASXL1 é conhecido como um importante supressor de tumor, no qual mutações, estão envolvidas na patogênese de várias leucemias mielóides. Neste estudo, a partir da correção do gene, foi reestabelecida a expressão normal da proteína e a sobrevivência foi melhorada, em um modelo de xenoinxerto murino utilizando células corrigidas (VALLETTA et al., 2015).

Em 2017, Garcia-Tunon e colaboradores aplicaram a tecnologia CRISPR/Cas9 à LMC positiva para BCR/ABL e demonstraram que poderiam bloquear eficazmente a expressão da variante p210 do gene de fusão BCR/ABL. Isto foi feito utilizando uma linhagem celular de leucemia Boff-p210 e *in vivo*, em modelo murino. Estes são apenas alguns dos muitos exemplos da aplicação da tecnologia CRISPR/Cas em estudos que objetivem o tratamento do câncer, com o crescimento contínuo previsto nos próximos anos (GARCÍA-TUÑÓN et al., 2017).

### 3.2.3 Regulação transcricional

Outro exemplo de aplicação do sistema CRISPR/Cas é na regulação de genes específicos a partir da interrupção de sítios funcionais relacionados à transcrição. Tal sistema é então denominado *CRISPR inference* (CRISPRi), e foi desenvolvido para a regulação da transcrição guiada por RNA (CHENG et al., 2013; GILBERT et al., 2013; QI et al., 2013) a two-component transcriptional activator consisting of a nuclease-dead Cas9 (dCas9. Qi e colaboradores (2013) gerou um mutante Cas9 (dCas9) cataliticamente defeituoso sem atividade de nucleases. Neste caso, o sistema somente reconhece e liga à sequência alvo, gerando um impedimento alostérico que não permite a transcrição, porém, sem clivar tal sequência. Assim, este complexo de reconhecimento, pode interferir no alongamento transcricional, na atividade da RNA polimerase, ou ainda, na ligação de fatores de transcrição (QI et al., 2013). Em um experimento em *Escherichia coli*, utilizando dois gRNAs direcionados, respectivamente, um gene da proteína fluorescente vermelha (RFP) e um gene da proteína verde fluorescente (GFP), foi observado que CRISPRi poderia reprimir simultaneamente a expressão de RFP e GFP. No entanto, em células de mamíferos, o grau de repressão da expressão gênica obtido pelo CRISPRi foi pouco expressivo (QI et al., 2013). Gilbert e colaboradores (2013) também demonstraram que domínios efetores repressivos ou ativadores fundidos com dCas9, juntamente com o gRNA, poderiam desempenhar um controle transcricional preciso e estável dos genes-alvo, incluindo a repressão e ativação da transcrição (GILBERT et al., 2013). Além disto, Cheng e colaboradores (2013) evidenciaram o desempenho do CRISPRi para regular a transcrição tanto em genes individuais como simultaneamente em múltiplos genes. Portanto, o CRISPRi fornece uma nova ferramenta altamente específica para alternar a expressão gênica sem alterar geneticamente a sequência de DNA alvo (CHENG et al., 2013).

### 3.3 Outras aplicações

A partir de uma abordagem diferente, o sistema CRISPR/Cas9, pode também ser utilizado como um marcador de loci específicos em células vivas. A partir do uso de uma proteína dCas9 marcada com proteína fluorescente verde melhorada e um gRNA estruturalmente otimizado, foi possível obter imagens robustas de elementos repetitivos e não repetitivos em telômeros e genes codificadores em células vivas. Esta ferramenta de imagem CRISPR tem o potencial de melhorar as tecnologias atuais para o estudo da dinâmica conformacional de cromossomos nativos em células vivas, principalmente se imagens multicoloridas podem ser desenvolvidas usando múltiplas proteínas Cas9 distintas (CHENG et al., 2013).

Outro uso crescente desta tecnologia é a sua aplicação na área vegetal e de fungos. Neste contexto, ela tem sido utilizada para induzir alterações genômicas desejadas em plantas, objetivando gerar características específicas, como fenótipos valiosos ou resistência a doenças (JIANG et al., 2013; XIE; YANG, 2013). Desde sua

demonstração como uma ferramenta de edição do genoma em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana* esta tecnologia promete mudar o ritmo e o curso da pesquisa agrícola (LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013). Jiang e colaboradores (2013) realizaram experimentos onde, o gene da proteína de fluorescência verde, foi transferido para o genoma da *Arabidopsis sp.* e do tabaco, e genes da susceptibilidade à ferrugem bacteriana, para o genoma do arroz (JIANG et al., 2013). Miao e colaboradores (2013) demonstraram a robustez e eficiência do CRISPR/Cas9 na edição do genoma do arroz, onde a modificação eficaz nos genes-alvo ocorreu em aproximadamente 50% das células embriogênicas que receberam as estruturas de gRNA e Cas9 (MIAO et al., 2013; ZHANG; WEN; GUO, 2014). Além disso, essas mudanças genéticas foram passadas para a próxima geração de plantas sem nova mutação ou reversão, e o sequenciamento do genoma completo não revelou nenhuma edição fora do alvo. Tais estudos sugerem que a modificação dos genomas de plantas pode fornecer proteção contra doenças e resistências de forma segura e simples. As implicações regulatórias do uso da tecnologia CRISPR-Cas9 em plantas ainda não estão claras e dependem do tipo de mutação a ser introduzida (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014), fazendo-se necessários maiores estudos com o intuito de elucidar tais questões.

### 3.4 Discussões éticas

Como foi possível perceber, o número de aplicações potenciais da tecnologia CRISPR/Cas9 é muito amplo. No entanto, sua aplicabilidade, na maioria dos casos, principalmente no que tange à utilização terapêutica desta tecnologia, ainda permanece altamente controversa. Primeiro, porque ainda não está definido o quão segura esta técnica é, principalmente no que diz respeito aos potenciais efeitos fora do alvo. Em segundo lugar, existem várias questões éticas associadas à terapia gênica mediada por CRISPR/Cas9, como: Qual será o limite entre defeitos genéticos que devem ser corrigidos e anomalias genéticas, que permanecem sem tratamento? Quais serão as consequências e efeitos a longo prazo da correção de mutações patogênicas, no contexto dos antecedentes genéticos individuais dos pacientes? Devem ser permitidas modificações do genoma em zigotos ou embriões humanos, que afetarão somente suas células somáticas, ou também aquelas que poderão ser transmitidas à linhagem germinativa? (HOCHHEISER et al., 2018).

Outro ponto, extremamente preocupante, é a possibilidade de gerar mutações fora do alvo, a partir da edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9. Genomas grandes geralmente contêm múltiplas seqüências de DNA que são idênticas ou altamente homólogas às seqüências de DNA alvo, que podem ser erroneamente clivadas, levando a mutações em locais indesejados. Tais mutações podem resultar em morte ou drástica transformação celular. Assim, com o intuito de solucionar este problema, garantindo uma maior especificidade do sistema CRISPR/Cas9, o ideal é selecionar locais de destino com o menor número de locais fora do alvo possíveis.

Xiao e colaboradores (2014) recentemente, desenvolveram uma ferramenta de busca flexível, a CasOT (*Cas Off-Target sites*), que possibilita a identificação de potenciais locais fora do alvo em genomas inteiros. No entanto, vários pesquisadores estão estudando diferentes métodos para superar este obstáculo e, assim, tornar a utilização do sistema realmente segura (XIAO et al., 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Ainda associado a este problema, existe a dificuldade do desenvolvimento de um método de entrega do sistema CRISPR/Cas que seja totalmente eficaz em organismos multicelulares com sistemas mais complexos. Algumas técnicas baseadas em injeção de DNA e RNA vêm sendo utilizadas para distribuição do sistema, tais como injeção de plasmídeos expressando Cas9 e gRNA (GRATZ et al., 2013) ou injeção direta de tais componentes CRISPR/Cas9 (BASSETT et al., 2013; YU et al., 2013). A eficiência destes métodos de entrega dependem dos tipos de células e do tecido alvo. Assim, várias equipes de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de métodos de entrega mais robustos, com o intuito de minimizar tal dificuldade (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

## 4 | CONCLUSÃO

A tecnologia CRISPR/Cas9 revolucionou a engenharia genômica e certamente, foi uma das maiores descobertas para a pesquisa científica do século atual. Embora existissem outras tecnologias de edição do genoma anteriores á descoberta deste sistema, sua simplicidade, precisão e versatilidade são qualidades sem precedentes.

Porém, apesar de uma técnica extremamente inovadora e interessante, a CRISPR/Cas9 ainda requer grandes estudos, pois muitos dos experimentos foram realizados apenas *in vitro*. Portanto, avaliar seus efeitos a longo prazo tanto no indivíduo quanto em sua linhagem germinativa, bem como aprimorar sua capacidade de clivagem específica do DNA alvo, evitando a clivagem “fora do alvo”, e o desenvolvimento de mecanismos de entrega mais eficazes, é imprescindível. Sobrepujados estes obstáculos, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem grande potencial de se tornar a ferramenta de edição de genoma mais confiável, de fácil utilização e baixo custo.

Assim, esforços futuros deverão se concentrar em desenvolver ainda mais a precisão da tecnologia, possibilitando sua utilização com total segurança e eficácia.

## REFERÊNCIAS

ABATE-DAGA, Daniel; DAVILA, Marco L. CAR models: Next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 3, p. 16014, 2016.

BASSETT, Andrew R. et al. Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. **Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 220–228, 2013.

BEAR, Adham S. et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical

trials: Is it time to revise the testing requirements? **Molecular Therapy**, v. 20, n. 2, p. 246–249, 2012.

BHAKTA, Mital S. et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. **Genome Research**, v. 23, n. 3, p. 530–538, 2013.

BOCH, Jens et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 11 dez. 2009.

BRIGGS, Adrian W. et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e117–e117, 1 ago. 2012.

CANVER, Matthew C. et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 192–197, 16 nov. 2015.

CATHOMEN, Toni; JOUNG, J. Keith. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1200–1207, jul. 2008.

CERMAK, Tomas et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p. e82–e82, jul. 2011.

CHENG, Albert W. et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1163–1171, 27 out. 2013.

CONG, Le et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.

DENG, Dong et al. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. **Science**, v. 335, n. 6069, p. 720–723, 10 fev. 2012.

DEVER, Daniel P. et al. CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 384–389, 7 nov. 2016.

DIDIGU, Chuka A. et al. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-1 infection. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 61–69, 2 jan. 2014.

DOTTI, Gianpietro et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. **Immunological Reviews**, v. 257, n. 1, p. 107–126, jan. 2014.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 28 nov. 2014.

EBINA, Hirotaka et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2510, 26 dez. 2013.

EL REFAEY, Mona et al. In Vivo Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Cardiac Function in Dystrophic Mice Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 121, n. 8, p. 923–929, 29 set. 2017.

FIRTH, Amy L. et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. **Cell Reports**, v. 12, n. 9, p. 1385–1390, set. 2015.

GARCÍA-TUÑÓN, Ignacio et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 26027–26040, 2017.

- GILBERT, Luke A. et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 442–451, jul. 2013.
- GONZALEZ, Beatriz et al. Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 791–810, 1 abr. 2010.
- GRATZ, Scott J. et al. Genome Engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 1029–1035, ago. 2013.
- HACKETT, Perry B. et al. Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy. **Translational Research**, v. 161, n. 4, p. 265–283, abr. 2013.
- HOCHHEISER, Katharina et al. CRISPR/Cas9: A tool for immunological research. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 4, p. 576–583, abr. 2018.
- HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, jun. 2014.
- HU, W. et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11461–11466, 5 ago. 2014.
- JEROME, Keith R. Disruption or Excision of Provirus as an Approach to HIV Cure. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 30, n. 12, p. 551–555, dez. 2016.
- JIANG, Wenzhi et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. e188–e188, 1 nov. 2013.
- JINEK, Martin et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.
- JUPATANAKUL, Natapong et al. Engineered Aedes aegypti JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005187, 12 jan. 2017.
- KAMINSKI, Rafal et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22555, 4 abr. 2016.
- KIM, Seokjoong et al. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. **Nature Methods**, v. 8, n. 1, p. 7–7, 1 jan. 2011.
- KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1156–1160, 6 fev. 1996.
- KIM, Yongsub et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 251–258, 17 mar. 2013.
- LI, Hongmei Lisa et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 143–154, jan. 2015.
- LI, Jian-Feng et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, 1 ago. 2013.

- LIAO, Hsin-Kai et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6413, 10 dez. 2015.
- LIU, Yali et al. One-Step Biallelic and Scarless Correction of a  $\beta$ -Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 6, p. 57–67, mar. 2017.
- LONG, Chengzu et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 400–403, 22 jan. 2016.
- MAKAROVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 9 jun. 2011.
- MANDAL, Pankaj K. et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 5, p. 643–652, 6 nov. 2014.
- MAUDE, Shannon L. et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 16, p. 1507–1517, 16 out. 2014.
- MIAO, Jin et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1233–1236, 3 out. 2013.
- MOLLANOORI, Hasan; TEIMOURIAN, Shahram. Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 6, p. 907–914, 28 jun. 2018.
- MOSCOU, Matthew J.; BOGDANOVA, Adam J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1501–1501, 11 dez. 2009.
- NEKRASOV, Vladimir et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 691–693, 1 ago. 2013.
- PEDDLE, Caroline F; MACLAREN, Robert E. The Application of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Retinal Diseases. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 4, p. 533–541, 2017.
- PENNISI, Elizabeth. The CRISPR Craze. **Science**, v. 341, n. 6148, p. 833–836, 23 ago. 2013.
- QI, Lei S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1173–1183, fev. 2013.
- RATAN, Zubair Ahmed et al. CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, p. 175883401875508, 5 jan. 2018.
- RESTIFO, Nicholas P.; DUDLEY, Mark E.; ROSENBERG, Steven A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 4, p. 269–281, 1 abr. 2012.
- REYON, Deepak et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 460–465, 8 maio 2012.
- SCHMID-BURGGK, Jonathan L. et al. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator–like effector genes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 76–81, 16 jan. 2013.
- SHUI, Bing et al. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.
- SOPPE, Jasper Adriaan; LEBBINK, Robert Jan. Antiviral Goes Viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to

Combat Viruses in Humans. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 833–850, out. 2017.

TER BRAKE, Olivier et al. Silencing of HIV-1 with RNA Interference: a Multiple shRNA Approach. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 6, p. 883–892, dez. 2006.

TOWNSEND, Jeffrey A. et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 442–445, 29 maio 2009.

TURTLE, Cameron J. et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 26, p. 3010–3020, 10 set. 2017.

VALLETTA, Simona et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44061–71, 29 dez. 2015.

WANG, Gang et al. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. **Cell Reports**, v. 17, n. 11, p. 2819–2826, 13 dez. 2016.

WANG, Weiming et al. CCR5 Gene Disruption via Lentiviral Vectors Expressing Cas9 and Single Guided RNA Renders Cells Resistant to HIV-1 Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115987, 26 dez. 2014.

WIEDENHEFT, Blake; STERNBERG, Samuel H.; DOUDNA, Jennifer A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331–338, 16 fev. 2012.

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, v. 333, n. 6040, p. 307–307, 15 jul. 2011.

WU, Yuxuan et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, v. 13, p. 659–662, 5 dez. 2013.

XIAO, An et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. **Bioinformatics**, v. 30, n. 8, p. 1180–1182, 15 abr. 2014.

XIE, Kabin; YANG, Yinong. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 1975–1983, nov. 2013.

YU, Z. et al. Highly Efficient Genome Modifications Mediated by CRISPR/Cas9 in Drosophila. **Genetics**, v. 195, n. 1, p. 289–291, 1 set. 2013.

ZHANG, Feng; WEN, Yan; GUO, Xiong. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 1, p. 40–46, 2014.

ZHU, Pei et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Corrects Dystrophin Mutation in Skeletal Muscle Stem Cells in a Mouse Model of Muscle Dystrophy. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 7, p. 31–41, 16 jun. 2017.

ZYCH, Agata O.; BAJOR, Malgorzata; ZAGOZDZON, Radoslaw. Application of Genome Editing Techniques in Immunology. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 4, p. 289–298, 17 ago. 2018.

## POLIMORFISMOS NO GENE DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL2)

### **Carmem Gabriela Gomes de Figueiredo**

Universidade Federal da Paraíba, Escola Técnica de Saúde, João Pessoa-PB

### **Maria Soraya Pereira Franco Adriano**

Universidade Federal da Paraíba, Escola Técnica de Saúde, João Pessoa-PB

### **Claudenice Rodrigues do Nascimento**

Universidade Federal da Paraíba, Escola Técnica de Saúde, João Pessoa-PB

### **Luciane Alves Coutinho**

Universidade Federal da Paraíba, Escola Técnica de Saúde, João Pessoa-PB

### **Marizilda Barbosa da Silva**

Universidade Federal da Paraíba, Escola Técnica de Saúde, João Pessoa-PB

### **Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura**

Universidade de Pernambuco, Instituto de Ciências Biológicas, Recife-PE

**RESUMO:** A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína do sistema imune inato e está envolvida na opsonização, ativação do sistema complemento, remoção de células apoptóticas e modulação da resposta inflamatória através de interação com células produtoras de citocinas. Em humanos esta lectina é codificada pelo gene *MBL2*. Variações nos níveis séricos da MBL estão entre os assuntos mais extensivamente estudados e representam um paradigma que pode ser aplicado a outros genes cujos produtos

desempenham um papel na primeira linha de defesa do hospedeiro. Um dos fatores que geram variações nos níveis séricos, quantidade ou qualidade da molécula, é polimorfismos genéticos no *MBL2* no promotor e no éxon 1. Diversos trabalhos na literatura têm associado a deficiência desta lectina com a propensão a doenças como dengue, otite média, candidíase, doenças cardíacas, lúpus, tuberculose, dentre outras podendo a MBL estar envolvida na patogênese destas. Devido ao importante papel da MBL na resposta imune inicial do hospedeiro, polimorfismos no gene *MBL2* que levam a deficiência da proteína podem ser implicados no curso clínico de doenças. Assim, sendo a MBL um componente do sistema imune e sua deficiência estar associada à propensão a doenças, este trabalho fornece uma visão detalhada sobre o gene da lectina ligante de manose, os polimorfismos genéticos e a correlação com propensão ou não a doenças.

**PALAVRAS-CHAVE:** gene *MBL2*, lectina ligante de manose, polimorfismos genéticos

**ABSTRACT:** The Mannose binding lectin (MBL) is a protein of the innate immune system and is involved in opsonization, activation of the complement system, removal of apoptotic cells and modulation of the inflammatory response through interaction with cytokine-producing cells. In humans this is encoded by the lectin

MBL2. Changes in serum levels of MBL are among the most extensively studied issues and represent a paradigm that can be applied to other genes whose products play a role in the first line of Defense of the host. One of the factors that generate variations in serum levels, quantity or quality of the molecule, is genetic polymorphisms in the promoter and MBL2 éxon 1. Several works in the literature have associated this lectin deficiency with the propensity to diseases such as dengue fever, otitis media, candidiasis, heart disease, lupus, tuberculosis, among others and the MBL be involved in the pathogenesis of these. Due to the important role of MBL in the initial immune response of the host, MBL2 gene polymorphisms that lead to protein deficiency may be involved in the clinical course of disease. So, being the MBL a component of the immune system and your disability to be associated with the propensity to disease, this paper provides a detailed overview on the Mannose binding lectin gene, genetic polymorphisms and the correlation with propensity to disease or not.

**KEYWORDS:** MBL2 gene, mannose binding lectin, genetic polymorphism

## INTRODUÇÃO

A lectina ligante de manose (MBL) é uma proteína do sistema imune inato e está envolvida na opsonização, ativação do sistema complemento, remoção de células apoptóticas e modulação da resposta inflamatória através de interação com células produtoras de citocinas. Em humanos esta lectina é codificada pelo gene *MBL2*.

Em humanos o gene *MBL2* está localizado no braço longo do cromossomo 10 sendo composto por quatro éxons e três íntrons. Variações nos níveis séricos da MBL estão entre os assuntos mais extensivamente estudados e representam um paradigma que pode ser aplicado a outros genes cujos produtos desempenham um papel na primeira linha de defesa do hospedeiro. Um dos fatores que geram variações nos níveis séricos, quantidade ou qualidade da molécula, é polimorfismos genéticos no *MBL2* no promotor e no éxon 1.

Porém, não existe consenso acerca dos níveis normais das concentrações de MBL que constituem níveis plasmáticos aceitáveis. Neste contexto, achados contraditórios na literatura refletem a combinação de diferenças intrínsecas genéticas, ausência de padronização metodológica e interpretação discrepante dos dados. Todavia, as evidências disponíveis, validam as correlações entre certos genótipos e níveis plasmáticos de MBL com infecção, autoimunidade, inflamação, doenças vasculares e metabólicas.

Diversos trabalhos na literatura têm associado a deficiência desta lectina com a propensão a doenças como dengue, otite média, candidíase, doenças cardíacas, lúpus, tuberculose, dentre outras podendo a MBL estar envolvida na patogênese destas. Devido ao importante papel da MBL na resposta imune inicial do hospedeiro, polimorfismos no gene *MBL2* que levam a deficiência da proteína podem ser implicados no curso clínico de doenças.

Assim, sendo a MBL um componente do sistema imune e sua deficiência estar associada à propensão a doenças, este trabalho fornece uma visão detalhada sobre o gene da lectina ligante de manose, os polimorfismos genéticos e a correlação com propensão ou não a doenças.

## O GENE DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE – MBL2

Em muitos animais, existem dois genes para a MBL. Em camundongos, duas formas diferentes de MBL são codificadas por dois genes distintos funcionais conhecidos como *mbl-a* e *mbl-c*, que são posicionadas em diferentes cromossomos, 14 e 19, respectivamente, (WHITE et al, 1994) enquanto que os dois análogos humanos, *MBL1* e *MBL2* estão posicionados próximos um do outro no cromossomo 10 (10q11.2-q21) (SASTRY et al., 1989; GUO et al, 1998). Produtos do *MBL1* e *MBL2* foram detectados em soros de macacos Rhesus, ao passo que nos chimpanzés e no homem, a MBL é codificada somente por *MBL2*, sendo o *MBL1* um pseudogene, que supostamente tornou-se inativo durante a evolução (MOGUES et al., 1996).

Acredita-se que tanto o *MBL1* quanto *MBL2* tenham sido originados por duplicação gênica a partir de um gene ancestral comum (SASTRY et al., 1995). A sequência da proteína e a estrutura do gene da MBL, *MBL2*, foram esclarecidas em 1989 por Taylor e colaboradores e Sastry e colaboradores (TAYLOR et al., 1989; SASTRY et al., 1989).

O gene *MBL2* está localizado no braço longo do cromossomo 10 q11.2-q21 (GUO et al., 1998; GUARDIA; LOZANO, 2003), sendo composto por quatro éxons e três íntrons de 600, 1350 e 800 pb (pares de bases) respectivamente (TAYLOR et al., 1989; TURNER, 2003). Sequenciamento de todo o gene *MBL2* revelou esta região possuir cerca de 10kb (kilobase) incluindo os íntrons (BERNIG et al., 2004).

Cerca de 1kb à montante do éxon 1, existe um éxon adicional denominado '0'. Este éxon não é traduzido em proteína, mas contém um sítio de início de transcrição adicional que pode servir como um início de transcrição alternativa do gene. De fato, presume-se que 10-15% da MBL no soro produzida pelo fígado deriva da transcrição a partir do éxon '0'. Ambas as regiões promotoras dos éxons '0' e 1, possuem uma caixa TATA para a iniciação da transcrição (Figura 1). Em ambos, os sítios de ligação para fatores de transcrição incluem elementos de resposta para IL-6 (citocina pró-inflamatória). Este achado mostrou a base da regulação da síntese de MBL como uma proteína de fase aguda (TAYLOR et al., 1989; SASTRY et al., 1989).

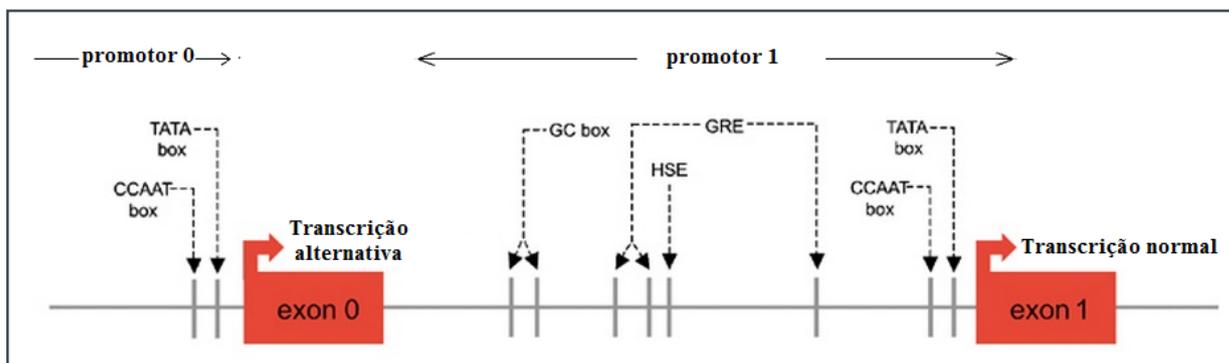


Figura 1. **Gene *MBL2***. Dois promotores, promotor 1 e 0 regulam a transcrição do gene *MBL2* humano. Semelhantemente ao promotor 1, o promotor 0 também inclui TATA para a iniciação da transcrição, e seqüências de DNA de ligação a fatores de transcrição. Fonte: GARRED et al., 2006.

O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região semelhante ao colágeno (sete repetições do motivo rico em glicina), enquanto o éxon 2 codifica o restante da região semelhante ao colágeno. O éxon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como pescoço e o éxon 4 o DRC na região C terminal por meio do qual a MBL se liga à superfície dos patógenos (MADSEN et al., 1995). O DRC contém os sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{++}$  (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992).

## POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2*

Em 1968, um paciente com defeito na fagocitose de partículas de leveduras por deficiência de um elemento do soro foi descrito (MILLER et al., 1968). Subsequentemente descobriu-se que a proteína deficiente era a MBL e esta descoberta impulsionou os esforços na tentativa de descobrir os mecanismos moleculares envolvidos na deficiência da proteína (SUPER et al., 1989).

Sequenciamento dos éxons do gene *MBL2* de três crianças que tinham baixas concentrações séricas de MBL, deficiência fagocítica e que sofriam de infecções recorrentes revelou que cada criança carregava uma mutação de ponto no códon 54 no éxon1, que provocou uma substituição do aminoácido glicina pelo ácido aspártico (GGC para GAC) originando o alelo mutante denominado B, o alelo selvagem é chamado de A (SUMIYA et al., 1991). A investigação dos familiares sugeriu ser uma herança autossômica dominante porque a concentração da proteína diminuiu de cerca de 10 vezes em indivíduos com o genótipo heterozigoto (AB) (KILPATRICK, 2002b).

MBL é considerada uma proteína de fase aguda, seus níveis aumentam durante uma inflamação cerca de 1,5 a 3 vezes (EZEKOWITZ; DAY; HERMAN, 1998; PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001). Sua concentração sérica considerada normal varia bastante indo de 100ng/mL a 10.000ng/mL (TURNER; HAMVAS, 2000) e essa variação depende em grande parte de fatores genéticos, principalmente SNPs do gene que codifica a MBL. Porém, valores abaixo de 100 ng/mL, já caracterizam

deficiência de MBL (GARRED et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011).

Além da determinação genética, fatores hormonais e ambientais também são responsáveis pelos níveis séricos variados de MBL, já que indivíduos com o mesmo genótipo possuem diferenças entre níveis séricos da proteína. Foi verificado que as concentrações séricas da MBL podem ser influenciadas por vários hormônios *in vivo* (SORENSEN et al., 2006). Estudos acerca dessa regulação hormonal da MBL demonstraram que o hormônio do crescimento, a IL-6, e os hormônios tireoidianos T3 e T4 aumentam significativamente a síntese de MBL nos hepatócitos de forma dose-dependente, enquanto que a insulina, o IGF-1 e a hidrocortisona não possuem efeito sobre os níveis de MBL (HANSEN et al., 2001; SORENSEN et al., 2006).

A variação da produção de tais hormônios ao longo da vida pode estar associada com mudanças, de acordo com a idade, nos níveis de MBL (SORENSEN et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2011). Em recém-natos, a concentração da MBL corresponde a 60% da encontrada em adultos (THIEL et al., 1992).

Variações nas concentrações séricas da MBL são atribuídas a mutações de ponto no éxon 1 do gene *MBL2* e a polimorfismos na região promotora. Estas alterações genéticas acarretam defeitos na polimerização da molécula levando à deficiência de função e modificação de taxa de expressão da proteína (TURNER, 2003; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003).

O éxon 1 do gene *MBL2* contém três SNPs no códon 52 (CGT/TGT; Arg/Cys, referido como alelo *D*), códon 54 (GGC/GAC; Gly/Asp, referido como alelo *B*) e códon 57 (GGA/GAA; Gly/Glu, alelo *C*) (SASTRY et al., 1989). Estes SNPs do éxon 1 resultam em regiões de colágeno alteradas as quais impedem a formação da estrutura helicoidal tipo colágeno característica dos peptídeos de MBL, interferindo na oligomerização dos mesmos e na posterior montagem em multímeros, reduzindo assim os níveis circulantes de oligômeros de MBL, forma funcional da molécula (ROOS et al., 2004). Os alelos mutantes *B*, *C* e *D* são comumente designados alelo *O* e o selvagem de alelo *A* (MINCHINTON et al., 2002). Indivíduos que são homocigotos (*O/O*, onde *O* pode ser *B*, *C* ou *D*) para um alelo mutante produzem MBL em quantidades indetectáveis por ELISA (*Enzima Linked Immunoabsorbent Assay*), embora tenha sido documentada uma marcada variação interindividual (MINCHINTON et al., 2002), enquanto os heterocigotos (*A/O*) para a mutação possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados a indivíduos homocigotos (*A/A*) para o alelo selvagem (LIPSCOMBE et al., 1992) (Figura 2).

Todos os três alelos mutantes possuem um efeito dominante nos níveis séricos de MBL, mesmo em heterocigose, diminuem os níveis da proteína funcional em cerca de 90%. Entretanto, o efeito do alelo *D* em heterocigose é menos dramático do que os alelos *B* e *C*. Porém, em homocigose, genótipo *D/D*, ou nos genótipos *BD* e *CD*, os polipeptídeos derivados têm a característica daqueles derivados dos genótipos *AB* e *AC* (GARRED, 2008).

As proteínas MBL variantes são instáveis, facilmente degradadas a formas pouco

oligoméricas (com baixa afeição para seus ligantes e com uma incapacidade de ativar o complemento) e provavelmente possuem um tempo de meia-vida mais curto em circulação (MATSUSHITA; EZEKOWITZ; FUJITA, 1995; NAITO et al., 1999; LARSEN et al., 2004). Isso pode levar não só a função reduzida, mas também a uma redução na concentração absoluta das cadeias polipeptídicas variantes de MBL na circulação (GARRED, 2008).

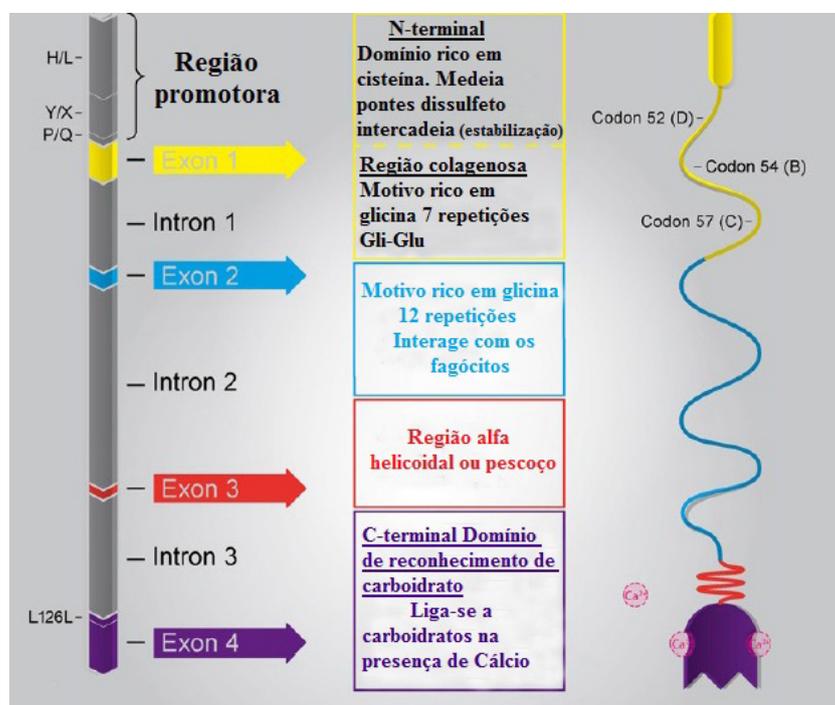


Figura 2. **MBL, do gene à proteína.** Polimorfismos do *MBL2*, a função dos quatro éxons e a configuração do promotor. Fonte: HEITZENEDER et al., 2012.

Trabalhos mostram que os SNPs C52T, G54A e G57A aparecem com diferentes frequências em populações como a dos europeus, asiáticos, africanos sub-saarianos, australianos e americanos. Nestes estudos o alelo *B* foi praticamente inexistente na África Subsaariana e África Ocidental e ocorreu com baixa frequência no norte da África Oriental, mas bastante comum entre os Caucásios (frequência alélica 0,12 – 0,14) e Asiáticos (frequência alélica 0,10 – 2,50). Já para os índios Sul-Americanos a frequência alélica pode exceder 0,50. Em contraste, o alelo *C* é mais frequente nos Africanos Subsaarianos (frequência alélica 0,10 – 0,30), raro entre os Caucásios (frequência alélica <0,03) e ausente entre os Asiáticos. A frequência do alelo *D* é a menor entre os três alelos e parece estar confinada às populações dos Caucásios e do norte da África Oriental (frequência alélica 0,06 – 0,08) (GARRED et al., 1992; MADSEN et al., 1995; LIPSCOMBE et al., 1996; MEAD et al., 1997; MADSEN et al., 1998; TURNER et al., 2000; JULIGER et al., 2002).

No entanto, observa-se uma grande variação dos níveis séricos de MBL dentro de cada genótipo, a qual é causada pela ocorrência de polimorfismos adicionais não-codificantes na região promotora. Sequenciamento do promotor 1 revelou ser esta região altamente polimórfica através de substituições de único nucleotídeo. Duas

posições na região promotora e uma na região 5' não traduzida (UTR), em particular, estão associadas com níveis diferentes de expressão de MBL independente dos alelos variantes do éxon 1 (MADSEN et al. 1995; MADSEN et al., 1998).

Nas posições -550 e -221 da região promotora ocorre a substituição do nucleotídeo G por C originando os alelos H e X respectivamente. Para estes *loci* os alelos selvagens são respectivamente L e Y. Na posição +4 da região 5'UTR ocorre a substituição do nucleotídeo C por T gerando o alelo P (MADSEN et al., 1995; MADSEN et al., 1998). Entre estas três variantes alélicas da região promotora, o *locus* -221, que alberga a variante X, possui maior efeito na diminuição dos níveis séricos da proteína (GARRED, 2008). Os polimorfismos da região do promotor e do éxon 1 estão em desequilíbrio de *linkage* (DL) (HEITZENEDER et al., 2012).

Alelos estão em DL quando existe a associação destes alelos de forma não aleatória em dois ou mais *loci*, não sendo necessária à ocorrência no mesmo cromossomo. Desta forma, o DL revela uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem de maneira mais ou menos frequente numa dada população. Assim, combinações específicas de polimorfismos genéticos de MBL ocorrem na população de maneira não aleatória. Dos vários possíveis haplótipos resultantes dos SNPs da região promotora e do éxon 1 do *MBL2*, apenas sete são comumente encontrados (HEDRICK; KUMAR, 2001). Estes sete haplótipos frequentemente designados secretores são: *HYPA*, *LYQA*, *LYPA*, *LXPA*, *HYPD*, *LYQC* e *LYPB*. A variante H está fortemente ligada com a variante P, e 'X' só ocorre como *LXPA*, portanto, "LY" só é encontrado em associação como alelo 'P' ou 'Q' (GARRED et al., 2006).

Apesar da variabilidade causada pelas variantes nos promotores, dentro de cada grupo genotípico, homocigotos tipo selvagem para o éxon 1 (*A/A*) apresentam os níveis mais altos desta lectina, enquanto que mutantes heterocigotos (*A/O*) têm valores intermediários e mutantes homocigotos (*O/O*) têm níveis bastante reduzidos desta proteína (MINCHINTON et al., 2002, WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

A maioria dos indivíduos com deficiência na MBL é devido à heterocigosidade dos SNPs do éxon 1 e da região promotora, resultando em um amplo espectro de concentrações séricas da proteína, desde níveis indetectáveis a concentrações elevadas como 10.000ng/mL (MADSEN et al., 1998; STEFFENSEN et al., 2000).

Assim, valores abaixo de 100 ng/mL, que caracterizam deficiência de MBL, podem ser encontrados em três situações: genótipos estruturais *O/O*, independentemente do genótipo promotor; genótipos estruturais *A/O*, em combinação com genótipos promotores *HY/LX* ou *LX/LY*; ou no genótipo promotor *LX/LX*. Valores entre 100 ng/mL e 1.000 ng/mL podem ocorrer no genótipo estrutural *A/O* ou nos genótipos promotores *LX/LX* ou *LX/LY*. Já valores acima de 1000 ng/mL estão associados com a MBL tipo selvagem (*A/A*), embora heterocigotos *A/D* possam ocasionalmente chegar a este nível. O genótipo promotor *HY/HY* tipicamente apresenta valores acima de 1500 ng/mL para a MBL tipo selvagem; entretanto, tais valores também podem ocorrer em

outros genótipos promotores. Estudos clínicos têm utilizado os valores de corte de 50 ng/ml ou 100 ng/mL para a definição de deficiência grave de MBL (GARRED et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011).

Desta forma, são considerados possuidores de níveis normais de MBL os haplótipos *HYA / HYA*, *HYA / LYA*, *HYA / LXA*, *LYA / LYA* e *LYA / LXA*. Já os haplótipos *HYA / HYD*, *HYA / LYB*, *HYA / LYC*, *HYA / LYD*, *LYA / HYD*, *LYA / LYB*, *LYA / LYC*, *LYA / LYD* e *LXA / LXA* possuem níveis intermediários da proteína enquanto que os indivíduos com os haplótipos *HYD / HYD*, *HYD / LYB*, *HYD / LYC*, *HYD / LYD*, *LYB / LYB*, *LYB / LYC*, *LYB / LYD*, *LYC / LYD*, *LYD / LYD*, *LXA / HYD*, *LXA / LYB*, *LXA / LYC* e *LXA / LYD* possuem baixos níveis de MBL (LITZMAN et al., 2008).

Assim, a resposta de fase aguda da MBL depende também do componente genético, pois elevada geração de variantes tais como *HYA* pode causar um aumento mais pronunciado dos níveis de MBL, enquanto que mutações na região estrutural não permitem aumentar os níveis desta proteína até os valores normais existentes durante a fase aguda (IP et al., 2004; MINCHINTON et al., 2002, WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a presença de oligômeros de alto peso molecular de MBL também no soro de indivíduos com alelos de MBL variantes (RAJAGOPALAN et al., 2009). Segundo Rajagopalan e colaboradores (2009) a ativação da via da lectina pode estar comprometida em indivíduos homocigotos para os alelos mutantes *MBL/C* e, em menor extensão, *MBL/B*, mas não em indivíduos homocigotos para o alelo *MBL/D*.

Existem dificuldades na comparação dos níveis de MBL entre os diversos estudos em virtude do critério para se considerar deficiência e normalidade ser diferente entre os pesquisadores e também nos testes que são utilizados para determinação dos níveis da proteína. Existem muitos anticorpos anti-MBL e pelo menos dois diferentes métodos de detecção. O método sanduíche detecta MBL usando dois anticorpos, um para captura e um segundo para detecção. Em contraste, o método de captura de manana requer ligação da MBL à manana, que assume o papel do anticorpo de captura no método sanduíche, e a MBL ligada à manana é detectada usando um anticorpo anti-MBL (TAKAHASHI, 2011).

Variações no gene *MBL2* estão entre os assuntos mais extensivamente estudados e representam um paradigma que será aplicado a outros genes cujos produtos desempenham um papel na primeira linha de defesa do hospedeiro. Esta lectina por desempenhar variadas funções na imunidade inata, pode ser um alvo terapêutico para diversas doenças. Mais estudos são necessários para este propósito.

## REFERÊNCIAS

- BERNIG, T.; TAYLOR, J. G.; FOSTER, C. B. *et al.* Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of heterozygosity with evidence of selection. **Genes Immun**, v. 5, n. 6, p. 461–476, 2004.
- EZEKOWITZ, R. A.; DAY, L. E.; HERMAN, G. A. A. Human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. **J. Exp. Med**, v. 167, n. 3, p. 1034-1046, 1998.
- GARRED, P.; MADSEN, H. O.; KURTZHALS, J. A. *et al.* Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. **Eur J Immunogenetics**, v. 19, n. 6, p. 403–412, 1992.
- GARRED, P.; LARSEN, P.; SEYFARTH, J. *et al.* Mannose-binding lectin and its genetic variants. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 85-94, 2006.
- GARRED, P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. **Biochem. Soc. Trans**, v. 36, n. 6, p. 1461-1466, 2008.
- GUARDIA, A.; LOZANO, F. Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. **Rev Med Microbiol**, v. 14, p. 41-52, 2003.
- GUO, N.; MOGUES, T, WEREMOWICZ, S. *et al.* The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10, **Mamm. Genome**, v. 9, n. 3, p. 246-249, 1998.
- HANSEN, T. K.; THIEL, S.; DALL, R. *et al.* GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF-I independent immunomodulatory effect of GH. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5383-5388, Nov. 2001.
- HEDRICK, P.; KUMAR, S. Mutation and linkage disequilibrium in human mtDNA, **Eur. J. Hum. Genet**, v.9, n. 12, p. 969-972, 2001.
- HEITZENEDER, S.; SEIDEL, M.; FÖRSTER-WALDL, E. *et al.* Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter? **Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 22-38, 2012.
- IP, W. K.; TO, Y. F.; CHENG, S. K. *et al.* Serum mannose-binding lectin levels and *mbi2* gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n.3, p. 310-314, Mar. 2004.
- JULIGER, S.; KREMSNER, P. G.; ALPERS, M. P. *et al.* Restricted polymorphisms of the mannose-binding lectin gene in a population of Papua New Guinea. **Mutat Res**, v. 505, p. 87–91, 2002.
- KILPATRICK, D. B. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, p. 401-413, 2002b.
- LARSEN, F., MADSEN, H.O., SIM, R.B. *et al.* Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerisation and activity of the final protein. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 21302-21311, 2004.
- LIPSCOMBE, R. J.; SUMIYA, M.; HILL, A.V. *et al.* High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Gen**, v. 1, p. 709-715, 1992.
- LITZMAN, J.; FREIBERGER, T.; GRIMBACHER, B. *et al.* Mannose-binding lectin gene polymorphic

variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. **Clin Exp Immunol**, v. 153, n. 3, p. 324-30, 2008.

MADSEN, H. O.; GARRED, P.; THIEL, S. *et al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol**, v. 155, p. 3013, 1995.

MADSEN, H. O.; SATZ, M. L.; HOGH, B. *et al.* Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **J Immunol**, v. 161, p.3169-3175, 1998.

MATSUSHITA, M.; EZEKOWITZ, R. A. FUJITA, T. The Gly-54Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. **Biochem.J**, v. 311, p. 1021-1023, 1995.

MEAD, R.; JACK, D.; PEMBREY, M. *et al.* Mannosebinding lectin alleles in a prospectively recruited UK population. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. **Lancet**, v. 349, p 1669–1670, 1997.

MILLER, M.E.; SEALS, J.; KAYE, R. *et al.* A familial, plasma associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection. **Lancet**, v. 2, p. 60-63, 1968.

MINCHINTON, R. M.; DEAN, M. M.; CLARK, T. R. *et al.* Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **Scand J Immunol**, v. 56, p. 630-641, 2002.

MOGUES, T.; OTA, T.; TAUBER, A. I. *et al.* Characterization of two mannose-binding protein cDNAs from rhesus monkey (*Macaca mulatta*): structure and evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 6, p. 543-550, 1996.

NAITO, H.; IKEDA, A.; HASEGAWA, K. *et al.* Characterization of human serum mannanbinding protein promoter. **J. Biochem**, v. 126, n. 6, p. 1004-1012, 1999.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Mol Immunol**, v. 38, p. 133-149, 2001.

PRESANIS, J. S.; KOJIMA, M.; SIM, R. B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 748-752, 2003.

RAJAGOPALAN, R.; SALVI, V. P.; JENSENIUS, J. C. *et al.* New insights on the structural/functional properties of recombinant human mannan-binding lectin and its variants. **Immunology Letters**, v. 123, n. 2, p. 114-124, Apr.2009

SASTRY, K.; HERMAN, G. A.; DAY, L. *et al.* The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **J Exp Med**, v. 170, p. 1175-1189, 1989.

SASTRY, R.; WANG, J. S.; BROWN, D. C. *et al.* Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collectin genes. **Mamm Genome**, v. 6, p. 103-110, 1995.

SORENSEN, C. M.; HANSEN, T. K.; STEFFENSEN, R. *et al.* Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n.1, p. 173-182, Jul. 2006.

STEFFENSEN, R.; THIEL, S.; VARMING, K. *et al.* Detection of structural gene mutations and promoter

polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **J. Immunol. Methods**, v. 241, n. 1 e 2, p.33-42, 2000.

SUMIYA, M.; SUPER, M.; TABONA, P. *et al.* Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, v. 337, p. 1569-1570, 1991.

SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J. *et al.* Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. **Lancet**, v. 2, p.1236-1239, 1989.

TAYLOR, M. E.; BRICKELL, P. M.; CRAIG, R. K. *et al.* Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochem.J**, v. 262, n. 3, p. 763-771, 1989.

TAKAHASHI, K.; CHANG, W. C.; TAKAHASHI, M. *et al.* Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 96-102, Jan.-Feb. 2011.

THIEL, S.; HOLMSKOV, U.; HVIID, L. *et al.* The concentration of C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during the acute phase response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 90, p. 31-35, 1992.

TURNER, M. W.; DINAN, L.; HEATLEY, S. *et al.* Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. **HumMol Gen**, v. 9, p. 1481-1486, 2000.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol Immunol**, v. 40, p. 423-429, 2003.

VASCONCELOS, L. R. S.; FONSECA, J. P. L.; DO CARMO, R. F. *et al.* Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p. 551-557, 2011.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide, **Nature**, v. 360, n. 6400, p. 127-134, 1992.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 9, p. 548-555, Sep. 2005.

WHITE, R. A.; DOWLER, L. L.; ADKINSON, L. R. *et al.* The murine mannose-binding protein genes (MBL1 and MBL2) localize to chromosomes 14 and 19. **MammGenome**, v. 5, p. 807-809, 1994.

## SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS POR ALGORITMO GENÉTICO NA CLASSIFICAÇÃO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA

### **Lucas de Souza Rodrigues**

UFMG, Departamento de Eletrônica  
Belo Horizonte – Minas Gerais

### **Cristina Sady Coelho da Rocha**

UFMG, Hospital das Clínicas  
Belo Horizonte – Minas Gerais

### **Murilo Eugênio Duarte Gomes**

UFMG, Departamento de Eletrônica  
Belo Horizonte – Minas Gerais

**RESUMO:** Este artigo investiga o uso de algoritmo genético na seleção de características para predição de risco de morte de pacientes com doença de Chagas. Um total de 19 características, divididas entre características clínicas, tempo-frequenciais e de dinâmica simbólica foram extraídas a partir de janelas de 5 min das séries de intervalos RR do eletrocardiograma de 150 pacientes. Os dados foram utilizados para distinguir os grupos de pacientes que evoluíram ou não para o óbito, por meio de um modelo construído com máquina de vetores de suporte (SVM) com *kernel* Gaussiano (RBF - *Radial Basis Function*). A seleção de características foi feita por um algoritmo genético que avalia uma população de soluções candidatas ao longo de 100 gerações, realizando uma seleção de pais para um cruzamento das soluções, gerando descendentes e

selecionando as candidatas com melhor taxa de acerto a cada geração. Foram realizados diferentes experimentos variando a quantidade de dados utilizados para treinamento e teste do classificador. Foi possível obter taxas de acerto de 99,53%, 98,86% e 98,80% com 8, 9 e 10 características selecionadas, respectivamente. Estes resultados foram superiores aos obtidos com a seleção empírica realizada em trabalho anterior, o que sugere que a técnica de algoritmo genético pode melhorar o desempenho do classificador de risco de morte de origem cardíaca em pacientes chagásicos.

**PALAVRAS-CHAVES:** Algoritmos Genéticos, Seleção de Características, Máquina de Vetores de Suporte, Classificação, Doença de Chagas.

**ABSTRACT:** This paper investigates the use of genetic algorithm for features selection in predicting death in patients with Chagas disease. A total of 19 features, among clinical data, indices from time and frequency domain, and symbolic dynamics features were extracted from 5-min epochs from RR series of 150 patients. The data was used to distinguish the group of patients who died and the group who did not die, by using a model built with support vector machine (SVM) with radial basis function (RBF) kernel. The features selection was made by a genetic algorithm that evaluates a population of candidate solutions over 100 generations,

doing selection of parents to do crossover and breed offspring, then selecting the best solutions, with the highest accurate rate. Different experiments were performed changing the amount of data used to train and test the classifier. There were achieved accurate rates of 99.53%, 98.86% and 98.80% with 8, 9 and 10 features, respectively. These results suggest that characteristics selection by genetic algorithms may improve the performance of the classifier in predicting death of patients with Chagas disease.

**KEYWORDS:** Genetic Algorithm, Features Selection, Support Vector Machine, Classification, Chagas Disease.

## 1 | INTRODUÇÃO

O sinal da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), derivado da série de intervalos RR do eletrocardiograma (ECG), incorpora informações relevantes sobre o sistema cardíaco e os mecanismos de controle associados. Diferentes condições fisiológicas e patológicas alteram a VFC. Essas mudanças podem ser perceptíveis através de características extraídas deste sinal, podendo se tornar uma poderosa ferramenta de diagnóstico [3]. Logo, é importante que características relevantes sejam selecionadas para a análise do sinal de VFC.

Em um trabalho anterior [6], foi possível separar as classes de pacientes chagásicos que evoluíram ou não para óbito por meio da análise de 18 características extraídas da VFC realizada por um classificador baseado na máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês *support vector machine*).

No reconhecimento de padrões, é desejável que se obtenha o menor espaço de características possível para diminuir o custo, o tempo de processamento e as informações redundantes, melhorando o desempenho do classificador. Os algoritmos genéticos (AG) têm sido utilizados na seleção de características, como uma poderosa ferramenta de busca e otimização baseada no processo de evolução natural [2].

Assim, este trabalho tem como objetivo investigar o uso de AG no reconhecimento de padrões da VFC com o intuito de traçar quais são as características mais relevantes na classificação da cardiopatia chagásica, aprimorando o conhecimento da base de dados e da epidemiologia em geral da doença de Chagas.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Banco de Dados

O banco de dados foi constituído de 150 séries de intervalos RR derivadas de registros Holter de 24h obtidos no Hospital das Clínicas da UFMG. Os pacientes estudados tinham entre 20 e 70 anos de idade e foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais para detectar evidências de outras cardiopatias ou patologias que excluíssem o paciente do estudo. Todos os procedimentos visaram garantir os direitos

e bem-estar das pessoas estudadas. Os exames apenas foram realizados após o recebimento do consentimento por escrito dos pacientes. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UFMG (Parecer 001/97). Os 150 pacientes foram divididos em duas classes: 15 pacientes que evoluíram para o óbito e 135 que não evoluíram [6].

## 2.2 Pré-Processamento dos Dados

As séries de intervalos RR foram obtidas automaticamente a partir de registros Holter (Burdick/DMI) que apresentaram pelo menos 18 h de traçados de boa qualidade e mais de 85% de batimentos sinusoidais. A frequência de amostragem foi de 200 Hz. Cada registro foi cuidadosamente inspecionado por um clínico e os complexos QRS foram classificados como batimentos normais, artefatos e ectópicos. Os artefatos e batimentos ectópicos foram retirados de modo a criar séries temporais de intervalos RR normais. Para a extração de características, foram selecionadas aleatoriamente 30 janelas de 5 min das séries RR de cada paciente [6].

## 2.3 Características

A Tabela 1 apresenta um resumo de todas as características utilizadas, baseadas na dinâmica simbólica, nos índices clássicos da VFC e em informações clínicas dos pacientes.

Índice	Características	Símbolo	Natureza
1	Entropia de Shannom	$H_{sd}$	Simbólicas
2	Número de Palavras Proibidas	nFW	
3	Entropia dos Padrões Ordinários 1	$H_{perm1}$	
4	Entropia dos Padrões Ordinários 2	$H_{perm2}$	
5	Índice de Complexidade	$C_{index}$	
6	Média dos Intervalos RR	mNN	Tempo-Frequenciais
7	Desvio Padrão Médio	SDNN	
8	Raiz Quadrada das Diferenças Sucessivas	RMSSD	
9	Porcentagem Intervalos Maiores que 50 ms	pNN50	
10	Média dos Intervalos Sucessivos	MSD	
11	Potência Espectral Total	TotPow	
12	Potência em Baixa Frequência	LF	
13	Potência em Alta Frequência	HF	
14	Razão Baixa e Alta Frequência	LF/HF	
15	Idade	idade	Clínicas
16	Sexo	Sexo	
17	Presença de Taquicardia Ventricular não Sustentada ao <i>Holter</i> de 24 h	NSVT	
18	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo	LVEF	
19	Tempo do Complexo QRS	QRS	

Tabela 1: Características utilizadas

As características  $H_{sd}$  e nFW são calculadas a partir da dinâmica simbólica, que mapeia a evolução das séries RR através da partição dessa série em símbolos e da combinação desses símbolos em palavras. A  $H_{sd}$  é a entropia de Shannon do sistema e nFW é a quantidade de palavras que ocorreram com baixa frequência de ocorrência durante a evolução do sistema. As características Hperm1 e Hperm2 correspondem à entropia de Shannon calculada a partir dos Padrões Estatísticos Ordinários (PEO's). Os PEO's descrevem a relação entre os intervalos RR. Desses segmentos são extraídos índices de permutações. As combinações desses índices de permutações permitem a descrição da série temporal. Diferentes configurações foram utilizadas em Hperm1 e Hperm2. Finalmente, o índice de complexidade,  $C_{index}$ , foi calculado seguindo a métrica em [4] e fornece uma medida da ordem e desordem do sistema. Maiores detalhes podem ser encontrados em [6, 7].

Os índices clássicos da VFC correspondem a: mNN, média dos intervalos RR; MSD – média das diferenças dos intervalos RR sucessivos; SDNN – desvio padrão dos intervalos RR; pNN50 – porcentagem dos intervalos RR cuja diferença com intervalo anterior exceda a 50 ms; TotPow – variância dos intervalos RR; LF – potência na faixa de baixas frequências (0,04 Hz até 0,15 Hz); HF – potência na faixa das altas frequências (0,15 Hz até 0,4 Hz), e LF/HF – razão entre LF e HF. Maiores detalhes podem ser encontrados em [6, 8].

As características clínicas correspondem a: idade do paciente, sexo do paciente, NSVT – presença de taquicardia ventricular não sustentada durante o Holter de 24 h, LVEF – fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 50% e QRS – tempo de duração do complexo QRS maior que 134 ms.

As características passaram por um processo de normalização entre 0 e 1. Para uma determinada característica, subtraiu-se cada valor pelo valor mínimo encontrado, e o resultado foi dividido pela diferença entre o valor máximo e o valor mínimo encontrado.

## 2.4 Balanceamento dos Dados

Como existe uma diferença muito grande entre o número de sinais de VFC das duas classes, os dados foram balanceados utilizando a técnica SMOTE (do inglês *Synthetic Minority Over-sampling Technique*), para evitar erros de treinamento do classificador [6].

## 2.5 Classificador

O classificador utilizado foi a SVM. A SVM é uma técnica que cria um modelo, baseado em aprendizado de máquinas, gerando um hiperplano separador das duas classes. Maiores detalhes sobre a SVM podem ser encontrados em [5, 7]. Os parâmetros utilizados na SVM foram:  $C = 1$ ,  $\sigma = 1$  e o *kernel* adotado foi o RBF (do inglês *Radial Basis Function*), esses valores foram obtidos no trabalho anterior [6].

## 2.6 Algoritmo Genético

O algoritmo genético tem como finalidade selecionar as características a serem utilizadas no processo de classificação. Um indivíduo é modelado como um vetor de 0's e 1's de tamanho 19, em que, seguindo a ordem da Tabela 1, 0 corresponde a característica desligada (não utilizada) e 1 corresponde a característica ligada (utilizada). Cada elemento desse vetor é chamado de gene. Um indivíduo tem seu desempenho (ou *fitness*) definido como a taxa de acerto média (definida adiante) do classificador utilizando aquelas características. O algoritmo segue a seguinte rotina: gera uma população inicial aleatória, calcula o *fitness* dessa população, seleciona os pais, gera os descendentes (filhos), executa mutações nos genes dos descendentes, calcula o *fitness* dos descendentes e seleciona os melhores indivíduos. O procedimento a partir da seleção dos pais é repetido até que o número de gerações seja atingido. Durante a execução do AG, foram realizados diferentes experimentos com 20%, 40%, 50% e 60% dos dados utilizados para treinamento e, dessa forma, com 80%, 60%, 50% e 40% do restante dos dados utilizado para testes. Os dados de treinamento e teste foram selecionados aleatoriamente. Para o classificador final foram utilizados 20% dos dados para treinamento e 80% para testes, conforme utilizado no trabalho anterior [6]. A Tabela 2 apresenta todos os parâmetros utilizados no algoritmo genético.

Parâmetro	Valor(es)	Descrição
Tamanho da População	30	Quantidade de indivíduos na população.
Número de pais	2	Quantidade de pais por cruzamento.
Número de filhos	15	Número de filhos gerados a cada iteração.
Número de gerações	100	Número total de gerações ou iterações.
Taxa de mutação	0,2	Chance de ocorrência de mutação.
Taxa de Determinismo	0,95	Chance de que o torneio seja vencido pelo melhor competidor.
Número de Participantes	5	Número de participantes do torneio.
Dados para treinamento	20%, 40%, 50% e 60%	% dos dados separados para treinamento.
Dados para teste	80%, 60%, 50% e 40%	% dos dados separados para teste.
Número de repetições do processo de classificação	5	Quantidade de vezes que se classifica durante cálculo de <i>fitness</i> .
Número de repetições do processo de classificação final	10	Quantidade de vezes que se classifica durante a classificação final.

Tabela 2: Parâmetros Utilizados

## 2.7 Cálculo do *Fitness*

Os genes de cada indivíduo definem quais características serão utilizadas no processo de classificação. Para esse conjunto de características, é realizado um

treinamento do classificador e testes. Esse procedimento é repetido cinco vezes e uma taxa média de acerto é calculada.

## 2.8 Seleção dos Pais

A seleção dos pais foi realizada através da técnica de torneio não determinístico. Cinco candidatos a pais são selecionados aleatoriamente e competem entre si. A competição é baseada no *fitness*. O candidato com o maior *fitness* é escolhido como vencedor. Como se trata de um torneio não determinístico existe uma pequena chance (de 5%) de o melhor participante não vencer. Nesse caso, um dos cinco participantes é escolhido ao acaso como vencedor.

## 2.9 Cruzamento e Mutação

O cruzamento foi implementado como uma chance do descendente herdar gene a gene de cada um dos pais. É percorrido todos os genes de cada pai, um a um. Para cada gene, existe uma chance igual de 50% de o descendente herdar o gene do primeiro pai ou o gene do segundo pai.

A mutação foi implementada como uma chance de cada gene sofrer uma inversão do seu valor. O vetor de genes é percorrido e, para cada gene, é sorteado uma chance de acontecer ou não uma mutação. Caso aconteça, o valor daquele gene é invertido. Um gene igual a 0 se torna 1 e vice-versa.

## 2.10 Seleção dos Melhores Indivíduos

Os descendentes são adicionados à população, com seus respectivos *fitness*, totalizando uma nova população de 45 membros. Desses 45 são selecionados os 30 melhores indivíduos, que possuem os maiores *fitness*, e essa população é passada adiante.

## 2.11 Resultado Final

Para o resultado final, foram utilizadas as soluções encontradas e a metodologia do trabalho anterior [6], servindo de parâmetro para análise. Portanto, para configurar os parâmetros  $C$  e  $\sigma$  do classificador, foi realizada uma validação cruzada usando uma busca em um espaço logarítmico, com os valores  $C \in \{10^0, 10^1, 10^2, 10^3\}$  e  $\sigma \in \{10^{-2}, 10^{-1}, 10_0, 10^1\}$ . O classificador foi treinado com o melhor par  $(C, \sigma)$  encontrado. Os resultados foram analisados com base na taxa de acerto definida como  $A_{cc} = n_c/M \times 100\%$ , em que  $M$  é quantidade de janelas de uma dada série RR de um dado paciente e  $n_c$  é número de janelas classificadas corretamente. Também foram calculadas a sensibilidade (*Sen*), que é a razão entre o número de verdadeiros-positivos sobre a quantidade real de casos positivos (evoluíram para o óbito), a especificidade (*Esp*), que é a razão entre o número de verdadeiros-negativos e o número real de casos negativos (não evoluíram para o óbito) e a área da curva ROC. A curva ROC mede o

desempenho de um classificador binário, fornecendo a razão dos verdadeiros-positivos em função dos falsos-positivos para diferentes limiares. Por convenção os valores da área da curva ROC são sempre maiores que 0,5 e o valor igual a 1 representa uma classificação perfeita.

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Resultados Obtidos

A Tabela 3 apresenta as soluções em que as quatro maiores taxas de acerto foram encontradas.

Solução	% Treino	% Teste	Nº Características	Características	Taxa Acerto (%)
1	20	80	8	5, 7, 14 a 19	99,59%
2	40	60	10	5, 6, 7, 12, 14 a 19	99,86%
3	50	50	8	5, 7, 14 a 19	99,90%
4	60	40	9	5, 6, 7, 14 a 19	99,94%

Tabela 3: Soluções Encontradas.

A Tabela 4 mostra a média e o desvio padrão da média dos parâmetros de desempenho do classificador utilizados neste trabalho. AUC representa a área sob a curva ROC.

Solução	1 e 3	2	4
$\overline{Acc}$ (% ± %)	99,53 ± 0,20	98,86 ± 1,52	98,80 ± 1,64
$\overline{Sen}$ (% ± %)	99,44 ± 0,24	98,77 ± 2,12	98,61 ± 2,21
$\overline{Esp}$ (% ± %)	99,70 ± 0,28	99,02 ± 0,63	99,16 ± 0,68
AUC	0,9998 ± 0,0002	0,9979 ± 0,0059	0,9980 ± 0,0055

Tabela 4: Resultados finais de desempenho

#### 3.2 Discussão

Classificadores baseados em aprendizado de máquina, como a SVM, são sensíveis à quantidade de dados utilizados para treinamento. Conforme apresentado na Tabela 3, o percentual de dados usado no treinamento e teste do classificador foi alterado para avaliar se alguma característica se tornaria mais ou menos importante para o classificador. Verificou-se que essa alteração não mudou de forma significativa a relação de características selecionadas pelo algoritmo genético.

Todas as características clínicas estiveram presentes em todas as soluções, assim como o índice de complexidade ( $C_{index}$ ), o desvio padrão médio dos intervalos RR (SDNN) e a razão da baixa e alta frequência (LF/HF). Tais resultados demonstram que os dados clínicos ainda são preponderantes na avaliação de risco de morte dos

pacientes. Entretanto, índices de VFC podem contribuir com o auxílio ao diagnóstico final.

Em comparação com o trabalho anterior [6], houve um aumento de cerca de 4% em relação à taxa de acerto e um ganho de cerca de 11% na especificidade. No trabalho realizado em [1], foi utilizada a técnica F – score, que atribui um valor para uma característica e estabelece um ranking dos maiores valores. Utilizando a SVM, os autores conseguiram reduzir o número de características de 9 para 5 e obtiveram uma taxa de acerto de 99,51% na classificação de malignidade ou benignidade do tumor de mama. Os autores de [9] utilizaram uma combinação das técnicas KNN e SVM para também separar tumores de mama com um conjunto de 32 características. Utilizando AG, a taxa de acerto final foi de 97,38% com apenas 6 características.

## 4 | CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que as técnicas de algoritmos genéticos melhoram o desempenho do classificador de risco de morte em pacientes chagásicos, apresentando ainda a vantagem de otimizar o número de características utilizadas. Neste trabalho foi obtida uma taxa de 99,53% e uma redução de 19 características para 8. A monitoração das características selecionadas ainda pode auxiliar a clínica médica no tratamento e acompanhamento dos pacientes chagásicos.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Antônio Ribeiro por disponibilizar os dados e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

AKAY, M. F. **Support vector machines combined with feature selection for breast cancer diagnosis**. Expert systems with applications. 2009; 36(2): 3240-7.

FRÖHLICH, H. CHAPELLE, O. SCHÖLKOPF, B. **Feature selection for support vector machines by means of genetic algorithm**. Proceedings of 15<sup>th</sup> IEEE International Conference on Tools with Artificial Intelligence; 2003 Nov 3-5; Sacramento, EUA. 2003. p. 142-148.

GOMES, M. E. D. **Técnicas de sistemas dinâmicos não-lineares na análise da modulação autônoma da variabilidade da frequência cardíaca** [tese para doutorado em Engenharia Elétrica]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

LEMPEL, A. Ziv, J. **On the complexity of finite sequences**. Information Theory, IEEE Transactions. 1976; 22 (1): 75-81.

Lorena, A. C. De Carvalho, A. C. P. L. F. **Uma introdução às support vector machines**. Revista de Informática Teórica e Aplicada. 2007; 14(2): 43-67.

SADY, C. C. R. RIBEIRO, A. L. P. **Symbolic features and classification via support vector machine for predicting death in patients with Chagas disease.** Computers in Biology and Medicine. 2016; 70 (2016): 220-227.

SADY, C. C. R. **Técnicas de Reconhecimentos de Padrões para Classificação de Sinais Fisiológicos** [tese para doutorado em Engenharia Elétrica]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. **Heart rate variability standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use.** Eur Heart J. 1996; 17: 354-381.

ZHENG, B. YOON, S. W. LAM, S. S. **Breast cancer diagnosis based on feature extraction using a hybrid of K-means and support vector machine algorithms.** Expert Systems with Applications. 2014; 41(4): 1476-82.

## MICROCEPHALY BRAIN UNFINISHED

**Cicera Páz da Silva**

Faculdade Maurício de Nassau - Caruaru - PE

**Italo Marcos Páz de Andrade**

Faculdade Maurício de Nassau - Caruaru - PE

**RESUMO:** Este artigo vem desmistificar tudo o que foi escrito sobre este assunto até o momento, sobre Microcefalia. Vem mostrar as causas reais deste evento através de uma nova pesquisa realizada sobre **células contráteis máter** que caracteriza-se pelo conjunto de células altamente especializadas, organizadas, racionais e que respondem por todos os comandos vitais em nosso organismo, contrações, sinapses nervosas, movimentos reflexos, sístole, diástole, trocas gasosas, sistemas aferentes e eferentes, no tecido conjuntivo etc. Elas são capazes de fazer uma leitura óptica sobre dez gerações ao seu redor. As CCMs, aparecem como sendo cinco pares de células mas na verdade, são seis pares de células, onde algumas vezes, Alfa e Beta estão unidas em um só bloco como acontece no sistema cardíaco. As CCMs, representam o conjunto de toda nossa hereditariedade aparecendo sempre aos pares e de forma alternada. São elas que fazem a distribuição no cérebro através de purkinje no sistema cardíaco e de toda nossa hereditariedade, do nosso DNA. Portanto, podemos concluir este estudo dizendo

que; a Microcefalia, não é um cérebro pequeno, mas um cérebro inacabado, e, que a epidemia tem local e período específico, pois as células procuram com uma certa precisão o local onde está sendo formado um cérebro Alfa- Delta, e o GPS destas células são a hereditariedade delas assim esta epidemia aconteceu com destaque no Brasil, na **Região Nordeste**, especificamente em **Pernambuco**, então pode se dizer que nasceu uma criança **Alfa-Delta** nesse estado, podemos até identificar, o período aproximado em que essa criança nasceu; abril, maio ou junho, já o reconhecimento desse gênio vai acontecer muito tempo depois, através da ciência. São crianças raríssimas, que atingem uma pontuação alta no RH (relógio Humano). Ou seja um cérebro formado por oito cérebros acoplados em um só. Assim as células reversas fazem uma varredura pela posse deste cérebro. **PALAVRAS-CHAVE:** Epidemia CCMs “Reversas” Microcefalia

### 1 | INTRODUÇÃO

A Ciência sofreu recentemente um abalo ao tentar explicar o nascimento de tantas crianças com Microcefalia, episódio nunca visto antes pelo seu quantitativo tão elevado. Os estudiosos do momento procuram constantemente uma resposta para explicar a causa do evento. Veio

então a suspeita da contaminação pelo Zika Virus. Mas havia uma indagação no ar, porque mulheres que foram infectadas pelo vírus Zika, tiveram bebês normais?

Para explicar neste artigo a etiologia real da Microcefalia ( a ciência atual desconhece) vamos observar em primeiro lugar as estatísticas sobre a movimentação da epidemia, fazendo um mapeamento de sua concentração, assim, podemos dizer que a epidemia, teve período específico e local específico. Em segundo, vamos observar as manchetes nesse período, e o que elas diziam a esse respeito; assim temos no **Brasil**, um fluxo maior acontecendo na **Região Nordeste**, especificamente em **Pernambuco**, num período que podemos chamar de **gestacionário**, pois pode ser comparado à uma gestação; com um registro de epidemia que vai de agosto de 2015 a agosto de 2016.

**De acordo com os dados do boletim da SSP-PE**, de 02 de Agosto de 2015 até o dia 06 de Agosto de 2016 o estado contabilizou 4.431 gestantes com exantemas. Dentro desta estatística, foram emitidos 29 confirmações de microcefalia intra-útero.

O que vimos até agora é um reflexo de 9 meses atrás. Um dos casos que chamam a atenção, foi do casal de gêmeos onde um bebê tem Microcefalia e o outro não tem.

O número de casos novos de Microcefalia, se comparamos com Dezembro, onde atendíamos cerca de 15 casos novos, por semana, agora atendemos cerca de quatro”, disse a BBC Brasil infectologista Regina Coeli, do Hospital Universal Osvaldo Cruz, principal referência da Microcefalia no país.

A queda nas notificações provocou questionamentos sobre a qualidade do registro de casos no país.

Portanto, se esta epidemia aconteceu com destaque em Pernambuco, então pode se dizer que nasceu uma criança Alfa-Delta nesse estado. O reconhecimento desse gênio vai acontecer muito tempo depois, através da ciência. São crianças raríssimas, que atingem uma pontuação alta no RH (relógio Humano) Em resumo, um Alfa-Delta foi gerado em Pernambuco com nascimento aproximado entre abril, maio ou Junho de 2016.

Pernambuco tem diagnóstico de Microcefalia confirmado em quase 400 bebês. De Agosto de 2015 à 23 de Julho de 2016, Pernambuco confirmou 398 casos de Microcefalia, dados divulgados pela SES do Estado.

Apesar do número, a Secretaria informa que a notificação devido as manchas vermelhas não significa necessariamente, que a grávida tem suspeita de dengue, Zika ou chicungunya.

#### **DE ACORDO COM O G1- GLOBO.COM/ JORNAL HOJE/2016**

Uma nova epidemia de Zika, chicungunya e Dengue causa preocupação em médicos em Pernambuco, que lidera o mais alto número de casos de Microcefalia no país.

De 1º de Agosto de 2015, a capital pernambucana continua liderando as estatísticas de Microcefalia, com registros de 62 casos, entretanto, os cinco novos casos foram

**G1.GLOBO/ JORNAL HOJE/NOTICIA/2016- MICROCEFALIA PODE SER PROVOCADA POR OUTROS FATORES. ED. 15/02/2016:** “Fatores genéticos e infecções também podem causar a má-formação.”

**Etiologia** - A palavra Microcefalia vem do grego Mikaros- que significa pequeno mais Kephale, que significa cabeça. A literatura médica trás também outra nomenclatura (nanocéfalia) que vem do grego Nannós e On, que significa: anão, muito pequeno, mais Kephale, “cabeça” onde diferenciam-se por vários fatores etiológicos ou clínicos.

**Microcefalia** é, portanto, um evento resultante de manobras invasivas ao cubo atrial de seis pares de células de comando, chamadas **Células Contráteis Máter Reversas**, onde acontece o fechamento rápido do cérebro por células também de comando chamadas **desoxirribose**. O fato ocorre porque as **CCMs** que são células de comando possuem uma capacidade extraordinária para fazer uma leitura óptica de outras células ao seu redor, ou à distância de até dez gerações, e identificar que está sendo formado um cérebro Alfa-Delta, ou seja um cérebro contemplado por oito cérebros ou os pais e os avós maternos e paternos sempre aos pares e de forma alternada, iniciando com avós maternos e em seguida, avós paternos, a saber: Aa (Alfa-) o pai e a mãe- Bb (Beta) os avós maternos- Cc (Ceci) os avós paternos- Dd (Delta) os bizavós maternos; temos assim uma criança genial.

Os pesquisadores afirmam que “no início da gestação, o vírus pode causar lesões no cérebro e interferir em fases de desenvolvimento do encéfalo”. Na verdade, quem provoca essas lesões, são as células de comando Reversas. Segundo pesquisadores sobre este assunto, o risco maior da microcefalia pelo vírus Zika acontece ainda na fase de desenvolvimento córtex cerebral do feto ou seja nos primeiros quatro meses de gravidez.

No desdobramento cromossômico, nós temos a princípio 24 pares de células, (o par de nº 25 é deletado a cada cruzamento) a ciência interpreta como sendo 23 pares de cromossomos apenas, é que Alfa, formado pelo pai e a mãe, estão num só bloco, juntos, e nesta fita, temos a fita principal de comando no organismo, que será melhor explicado na frente, que são;

**Aa-Bb-Cc-Dd-Ee-Ff-Gg-Hh-Ii-Jj.** Nesta fita, são reversas a partir de **Ee** chamada **E Reversa**, assim temos então dois grupos de células, a considerar, um grupo de células boas, versus um grupo de células reversas. As **células reversas- (Cc- Ee - Gg- Ii-)** ao detectar a formação deste cérebro, deseja a posse deste a qualquer custo, as **células desoxirribose (Aa-Bb-Dd-Ff-Hh-Jj)** entra em conflito com as células reversas e estes dois grupos de células trava uma batalha com grande rivalidade, acontecendo uma varredura geral, em todas as células ao seu redor até dez gerações (portanto, elas procuram, seguindo as gerações daquele cérebro q está sendo formado, por essa razão elas se deslocam em vários lugares onde possa haver um parentesco deste cérebro) pela busca do cérebro Alfa-Delta, com o fechamento rápido deste pelas

desoxirribose, portanto, ficando o cérebro inacabado.

Sobre um cérebro, podemos dizer que, o seu tamanho não mede necessariamente a sua capacidade, ele poderá ser pequeno, e com todas as funções dentro da normalidade, mas não estará livre de uma microcefalia pós-natal e ainda que um cérebro pode nascer inacabado, e fugir ao padrão de normalidade e ainda poderá nascer pequeno e crescer, desde que tenha nascido perfeito e ainda pode nascer grande e diminuir, tudo ocorrerá de acordo com a movimentação das CCMs.

**(<https://pt.wikipedia.org/wiki/microcefalia>):**

É uma condição neurológica em que o tamanho da cabeça e o seu perímetro cefálico occipito-frontal (ofc), é dois ou mais desvios padrão abaixo da média para a idade e o sexo.

A microcefalia pode ser familiar e não necessariamente associada ao retardo mental.

Distingue-se das cranioestenoses e de anomalias específicas, ou déficit de crescimento cerebral quer pelo pequeno tamanho da caixa craniana quer pelo reduzido desenvolvimento do cérebro.

O autor diz que o perímetro cefálico occipito-frontal, é dois ou mais desvios padrão, abaixo da média, mas na realidade, trata-se de um cérebro inacabado. O autor diz ainda que a microcefalia pode ser familiar....., a criança de cérebro inacabado, trás uma boa hereditariedade genética, por isso a disputa, e a rivalidade entre os grupos de células.

Os autores apresentam a Microcefalia como sendo uma enfermidade congênita adquirida que desenvolve-se no útero ou ainda nos primeiros anos de vida. Pode ser adquirida através de uma exposição à substâncias tóxicas ainda na gravidez, ou ainda pode vir associada às síndromes genéticas hereditárias e outros fatores; como : abuso de álcool, exposição à drogas, diabetes, hipotireoidismo, insuficiência placetária, eclampsias, infecção durante a gravidez do tipo rubéola, citomegalovírus, toxiplasmose e recentemente pesquisadores do momento associam a picada do mosquito Zika vírus. Os estudiosos mostram ainda a microcefalia pós- natais como sendo uma má formação do metabolismo da criança devido à infecção intra craniana, ou ainda a alguns tipos de infecção por cobre, ou ainda a presença de hipetiroidismo infantil, e ainda algum tipo de anemia crônica ou insuficiência renal.

De tudo quanto foi exposto, podemos dizer que a Microcefalia é resultado da movimentação das CCMs como já foi dito, exceto, quando se tratar de grandes catástrofes ecológicas com irradiações químicas, assim será possível sim que o cérebro não seja concluído com perfeição, mas não podemos colocar de forma alguma o Zika vírus como responsável por esse evento.

No Brasil estudiosos do momento associam a microcefalia à entrada de Zika Vírus que aconteceu a partir da copa do mundo em 1914, quando o Brasil recebeu turistas de todas as partes do mundo, inclusive de país onde o mosquito foi mais

intensamente produzido como a África e a Ásia. Os estudos recentes confirmam uma associação do vírus Zika à microcefalia congênita e Síndrome de Guillain Barré.

Este artigo vem desmistificar tudo o que foi escrito sobre este assunto até o momento, mostrando as causas reais da microcefalia através de uma nova pesquisa realizada sobre células contráteis máter que caracteriza-se pelo conjunto de células altamente especializadas, organizadas, racionais e que respondem por todos os comandos vitais em nosso organismo, contrações, sinapses nervosas, movimentos reflexos, sístole, diástole, trocas gasosas, sistemas aferentes e eferentes, no tecido conjuntivo etc. Elas são capazes de fazer uma leitura óptica sobre dez gerações ao seu redor.

As CCMs, aparecem como sendo cinco pares de células mas na verdade, são seis pares de células, onde algumas vezes, Alfa e Beta estão unidas em um só bloco como acontece no sistema cardíaco. As CCMs, representam o conjunto de toda nossa hereditariedade aparecendo sempre aos pares e de forma alternada. Assim sendo, fica melhor agora a compreensão real do que seja a Microcefalia.

**Segundo as manchetes deste período gestacionário sobre Microcefalia, os pesquisadores sempre demonstram insegurança ao afirmar a relação zika à Microcefalia:**

Exame.abril.com.br/brasil/ferramentas Zika-virus e Microcefalia a evolução do surto no Brasil e seus registros:

Apesar de o CDC (centro de Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos) ter encontrado relação científica entre o Zika e casos de Microcefalia a proporção de causa e efeito ainda é alvo de estudo e pesquisa espalhados por todo país. Segundo o Butantan, por enquanto 1434 casos confirmados, em apenas 208, foi comprovado a presença do Zika vírus nos recém-nascidos. Mesmo nesses bebês, não se pode afirmar que a Microcefalia foi obrigatoriamente causada pelo Zika.

Registros na literatura desde os anos de 1940, foi apenas de seis meses para cá que o zika vírus despertou o interesse do mundo pela associação com o surto de microcefalia no Brasil. Até o último dia 21 de maio, o Brasil registrava 1434 casos confirmados, com mais de 7,6 mil notificações para investigação, um número inegavelmente maior que a média de 140 a 170 casos ao ano desde 2010.

4.202 mulheres foram registradas com exantemas espalhadas pelo corpo, entretanto, a SES esclarece que a notificação não indica, necessariamente a confirmação de casos de dengue, chicungunya ou zika.

As manchas aqui citadas são apenas a movimentação dessas células no organismo da gestante, pois são células de comando, mesmo as reversas, estão sempre na mesma fita das células Q/B de base. A pele vermelha, significa, o deslocamento rápido das células de comando, procurando as células Alfa-delta, as desoxirribose, tentam proteger ao máximo o corpo da gestante e o feto; ao passo que as reversas vasculham tudo e tentam invadir o cérebro do bebe.

Em relação às notificações dos casos, já foram contabilizados 94.447 para dengue, 49.198 para chicungunya e 10.776 para Zika. De acordo com a SES, a notificação não representa a confirmação dos casos, mas uma suspeita do diagnóstico das

doenças diante dos sintomas apresentados pelos pacientes.

As ocorrências recentes de má formação em bebês têm sido associadas ao Zika Virus, transmitidos pelo Aedes Aegypti. Mas desde o início de Janeiro, o número de novos casos registrados em todo o país que chegou a crescer mais de 40% por semana, em Dezembro começa a cair.

## REFERÊNCIAS

Aires - Margarida de Melo **Fisiologia** - Ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro.

Borges-Osório, Maria Regina; ROBSON, Wanyce Miriam. **Genética Humana**. 2. Ed Porto Alegre: Artmed, 2001.

Calich, Celidéia Vaz- **Imunologia** Ed. Revinter Ltda Rio de Janeiro 2001.

Cingolani, Horácio E. Hosseau, Alberto B; **Fisiologia Humana** Ed. Artmed- Porto Alegre, 2004.

Guyton, Arthur C; John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011

Roitt- Ivan Brostoff- Jonathan-Male- David **Imunologia** Ed. Manole São Paulo 2003. 6ª Edição.

Simmons, Michel, J; Snustad, D. Peta **Fundamentos da Genética** 2ª Edição, Sinustad Tradução: Paulo Armando Motta. Editora, Guanabara Rio de Janeiro- 2000

**Sistema Imunológico** - [www. Scielo. Br.pdf/rbr/50](http://www.Scielo.Br/pdf/rbr/50)

[G1-globo-com/jornal hoje/ 2016/editado15/02/2016](http://G1-globo-com/jornal%20hoje/2016/editado15/02/2016)

BBC Brasil-infectologista Reg.Coeli do Hospital Universitário Osvaldo Cruz.

[SSP-PE/02/08/2015](http://SSP-PE/02/08/2015)

[Htt os:wikipedia.org/wik\(microcefalia\)](http://Htt%20os:wikipedia.org/wik(microcefalia))

[Exame,abril.com.br/brasil/ferramenta/zika-virus e microcefalia](http://Exame,abril.com.br/brasil/ferramenta/zika-virus%20e%20microcefalia)

## O SUJEITO DA CLÍNICA E A CLÍNICA RELACIONAL: CONTRIBUIÇÕES PARA A CLÍNICA DE ATENÇÃO BÁSICA DO SUS

**Rita de Cássia Gabrielli Souza Lima**

Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa  
Catarina

Programa de Pós-Graduação de Mestrado  
Profissional em Saúde e Gestão do Trabalho

**RESUMO:** O texto objetiva ampliar a discussão sobre o sujeito da clínica, na perspectiva de Ivan Cavicchi, com a finalidade de expandir as contribuições teóricas para os trabalhadores da Estratégia Saúde da Família e do Núcleo de Apoio Saúde da Família do Sistema Único de Saúde. Parte da premissa de que o sujeito daquela que temos nomeado a boa clínica em nível primário de atenção à saúde do SUS não é o sujeito passivo da clínica tradicional, mas aquele que no *setting* encontra condições de possibilidades para deliberar sobre questões que dizem respeito ao seu processo saúde-doença, caso deseje. Concluiu-se que, respeitadas as múltiplas diferenças contextuais, o sujeito brasileiro da boa clínica assemelha-se ao sujeito italiano da clínica relacional proposta por Ivan Cavicchi: é um sujeito ativo, participe de uma clínica mediada pela horizontalidade e construída em bases democráticas e participativas.

**PALAVRAS-CHAVE:** competência clínica; participação nas decisões; atenção primária à saúde.

**ABSTRACT:** The objective of the text is to broaden the discussion about the clinic subject from the perspective of Ivan Cavicchi with the purpose of expanding the theoretical contributions for the workers of the Family Health Strategy and the Family Health Support Center of the Unique Health System. It starts from the premise that the subject of what we have named as the good clinic at the level of the primary health care of SUS, is not the passive subject of the traditional clinic but the one who in the setting finds the conditions of possibilities to deliberate about issues that concern his health-disease process, in case he wishes to do it. Taking into account the multiple contextual differences, the conclusion drawn is that the Brazilian subject of the good clinic is similar to the Italian subject of the relationship clinic proposed by Ivan Cavicchi: he is an active subject and a participant of a clinic mediated by horizontality and constructed on democratic and participative basis.

**KEYWORDS:** clinical competence; participation in decisions; primary health care.

### 1 | INTRODUÇÃO

Este texto atualiza as reflexões sobre o *sujeito da clínica* apresentadas no artigo *Epistemologic Contributions of Ivan Cavicchi About The Clinic Subject*, publicado em *FIEP*

*Bulletin*, em 2017. O objetivo é ampliar a discussão sobre o tema desenvolvido na obra *Autonomia e Responsabilità* de Ivan Cavicchi (CAVICCHI, 2007), agregando uma publicação recente do autor bem como trabalhos correlatos de outros autores. A finalidade desta segunda versão é expandir as contribuições teóricas para os trabalhadores da Estratégia Saúde da Família da Atenção Básica (ESF/AB) e do Núcleo de Apoio Saúde da Família (NASF) do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2017; BRASIL, 2008).

Na primeira visita em *Autonomia e Responsabilità*, a narrativa de Cavicchi sobre o sujeito da clínica da atenção primária à saúde (APS) do *Servizio Sanitario Nazionale* (sistema de saúde italiano) direcionou o nosso olhar para o sujeito daquela que temos nomeado a boa clínica na ESF/AB e NASF. Na revisita para esta atualização, o autor incitou-nos a ponderar que o sujeito da boa clínica da ESF/AB e NASF do SUS não é o sujeito da clínica tradicional – instrumental porque prescritiva –, mas o sujeito da clínica relacional. A boa clínica assemelha-se, portanto, à clínica relacional: realizam-se horizontalmente com a finalidade de garantir promoção de saúde, prevenção e tratamento de doenças, e reabilitação com resolutividade, continuidade do cuidado e atenção longitudinal.

Em uma obra publicada recentemente, intitulada, *La Quarta Riforma*, Cavicchi sinaliza que o sujeito da clínica relacional em atenção primária à saúde (APS), na Itália, é aquele que reconhece na relação com o cuidador que seu direito à saúde e ao tratamento a doenças são bens primários que participam da riqueza do país e que esses direitos se realizam no exercício de cidadania. O autor destaca que na lógica deste modelo de clínica, a relação construída em bases democráticas e participativas entre cuidador e ser cuidado não é uma questão de conduta cortês, por parte do profissional, mas o condicionante, por meio do qual acontece a problematização da consciência da doença e/ou da saúde (CAVICCHI, 2016).

Três perspectivas podem emergir da superação da clínica tradicional positivista, em defesa da clínica relacional: gnosiológica, ao engrandecer o conhecimento científico; epistemológica, ao transformar o modo de compreender a clínica por meio da complementariedade entre evidência científica e percepção do senso comum; e metodológica, ao transmutar o valor e o uso de procedimentos. Reflexionando com criticidade, Cavicchi segue relatando que a clínica relacional corresponde à clínica razoável, em que o cuidador reconhece a existência da complexidade; a existência de outras dimensão além da racionalidade instrumental; e a necessidade de apropriação da racionalidade pela complexidade (problematização) para que esta confira àquela um novo sentido prático (CAVICCHI, 2016).

Se pensamos esse novo sentido prático na perspectiva weberiana inferimos que a problematização, na clínica relacional, se apropria da racionalidade instrumental para orientá-la por valores democráticos, transmutando a ação racional instrumental da clínica tradicional para uma ação racional orientada por valores (CARDOSO, 2008). O produto será o direito de o sujeito cuidado usufruir no *setting* da liberdade conquistada

constitucionalmente como um direito de cidadania. Neste exercício, ele poderá assumir, se desejar, o seu direito de participar das deliberações sobre seu processo saúde-doença, isto é, poderá fazer uso do espaço de encontro para expressar-se, desvelar-se (LIMA, 2008), inclusive, para deliberar sobre a norma necessária e desejada para si (CANGUILHEM, 2006).

Um exemplo de valor democrático capaz de conferir ancoragem a este processo é a solidariedade. Concebendo-a como um valor que se processa no “domínio da liberdade” entre cuidador e cuidado (LIMA; VERDI, 2009, p. 272), a solidariedade pode conferir um novo sentido prático à ação racional instrumental, orientando-a para fazer do espaço de encontro um espaço de ação política, de cidadania política.

No Brasil, entretanto, o lento processo de construção social de cidadania política, gerado pelo “caráter retardatário, dependente e, conseqüentemente, acelerado do processo de desenvolvimento do capitalismo no país”, inibiu a implantação da “forma-sujeito de direito” e, com efeito, retraiu o processo de reconhecimento do direito de manifestação da vontade, como também da capacidade de apropriação de bens (saúde e tratamento a doenças) e de concretização dessa capacidade contra terceiros. A “forma-sujeito de direito” (SAES, 2001, p. 407; 381), aquela que realiza seu pleno desenvolvimento somente no capitalismo (KASHIURA JR., 2012), coincide com o reconhecimento, por parte do Estado, de que todos os agentes da produção (proprietários dos meios de produção e vendedores da força de trabalho) são “sujeitos individuais de alguns direitos essenciais”. Essa prerrogativa compensatória permite a instituição de “acordos livres entre vontades individuais” na estrutura econômica capitalista (SAES, 2001, p. 381).

Em nossa realidade nacional, o que está posto até hoje é que a “cidadania política” (SAES, 2001, p. 379) não é do âmbito de conquista constitucional materializada, mas de um projeto historicamente em curso, afetado por momentos de luzes (períodos democráticos) e de sombras (períodos ditatoriais/de exceção). Logo, em âmbito do universalismo, o sujeito da clínica relacional da ESF/AB e do NASF do SUS é objeto latente deste projeto.

## **2 | OS PASSEIOS PELA OBRA *AUTONOMIA E RESPONSABILITÀ*, IVAN CAVICCHI**

O primeiro passeio pela obra aconteceu na ocasião da análise dos dados de um desdobramento de uma pesquisa estadual, concluída em 2017, intitulada Impacto Social do Programa Mais Médicos, em Santa Catarina, Brasil: realidades e perspectivas, desenvolvida pela Universidade do Vale do Itajaí, SC, com financiamento da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina/FAPESC e apoio direto da Secretaria de Estado da Saúde/SES/SC, Brasil.

Este recorte da pesquisa estadual resultou em uma pesquisa de mestrado, cujo objetivo geral foi conhecer o impacto social gerado pela chegada de um médico cubano em um município catarinense de três mil habitantes que estava há um ano

sem nenhum médico na atenção básica. Os resultados revelaram, dentre outros, que a produção de vínculo entre a comunidade e o médico cubano se havia dado em razão de os usuários reconhecerem-no como “um outro igual a nós”: não um doutor, mas “um outro que olha pra gente de igual para igual” (LIZ; LIMA, 2017).

A tessitura desta versão se deu em interlocução com um segundo recorte da pesquisa estadual, dirigido para a identificação e análise de eventuais mudanças imateriais geradas pela chegada do Programa Mais Médicos no processo de acontecer da vida das pessoas, em um município catarinense que, proporcionalmente, mais recebeu médicos pelo Programa, desde seu lançamento em 2013. Os resultados deste estudo de mestrado sinalizaram a confiança, a segurança e a dignidade como valores-fonte da proteção social oportunizada pelo Mais Médicos (MIRANDA, 2018). A pesquisa acabou confirmando em um micro contexto o que a pesquisa estadual havia sinalizado: que o Programa parece se constituir em uma estratégia indutora de cidadania, na medida em que ao se situar nos marcos de políticas públicas de intervenção social redistributiva, tem garantido a realização de valores-fonte de proteção social, integrados dialeticamente ao SUS de caráter universal (FAPESC, 2017).

Os achados deste segundo estudo de mestrado levantaram dois questionamentos sobre a utilização do termo “paciente”: a) Quando o profissional da ESF/AB e do NASF se refere ao sujeito da clínica como “paciente” e/ou quando o sujeito desta clínica se reconhece como “paciente” na relação com o cuidador, cristaliza-se uma limitação simbólica de produção de vínculo e de cidadania? É possível generalizar que, ao recuperar valores-fonte de proteção social, uma política pública de intervenção social redistributiva se constitui em uma política indutora de cidadania?

### **3 | QUEM É O SUJEITO DA CLÍNICA, PARA IVAN CAVICCHI, NO CONTEXTO DO *SERVIZIO SANITARIO NAZIONALE*?**

*Cavicchi* abre o livro *Autonomia e Responsabilità* comentando que o código deontológico de medicina italiana excluiu de seus textos a palavra paciente para expressar o sujeito do cuidado. Voltando-se para a história e para a conjuntura sanitária italiana, em 2007, o autor refere que o paciente “representa uma organização político-social do modelo [...] de assistência, de medicina e de saúde pública, representada pelo termo tutela”. O paciente é aquele que concede a tutela de seu cuidado aos cuidadores e às políticas sanitárias aceitando, desse modo, ser ajudado de modo caridoso e paternalístico em uma hierarquia tutor-tutelado, capaz-incapaz; “é uma mediação social” (CAVICCHI, 2007, p.12). A palavra paciente, carregada historicamente de uma força única na sua intrínseca unicidade, revela-se na forma de doação, caridade, proteção tutelar.

O paciente é produto de uma visão clínica do homem doente e, portanto, de

uma (des) personalização do sujeito e de uma objetivação deste, enquanto reduzido a objeto para fins de conhecimento. Foi com base nessa premissa que surgiram “os hospitais modernos, as instituições sanitárias que, inspirando-se em preceitos da medicina experimental, reduziram o doente a um objeto de laboratório” (CAVICCHI, 2007, p. 42).

Na dimensão moral, sempre pensando no contexto histórico-sanitário italiano, *Cavicchi* concebe o paciente como aquele que deve suportar as consequências morais da doença cuja determinação é moral, antes de social, haja vista que no plano moral a doença é interpretada temporal e culturalmente como culpa, pena e redenção. Na dimensão natural, o paciente é aquele que deve aceitar as leis da natureza, e sobretudo, o seu destino de mortalidade. Na dimensão científica, o paciente é aquele que é reduzido à doença, à objeto do conhecimento científico e estudado como tal (CAVICCHI, 2007).

O autor relata que a literatura sociológica tem mostrado, nas últimas décadas, a transformação da figura social do paciente. Da mesma maneira que mudaram os médicos, os administradores sanitários e os políticos italianos, mudou também a conotação de paciente. O importante, na sua ótica, não é demarcar temporalmente quando essas mudanças ocorreram, mas “como se pode deduzir de tais transformações outras transformações, ampliando a compreensão de que tais transformações representam rupturas profundas e rediscussões culturais” (CAVICCHI, 2007, p. 12). Neste sentido, trata-se de um fato social e histórico que irrompeu no cenário italiano sanitário, gerando uma transformação no modelo tradicional de tutela a partir da chegada do *exigente*, no lugar do paciente.

Para discorrer sobre esse fato social e histórico, o autor lança mão das mudanças ocorridas nas esferas: dos direitos; dos processos de emancipação; dos meios de comunicação; do desenvolvimento da democracia, da cultura, das ciências e da informação; das reformas feitas e não feitas; da secularização; e da multietnicidade da sociedade moderna, entre outras.

#### **4 | SAÚDE COMO UM BEM PRIMÁRIO EM INTERLOCUÇÃO COM O EXTRATOS DO PENSAMENTO ARISTOTÉLICO**

Abrimos um parênteses, nesse momento do texto, para aproximar o pensamento aristotélico da perspectiva de *Cavicchi*, em *Autonomia e Responsabilità*, sobre as distintas noções do bem saúde – para o paciente e para o *exigente*.

No que se refere à noção de saúde como um bem primário, *Cavicchi* sinaliza que a noção do bem saúde para o paciente é diferente da noção para o exigente. O bem saúde para o paciente está expresso na conquista da ausência de doença; já o bem saúde para o exigente envolve a concretização da “boa vida” e esta, por sua vez, está contratualizada no pagamento de impostos (CAVICCHI, 2007, p. 15).

Ao compreender que o bem saúde para o exigente materializa-se sobre a “boa

vida”, o autor nos remete à pesquisa realizada por Aristóteles, no século IV a.C., com o objetivo de descobrir um caminho para criar uma teoria política para que o homem comum se tornasse cidadão. Desenvolvendo-a com seus alunos, Aristóteles analisou 158 (cento e cinquenta e oito) Constituições da Grécia para responder a sua pergunta primordial de pesquisa: qual é a função do Estado (da polis)? (ALENCAR, 2018).

Tendo como hipótese do estudo – A função do Estado é assegurar o *bem viver*, dar condições para que os cidadãos vivam, na polis, a *boa vida*, virtuosa, feliz, em sua excelência –, ele classificou os diferentes regimes de governo, levando em conta a qualidade do regime (bom ou ruim) e a quantidade de pessoas que governam (que detém o poder formal). Um regime bom é aquele em prol do bem comum da coletividade da polis; já um regime ruim o que se realiza em prol de interesses próprios. Após analisar as Constituições gregas ele conclui que: a) Um regime bom em que apenas um governa é uma monarquia; b) Um regime ruim em que apenas um governa é uma tirania; c) Um regime bom em que poucos governam é uma aristocracia; d) Um regime ruim em que poucos governam é uma oligarquia; e) Um regime bom em que muitos governam é uma república; e f) Um regime ruim em que muitos governam é uma democracia. Dentre os regimes ruins, ele apontava para a democracia como o menos ruim. Esses diferentes tipos e âmbitos de governo estão descritos no Livro I de “Política” (ARISTÓTELES, 1997).

Mais à frente, ainda em Política, no Livro III, capítulo 9, ele buscou responder a outra pergunta de pesquisa: quem é o cidadão que vive na polis?

Considerando que a polis é ordenada para que o cidadão reconheça o bem dele igual ao bem comum da coletividade da própria polis; considerando que a polis requer um discurso, uma linguagem; considerando também que a polis destina-se a garantir o bem viver, e este bem significa também resolver os problemas da comunidade da polis; considerando, ainda, que para o homem se tornar cidadão ele precisa ser instruído, educado – não educação propriamente formal, mas em nível humanístico, no sentido de sabedoria (noção de bem, mal, justo, injusto) – e, para tanto, ele precisa ter posse e renda, o homem da polis é o homem que tem ócio, que tem tempo para refletir. Dizia Aristóteles: quem é artesão, quem está voltado para afazeres domésticos, ou seja, quem se ocupa de trabalhos manuais, não tem a possibilidade de ser cidadão; mulheres, por exemplo; crianças, também. Negociantes, por não terem ócio (*nec otium*) não se tornariam cidadãos (LIMA, 2009).

Sobre a discussão principal a respeito da legitimidade da escravidão, Aristóteles escreve cinco capítulos no Livro I da Política. Dialogando sobre este tema no contexto do estudo sobre os múltiplos tipos de governo, o filósofo aponta para a existência de escravos que, por natureza, já nascem escravos e irão reproduzir a escravidão e aponta para pessoas livres que, por natureza, já nascem livres e serão consideradas cidadãos: “alguns seres humanos são por natureza senhores, e outros por natureza escravos; e [...] a relação natural entre senhor e escravo é benéfica para ambos” (TIERNO, 2008, p. 132).

De acordo com Tosi (2003), além de Aristóteles assumir a escravidão como fato histórico, em relação dialógica com o auditório, ele aceita com respeito as discordâncias de críticos da escravidão para os quais a escravidão não era natural, mas produto de violência, conforme descrito a seguir:

Os críticos da escravidão afirmam que ela não é a condição natural dos homens, mas que é contrária à natureza porque todos os homens são livres por natureza, e a escravidão, como instituição, foi introduzida em virtude da lei do mais forte e não encontra justificação se não na pura violência, que não pode ser o fundamento do justo: os dois termos são colocados icasticamente um diante o outro: “oudé díkaion: bíaiou gar”. É preciso, portanto, encontrar uma justificação “racional” da escravidão que não se fundamente só no uso da força (TOSI, 2003, p. 74).

Da necessidade de justificar racionalmente a escravidão, contra argumentando os críticos da sua época, Aristóteles apresenta uma distinção entre escravo por lei e escravo por natureza: “somente demonstrando a naturalidade da escravidão, pode-se justificá-la e ir além do mero uso da força. A escravidão legal será justa somente no caso em que escravos por lei e por natureza coincidam, de outra forma pode acontecer que “pessoas consideradas nobilíssimas (*eugenestatoi*) sejam escravas e filhas de escravos, caso sejam feitas prisioneiras e vendidas” (ARISTÓTELES, 1255 apud TOSI, 2003, p. 75).

Na interpretação de Tosi (2003, p. 90), Aristóteles não conseguiu definir satisfatoriamente escravidão natural, não conseguiu comprovar a sua existência nem descrever que características constituem os escravos por natureza. Tentativas foram por ele empreendidas, para justificar racionalmente este escravo, mas foram infrutíferas. Aparentemente, essas tentativas expõem a sua visão de escravo como um ser humano porque o escravo “participa da razão [...] e, enquanto homem, pode se ter amizade por ele [mas falta-lhe] totalmente a parte deliberativa [...] , e por isso ele pode somente perceber a razão, isto é, obedecer às ordens, mas não exercitá-la”.

Vale tecer algumas linhas sobre o método de pesquisa utilizado por Aristóteles, na discussão sobre a escravidão natural. De acordo com Enrico Berti, em sua obra “As razões de Aristóteles”, publicada em 1998, Aristóteles utilizou a dialética como método de pesquisa, uma vez que o tema escravidão se situa no âmbito da filosofia prática. O estudo começa confrontando duas distintas opiniões no que se refere à “legitimidade” da escravidão (Pol., I, III, 1253b 14-23 apud TOSI, 2003, p. 94).

Estabelecido este confronto, Aristóteles faz uma “análise semântica” da palavra escravo para investigar “em quantos sentidos (*posakhós*) ela se diz, se em um apenas (*monakhós*) ou em muitos (*pollakhós*) (Tópicos, I 15) mostrando, em todo o diálogo, como ela deve ser entendida num duplo sentido”: no de escravo por natureza e no de escravo por lei. Forma-se, nesta escolha metodológica, uma aporia, isto é, “uma oposição entre duas opiniões opostas sobre o mesmo argumento, uma defendendo o caráter natural, outra, o caráter antinatural da escravidão”. Todo o processo de discussão dessa aporia se dá de modo circular entre “o que pressupõe e o que pretende demonstrar”, com base no confronto de premissas validadas no debate da

polis “das quais não se pode afastar-se”, conhecidas por *endoxa* (BERTI, 1998 apud TOSI, 2003, p. 94-96).

Para Aristóteles, “nos fins da dialética, o que conta não é que as premissas sejam verdadeiras, mas que sejam partilhadas, reconhecidas, aceitas por todos, portanto, também pelo público árbitro e por ambos os interlocutores”. Afinal, a dialética “não se preocupa com a verdade, mas apenas com a discussão, isto é com a refutação e, portanto, com o consenso [do auditório] que a esta é indispensável” (BERTI, 1998 apud TOSI, 2003, p. 94-96). Percebe-se, na visão deste intérprete, que o crédito deve ser dado não às opiniões referentes ao objeto escravidão natural, mas “aos *endoxa* utilizados no debate para ‘demonstrar’ o seu caráter natural”. Essa opiniões autorizadas pelo debate dizem respeito a um princípio “‘universal’ ou ‘geral’ de conceber as relações de governo, cujo conteúdo é o seguinte:

1. que a necessidade do governo (*arché*) nasce do fato de que existe uma pluralidade de partes e que isso é uma característica de todo ser vivo;
2. que as partes se relacionam entre si de forma desigual: haverá sempre o elemento que comanda e o elemento que é comandado;
3. que essa desigualdade é natural, “em virtude da ordem da natureza em sua totalidade” (TOSI, 2003, p. 97).

Devido à sua análise profunda e sistemática sobre a escravidão, a categoria deliberação expande-se em toda *Política*:

A deliberação recorta-se no horizonte teórico da obra que procede da Ética: não pode ser removida dela sem implicar, ao mesmo tempo, uma renúncia à discussão sobre o modo político da melhor vida. Nenhum escravo inserido na dinâmica natural da geração da polis saberá o que é o bem viver, porque suas capacidades enquadram-se no reduzido espaço de realização que, por natureza, lhe corresponde – o que equivale a dizer: pela sujeição da razão à prioridade natural da polis (TIERNO, 2008, p. 142).

As leituras permitiram-nos compreender que a impossibilidade de exercício da faculdade deliberativa pelo escravo é o núcleo central do pensamento de Aristóteles contra a instituição escravidão, “a contrapartida exata da afirmação de que uma vida feliz apenas pode ser obtida através do desenvolvimento pleno [das] capacidades distintivamente humanas” (TIERNO, 2008, p. 142).

Fechando este parêntese, o nosso pensamento resgata a concepção de paciente de *Cavicchi*, em sua dimensão natural – paciente é aquele que deve aceitar as leis da natureza –, e a aproxima do escravo natural de Aristóteles. Esta reflexão sobre o desenvolvimento do real civilizatório inscreveu-nos vários movimentos. Não cabe comentá-los, mas deixar em aberto para que o leitor faça uso de sua reflexividade dirigida, caso deseje.

## 5 | O EXIGENTE

Os passeios possibilitaram a compreensão de que o paciente italiano “emancipou-se de seu paradigma original” que tinha sido interpretado de diversas maneiras, no curso da história, e se tornou um sujeito exigente. “Exigente no sentido de cobrar o seu direito à saúde como um direito exigível” (CAVICCHI, 2007, p.12). Cabe ressaltar que ele assinala que não há uma carga implícita de arrogância no uso do termo exigente, para representar o sujeito para o qual as ações se dirigem. Ele comenta que o verbo correspondente ao conceito de exigente – *esigere* (exigir) – carrega a particularidade de representar a ideia de algo que se pede com autoridade, uma coisa devida; sem arrogância, porque designa aquele que exige a garantia de seus direitos sociais conquistados.

“O direito à saúde [...] é uma das principais necessidades da sociedade moderna e da cidadania”. Mas, o que isto significa do ponto de vista político? Significa, para *Cavicchi*, que a exigência de cidadania, no contexto da vida italiana, constituiu-se [...] “no significado primário de ser [significa que] no curso do tempo, o cidadão tem conquistado uma autoridade”. Para o exigente, o direito à saúde é expresso como uma exigência política, como um direito de reivindicar a satisfação das suas exigências. Um exercício de autoridade, que traduz o poder político que lhe foi concedido por direitos. Ainda, segundo o autor, a base primária do princípio de autoridade do exigente encontra-se na conquista de saúde como direito, expressa no Artigo 32 da Constituição Italiana, na conquista do *Servizio Sanitario Nazionale*, em 1978 (CAVICCHI, 2007, p. 75).

Do ponto de vista político e considerando que o paciente se mostra aos serviços como exigente, o bem saúde possui “um valor que contempla [...] expectativas [...] de respeito e dignidade”. Neste caso, o bem saúde torna-se um bem moral e ético (CAVICCHI, p. 17). A noção de bem para o exigente é composta por duas dimensões: a dimensão institucional (em que o exigente vê a instituição que oferece um bem sanitário como uma realidade científica, técnica, organizacional e tecnológica); e a dimensão social (o exigente, antes de tudo, faz uma proposta social a si mesmo: de tornar-se um sujeito com o direito a ter preferências e de reivindicar algo maior, a ‘boa vida’) (CAVICCHI, 2007, p. 15).

O exigente vê-se cidadão; mesmo se doente, ele continua percebendo-se cidadão, diferentemente do paciente que sujeitava-se a abrir mão dessa condição. Em outra abordagem, “a condição de paciente anula a condição de cidadania” (CAVICCHI, 2007, p. 42). O exigente reconhece que é contribuinte, já que paga por meio do fisco sua contribuição social para financiar o sistema de saúde italiano. Ele sabe que paga as taxas obrigatórias – verdadeiros impostos sociais –, que correspondem a uma forma de contrato social do tipo *welfare* com o propósito de gerar recursos para que os benefícios sanitários sejam garantidos a ele quando portador de uma doença. O cidadão, portanto, é “a condição sobre a qual se funda a condição de exigente”

(CAVICCHI, 2007, p. 42).

*Cavicchi* comenta, ainda, que a questão saúde chama a causa democrática na forma de decisões responsáveis não unilaterais. O exigente é o cidadão que reivindica a definição de novas formas de decisões compartilhadas. Não é por acaso que muitos médicos de família falam há muitos anos sobre os “acordos” feitos, entre eles e sujeitos cuidados (CAVICCHI, 2007, p. 44).

Uma diferença entre o paciente/objeto clínico e o exigente/sujeito de cidadania é que para o primeiro a cidadania é apreendida como deveres, obrigações morais, do doente ou da instituição; para o segundo, como direitos (CAVICCHI, 2007, p. 43). A proposta do exigente é a de cidadão membro de uma comunidade, um sujeito para o qual os direitos e deveres coexistem, convencido de que a esfera dos seus deveres com relação à saúde seja igualmente importante da esfera dos seus direitos e da esfera de ser cuidado, se doente.

O exigente é também consumidor. Vale ressaltar que o consumo não é aqui entendido como um produto do mercado, isto é, o exigente-consumidor não é o mesmo consumidor da teoria econômica. O consumo, na perspectiva aqui descrita, é visto “como capacidade produtiva humana e como custo de reprodução da força de trabalho”. No âmbito da saúde é uma noção que acentua os aspectos da subsistência; logo, trata-se de um consumo necessário, comparável a todos os bens indispensáveis à sobrevivência: é nesta hermenêutica – de subsistência e de sobrevivência – que o exigente é, de fato, “um consumidor de bens indispensáveis” (CAVICCHI, 2007, p. 37).

O exigente-agente é visto, na maior parte das vezes, como *comunidades*, ou seja, como grupos de sujeitos que dividem a mesma doença, que se informam na internet e que dialogam com outros doentes em rede com o objetivo de construir uma comunidade de interesse. É, portanto, um sujeito em relação, ao mesmo tempo único e grupal, com um novo poder de contratação e nova capacidade relacional em contínua evolução. É também o exigente uma pessoa, em virtude das suas relações consigo e com o mundo: “somente uma pessoa (doente ou não) pode ser um sujeito de relações e somente um sujeito (doente ou não) pode ser uma pessoa” (CAVICCHI, 2007, p. 50; 65).

Ainda que o surgimento do exigente italiano seja um fato, *Cavicchi* ressalta que o *Serviço Sanitário Nacional* não reconhece o bem saúde da mesma forma que a sociedade italiana (exigentes) o reconhece. Ele comenta que o objetivo prioritário das administradoras regionais sanitárias italianas deveria ser eleito por aqueles que as financiam: a sociedade. No entanto, desde que o Estado italiano optou por uma reforma administrativa sanitária, *La Riforma De Lorenzo Garavaglia*, em 1992, seu objetivo tem sido “reduzir desperdícios e ineficiências” (CAVICCHI, 2007, p. 20).

Para ele, a Reforma deveria ter previsto as transformações do paciente para poder reformar o consumo sanitário, o uso da assistência e, em seguida, a estrutura de oferta e as modalidades produtivas. No entanto, decidiu-se por outro caminho para conter despesas oriundas das necessidades do exigente. Foram criadas as agências regionais, a partir de um pressuposto equivocado: substituir o sistema de

*welfare* (brilantemente conquistado pela Reforma Sanitária Italiana, em 1978, que deu origem ao *Servizio Sanitario Nazionale* pela gestão econômica. “Exatamente, por isto, a reforma nasce com uma função (anti)exigente” (CAVICCHI, 2007, p. 28). Os conflitos e tensões, portanto, são também um fato.

Este é o grande problema do *Servizio Sanitario Nazionale*, segundo *Cavicchi*: houve uma fratura entre as necessidades de saúde e o gasto sanitário; na época em que o livro *Autonomia e Responsabilità* foi escrito, o gasto representava simplesmente uma oferta na qual o nosso pobre *exigente* não conseguia se reconhecer; [...] disponibilizava-se ao *exigente* tudo aquilo que contemplaria um paciente, logo, tudo aquilo que era útil, vantajoso, racionalmente econômico e profundamente inapropriado; a administradora oferecia, na prática, a sua concepção de saúde e o *exigente* era aquele que sofria com esta oferta” (CAVICCHI, 2007, p.29). Mas, ele existe! O exigente italiano existe, pois “a figura do paciente não existe mais”. Não há dúvida de que da cultura, que se está difundindo, emerge um “doente” culturalmente diferente, “que recusa a passividade, a solidão, o delegar a confiança e a ignorância ao outro”. Ele refuta a sua antiga condição e os serviços não têm tido outro caminho senão reconhecê-lo exigente de seus direitos: reconhecê-lo cidadão (CAVICCHI, 2007, p. 51).

## 6 | CONSIDERAÇÕES

A atualização sobre a temática o *sujeito da clínica*, discorrida no artigo *Epistemologic Contributions of Ivan Cavicchi About The Clinic Subject*, publicado em 2017 em *FIEP Bulletin*, permitiu-nos coletar apontamentos mais detalhados para fundamentar sobre quem seria o *sujeito* daquela que temos chamado a boa clínica da ESF/AB e NASF do SUS, na perspectiva de clínica relacional sugerida por *Cavicchi*. Foi possível apreender que, respeitadas as múltiplas diferenças contextuais, entre o Sistema Único de Saúde e o *Servizio Sanitario Nazionale*, o *sujeito da boa clínica* assemelha-se ao da *clínica relacional*, cunhada por *Cavicchi*: são sujeitos não submetidos, mas emancipados, que participam das deliberações propostas pelos cuidadores, caso desejem, em uma clínica de base horizontal cuja finalidade é garantir promoção de saúde, prevenção de doenças, tratamento de doenças, e reabilitação com resolutividade, continuidade do cuidado e atenção longitudinal. Estudos históricos futuros são oportunos.

## REFERÊNCIAS

ALENCAR, R. A Política. Aristóteles. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAA6I4AC/a-politica-aristoteles>>. Acesso em: 16 jul. 2018.

ARISTÓTELES. **Política**. Tradução do grego, introdução e notas do Prof. Mário da Gama Kury. 3. ed. Brasília: UNB, 1997.

- BRASIL. **Portaria nº 2.436 de 21 de Setembro de 2017**. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes para a organização da Atenção Básica, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Disponível em: <foa.unesp.br/home/pos/ppgops/portaria-n-2436.pdf >. Acesso em: 15 jun. 2018.
- BRASIL. **Portaria GM nº 154, de 24 de janeiro de 2008**. Cria os Núcleos de Apoio à Saúde da Família - NASF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/prt0154\_24\_01\_2008.html>. Acesso em: 11 out. 2016.
- CANGUILHEM, Goerges. **O Normal e o Patológico**. 7. ed. São Paulo: Forense Universitária, 2011.
- CARDOSO, Luis Antonio. A. O conceito de racionalização no pensamento social de Max Weber: entre a ambiguidade e a dualidade. **Teoria e Sociedade**, n. 16.1, p. 256-75, jan-jun, 2008.
- CAVICCHI, I. **Autonomia e Responsabilità**. Bari: Dedalo, 2007.
- CAVICCHI, I. **La Quarta Riforma**. Roma: Quotidiano Sanità, 2018.
- FAPESC. Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina. **Pesquisadores da Univali avaliam impacto social do Mais Médicos em SC**. Disponível em: fapesc.sc.gov.br/pesquisadores-da-univali-avaliam-impacto-social-do-mais-medicos-em-sc. Acesso em 03 jul 2017.
- KASHIURA, Celso Naoto. Sujeito de Direito e Capitalismo. 2012. 177 f. Trabalho de conclusão de curso (**Tese**) – Faculdade de Direito, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- LYRA, Murilo; DA ROS, Marco Aurélio da; LIMA, Rita de Cássia Gabrielli Souza. Epistemologic Contributions of Ivan Cavicchi About the Clinic Subject. **FIEP Bulletin**, v. 87, (special edition), p. 126-9, 2017.
- LIMA, Rita de Cássia Gabrielli Souza. Concepções de médicos de família no Brasil e na Itália sobre autonomia e solidariedade: implicações éticas para o cuidado na atenção primária à saúde. 2008. 187 f. Trabalho de conclusão de curso (**Dissertação**) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- LIMA, Rita de Cássia Gabrielli Souza; VERDI, Marta Inez Machado. A solidariedade na medicina de família no Brasil e na Itália: refletindo questões éticas e desafios contemporâneos. **Interface** (Botucatu), v. 13, n. 29, p. 271-83, jun, 2009.
- LIMA, Rita de Cássia Gabrielli Souza. **Textos de apoio**. Disciplina de doutorado Filosofia e História da Ciência. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, UFSC, 2009.
- LIZ, Rafael Gustavo de; LIMA, Rita de Cássia Gabrielli Souza. Percepções de usuários sobre o impacto social do projeto de cooperação do Programa Mais Médicos: um estudo de caso. **Interface** (Botucatu), Botucatu, v. 21, supl. 1, p. 1281-1290, 2017.
- MIRANDA, Davi. Programa Mais Médicos: Uma política indutora de cidadania? 2018. Trabalho de conclusão de curso (**Dissertação em elaboração**) – Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Saúde e Gestão do Trabalho, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2018.
- SAES, Décio Azevedo Marques de. A questão da evolução da cidadania política no Brasil. **Estud. av.**, São Paulo, v. 15, n. 42, p. 379-410, ago, 2001.
- TIERNO, Patricio. Aristóteles. A teoria política da constituição e a deliberação. 2008. 314 f. Trabalho de conclusão de curso (**Doutorado**) – Programa de Pós-Graduação de Ciência Política. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- TOSI, Giuseppe. Aristóteles e a Escravidão Natural. **Boletim do CPA**, Campinas, nº 15, jan-jun. 2003.

## AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA EM SAÚDE: PERFIL DO USUÁRIO BRASILEIRO DO PROGRAMA FARMÁCIA POPULAR COM HIPERTENSÃO ARTERIAL DIAGNOSTICADA

### **Simone Bezerra Franco**

Universidade de Brasília, Faculdade Gama (UnB/FGA), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Brasília-DF, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/6672268373191579>

### **Ronni Geraldo Gomes de Amorim**

Universidade de Brasília, Faculdade Gama (UnB/FGA), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Brasília-DF, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/4086384842130773>

### **Marília Miranda Forte Gomes**

Universidade de Brasília, Faculdade Gama (UnB/FGA), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Brasília-DF, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/9169095482512290>

**RESUMO: Objetivo:** Analisar o perfil do usuário do Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPB) com Hipertensão Arterial (HA) diagnosticada, com base nos dados da PNS realizada em 2013, do confronto da legislação e das normas que regulam este assunto junto com a Avaliação de Tecnologia em Saúde (ATS). **Métodos:** estudo pautado no uso probabilístico da Regressão Logística (RL) na análise dos dados secundários da PNS. **Resultados:** este trabalho evidencia que 78,43% dos indivíduos diagnosticados com HA não obtém o medicamento via o PFPB. Outro resultado importante evidencia que as mulheres têm 6,2% maior probabilidade de fazerem uso do PFPB para obterem

medicamentos para HA. **Conclusão:** espera-se que os resultados descritos na pesquisa ajudem gestores e profissionais da tecnologia em saúde a operacionalizar melhor a distribuição de medicamentos para tratamento de HA oferecidos pelo PFPB.

**PALAVRAS-CHAVE:** Avaliação de Tecnologia em Saúde, Hipertensão Arterial, Programa Farmácia Popular do Brasil.

**ABSTRACT: Objective:** To analyze the user's profile of the Brazilian Popular Pharmacy Program (PFPB) with diagnosed Arterial Hypertension (HA), based on data from the PNS conducted in 2013, comparing the legislation and norms that regulate this subject together with the Evaluation of Technology in Health (ATS). **Methods:** A study based on the probabilistic use of Logistic Regression (RL) in the analysis of the secondary data of SNP. **Results:** This study shows that 78.43% of the individuals diagnosed with HA did not obtain the drug via PFPB. Another important finding is that women are 6.2% more likely to use PFPB to get HA medications. **Conclusion:** The results described in the research are expected to help health technology managers and professionals to better operationalize the distribution of HA treatment drugs offered by PFPB.

**KEY-WORDS:** Health Technology Assessment; Arterial Hypertension; Popular Program

## INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial (HA) é uma das causas mais comuns de doenças cardiovasculares, afetando aproximadamente 20% da população adulta em sociedades industrializadas. Pesquisas recentes revelaram que o número de óbitos ocasionados pela doença cardíaca hipertensiva tem crescido ao longo dos anos, avançando no ranking mundial de mortalidade da décima sexta para a décima posição entre os anos 2000 e 2012. A doença é um fator de risco para o desenvolvimento da doença coronária, no sentido em que acelera o processo de aterosclerose, sendo assim um fator determinante para o surgimento prematuro de morbidade e mortalidade cardiovascular associado à doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico e doença renal terminal (SANJULIANI, 2002). As causas da HA estão associadas aos seguintes fatores: envelhecimento; excesso de peso; baixa escolaridade; tabagismo; consumo de bebidas alcoólicas. No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos com causas conhecidas. Além disso, essas doenças foram a principal causa de hospitalização no setor público, entre 1996 e 1999, tendo respondido por 17% das internações de pessoas com idade entre 40 e 59 anos e 29% daquelas com 60 ou mais anos. Apesar da redução da mortalidade por essas doenças entre 2000 e 2007, esse grupo ainda representou a principal causa de óbito no país em 2011 (SCHMIDT *et al*, 2011).

Tendo em vista os malefícios que a HA traz não apenas aos indivíduos acometidos pela doença, mas a toda sociedade, organismos governamentais e não-governamentais demonstraram preocupação com o problema e formularam o Plano Global de Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), o qual estabeleceu meta de redução da HA em 25% entre 2015 e 2025. No Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das DCNT no Brasil 2011-2022, foram definidas diversas medidas de promoção da saúde e de atenção relacionadas à HA: acordos com a indústria alimentícia para redução do teor de sódio em alimentos processados, incentivo à prática de atividade física por meio do Programa Academia da Saúde e disponibilização gratuita de medicamentos para controle da HA segundo classificação de risco (ANDRADE *et al*, 2013). Sendo assim, aliado a essas medidas, o governo brasileiro instaurou o Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPPB).

Neste contexto, o PFPPB é uma iniciativa do Governo Federal que cumpre uma das principais diretrizes da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, a DCNT. Foi implantado por meio da Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004, que autoriza a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) a disponibilizar medicamentos mediante ressarcimento, e pelo Decreto nº 5.090, de 20 de maio de 2004, que regulamenta a Lei 10.858 e institui o PFPPB. A partir de 2011, o Programa passou a disponibilizar os medicamentos

indicados para o tratamento da hipertensão e do diabetes sem custos para os usuários. Esta campanha foi denominada “Saúde Não Tem Preço” (BRASIL, 2007). A Portaria 184/2011, assinada em 03 de fevereiro de 2011, determinou que, a partir do dia 14 de fevereiro, todas as farmácias da Rede Própria, bem como as farmácias e drogarias credenciadas do “Aqui Tem Farmácia Popular” ficassem obrigadas a praticar os preços de dispensação e os valores de referência até o dia 14 de fevereiro de 2011, garantindo, assim, a gratuidade para estes medicamentos (BRASIL, 2004) (BRASIL, 2005).

Estudos já realizados sobre o consumo dos medicamentos no PFPB, em todas as regiões, demonstram que de cada 11 medicamentos adquiridos no Programa, 10 deles, 64% são medicamentos que atuam sobre o sistema cardiovascular (ácido acetilsalicílico, atenolol, captopril, enalapril, hidroclorotiazida, metformina, nifedipina, omeprazol, ranitidina, sinvastatina e paracetamol), todos considerados essenciais pela lista oficial brasileira no controle da HA. Porém, mesmo com a disponibilização, por parte do governo, de um programa facilitador na obtenção dos medicamentos para tratar HA, o acesso aos medicamentos ainda encontra alguns entraves. Nesse sentido, diversos estudos realizados são motivados pela problematização da capacidade dos governos em prover assistência farmacêutica aos pacientes acometidos com doenças crônicas. Como exemplo desses trabalhos, podemos considerar a pesquisa de Costa *et al*, na qual estudaram as fontes de obtenção de medicamentos para hipertensão e diabetes no Brasil (COSTA *et al*, 2016).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho consistiu em analisar o perfil dos usuários do Programa Farmácia Popular do Brasil por meio dos dados disponíveis na Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizada no ano de 2013. E para nortear o delineamento do mesmo, partiu-se das seguintes questões: ***Qual é o perfil brasileiro do usuário do Programa Farmácia Popular do Brasil com Hipertensão Arterial diagnosticada? E que contribuições o conhecimento destes perfis do PFPB, serão relevantes para a Tecnologia em Saúde?*** De posse dos dados secundários da PNS, realizou-se o estudo estatístico de Regressão Logística (RL).

## MÉTODOS

A pesquisa oriunda deste artigo é classificada como um estudo descritivo e exploratório, utilizando dados da PNS realizada em 2013 e o uso da RL.

A PNS é uma pesquisa de base domiciliar, de âmbito nacional, com amostra de 80.000 domicílios em 1.600 municípios, realizada em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A pesquisa foi planejada para ser representativa para Brasil, Grandes Regiões, Unidades Federativas, Capitais, áreas urbanas e rurais<sup>7</sup>. Porém, efetivamente, foram entrevistados 64.348 domicílios, sendo que 60.202 moradores responderam as questões relativas ao seu estilo de vida, estado de saúde e doenças crônicas. Os detalhes acerca da técnica de amostragem utilizada estão

disponíveis no relatório sobre os resultados da PNS (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

A PNS foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde, sob o Parecer nº 328.159, de 26 de junho de 2013. A participação do adulto na pesquisa foi voluntária e a confidencialidade das informações garantida. Os adultos selecionados para responder à entrevista e que concordaram em participar dela assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

Os inquéritos populacionais de saúde, ademais de levantarem informações importantes para avaliação de saúde da população e seus estilos de vida, permitem a verificação de indicadores de desempenho do sistema de saúde do ponto de vista do usuário, de modo a subsidiar a formulação, o monitoramento e a avaliação das políticas públicas de saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

Nesse sentido, abordou-se duas questões pertencentes ao módulo Q do questionário da PNS – questões relativas às doenças crônicas, quais sejam: Q002 e a Q008. Essas perguntas indagavam ao entrevistado o seguinte:

Q002: Algum médico já lhe deu o diagnóstico de Hipertensão Arterial (pressão alta)?

1. Sim                      2. Apenas durante a gravidez                      3. Não

Q008: Algum dos medicamentos para hipertensão arterial foi obtido no Programa Farmácia Popular do Brasil?

1. Sim, todos                      2. Sim, alguns                      3. Não, nenhum

Dentre todas as questões elencadas na PNS, essas foram escolhidas como objeto deste estudo porque pretendia-se, num primeiro momento, elaborar um mapeamento descritivo do perfil do usuário da Farmácia Popular com HA diagnosticada, e em contrapartida estabelecer uma correlação entre os indivíduos com tal doença crônica diagnosticada e a utilização dos medicamentos para pressão alta oriundos do PFPB. Com isso, os dados analisados foram obtidos no banco de dados da PNS realizada em 2013, cujas informações e dados estão disponíveis em <http://www.pns.icict.fiocruz.br/> e também na referência (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

O uso da RL nesse trabalho é vantajoso, pois sua abordagem é probabilística, e acompanhado dos dados da PNS tornará o estudo naturalmente mais claro e eficaz. No problema levantado no início do trabalho, sabe-se que a variável dependente é qualitativa (fracasso ou sucesso de ser usuário do PFPB). Portanto, um modelo como o de Regressão Linear não satisfaz a restrição imposta pela variável dependente, já que os valores estimados para  $Y$ , nesta técnica, não possuem limites inferiores e superiores. É preciso, então, usar um modelo que atenda a necessidade de que os estimadores da variável de resposta se mantenham entre 0 e 1.

A RL é mais utilizada porque a análise discriminante impõe às variáveis independentes condições como: serem normalmente distribuídas e terem suas matrizes de variância-covariância iguais entre os dois grupos de classificação (WEISBERG, 2005). Em uma análise de RL o foco de interesse está na dependência estatística das variáveis, isto significa dizer que, nas relações estatísticas o estudo é feito com variáveis aleatórias ou estocásticas, ou seja, num processo com possibilidade de erros.

Dessa forma, foi considerado como variável dependente o uso ou não do Programa Farmácia Popular do Brasil, classificada em duas categorias (0= fracasso (não usuário do PFPB), 1=sucesso (usuário do PFPB)). Foi construído, didaticamente, um modelo considerando seis variáveis explicativas: uma variável quantitativa – idade, duas variáveis qualitativas com duas categorias – sexo – cor ou raça, três variáveis qualitativas com mais de duas categorias – estado civil – grau de escolaridade – região e uma variável condicional binária – diagnóstico de Hipertensão Arterial. Todas as variáveis descritas estão pautadas na bibliografia que está sendo utilizada no trabalho.

As análises dos dados foram realizadas pelo *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão IBM 19 (SPSS, 2001) (GUIMARÃES, 2015).

## RESULTADOS

Na Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2013 foram entrevistados 205.546 indivíduos, dos quais 13.327 são hipertensos e desses indivíduos diagnosticados com HA, apenas 2.874 fazem uso de medicamentos do Programa Farmácia Popular do Brasil.

Na Tabela 1, a coluna 1 descreve as variáveis utilizadas no trabalho, bem como suas unidades; enquanto a coluna 2 descreve a porcentagem de cada unidade. A análise descritiva foi realizada no programa *SPSS*. É importante ressaltar que na coluna 1 as idades foram agrupadas em classes, onde a classe 1 corresponde a jovens (18 a 24 anos de idade), a classe 2 a adultos (25 a 59 anos de idade) e a classe 3 refere-se à terceira idade (a partir de 60 anos de idade). A cor ou raça ficou agrupada da seguinte forma: branca (amarela e branca) e não-branca (preta, parda e indígena).

A Tabela 1 mostra que esse subgrupo populacional, os indivíduos com HA que faz uso do PFPB, é caracterizado principalmente por indivíduos do sexo feminino (67,4%), com 60 anos ou mais (49,9%), que declararam cor/raça como não branca (54,5%), de baixa escolaridade (47,70%) e casados (46,3%). As regiões Sudeste (31,1%) e Nordeste (24,8%) detêm a maioria desses usuários. Esses resultados convergem aos apresentados no trabalho (ANDRADE *et al*, 2013) (BRASIL, 2004). Contudo, naquele estudo se restringiu a um levantamento da prevalência de Hipertensão Arterial autorreferida na população adulta brasileira. Percebe-se que os indivíduos que sofrem de HA e utilizam o PFPB para ter acesso aos medicamentos são mais prevalentes em classes similares aos indivíduos de possuem HA autorreferida. Por exemplo, na

pesquisa de Andrade *et al*, foi apontado a prevalência da HA autorreferida foi maior entre as mulheres (ANDRADE *et al*, 2013). Enquanto isso, os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que o percentual de mulheres que sofrem de HA e fazem uso do PFPB é bem superior ao dos homens.

Os resultados da Tabela 1 demonstram ainda que os indivíduos com menos grau de instrução, com idade superior a 60 anos, casados e não-brancos fazem maior uso do PFPB. Tal resultado vai ao encontro dos achados no artigo do Andrade *et al.*, o qual indicou que a menor prevalência de HA autorreferida foi observada na faixa etária de 18 a 29 anos, enquanto a maior foi encontrada entre indivíduos com 75 e mais anos de idade. Além disso, naquele mesmo estudo foi indicado que adultos com menor nível de escolaridade e pessoas não brancas apresentaram a maior prevalência de HA autorreferida.<sup>3</sup>

Na Tabela 1 observa-se que na região Sudeste é onde se encontra a maior quantidade de usuários do Programa Farmácia Popular do Brasil com HA diagnosticada, convergindo mais uma vez ao resultado do estudo realizado por Andrade *et al*, 2013.

Características		%
Sexo	Homem	32,60
	<b>Mulher</b>	<b>67,40</b>
Idade	18 a 24 anos	0,30
	25 a 59 anos	49,80
	<b>60 a 95 anos</b>	<b>49,90</b>
Cor ou Raça	Branca	45,50
	<b>Não Branca</b>	<b>54,50</b>
Escolaridade	<b>Alfabetização</b>	<b>30,10</b>
	Ensino Fund.	17,60
	Ensino Médio	26,80
	Graduação	8,60
	Pós-Graduação	0,40
Estado Civil	<b>Casado</b>	<b>46,30</b>
	Separado/Divorciado	11,10
	Viúvo	20,30
	Solteiro	22,30
Região	Norte	13,30
	Nordeste	24,80
	<b>Sudeste</b>	<b>31,10</b>
	Sul	17,10
	Centro-Oeste	13,60
<b>Tamanho da Amostra</b>		<b>2.874</b>

Tabela 1. Perfil descritivo dos usuários do PFPB diagnosticados com HA, Brasil, 2013. (Elaborado pelo autor com base nos dados da PNS, acesso em fev., 2016).

A Tabela 2 traz os resultados da Regressão Logística. Essa técnica estatística é baseada nas características dos fatores das variáveis explicativas, sendo comparadas entre si, atribuindo-se aquela de maior probabilidade.

Na Tabela 2 a coluna 1 descreve as variáveis explicativas utilizadas do trabalho, na coluna 2 encontra-se as unidades das variáveis. Já na coluna 3 encontra-se descrito o coeficiente de  $\beta$ , ou seja, mostra o ajustamento do modelo de regressão, em relação aos valores observados. Este coeficiente varia entre 0 e 1, indicando, em porcentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Na coluna 4 apresenta-se a Razão de Chance (RC) dos eventos relacionados a coluna 3 acontecer e é descrita na forma de porcentagem (%) e a última coluna descreve o p-valor, ou seja, é a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, sob a hipótese nula. Trazendo para realidade do trabalho proposto o p-valor significa sucesso (1) ou fracasso (0) do indivíduo com HA diagnosticada usar ou não o PFPB, levando em consideração o Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Observando a Tabela 2 constata-se que dentre os indivíduos com HA diagnosticada, aqueles que se declaram não-brancos apresentam a probabilidade de utilizar os medicamentos do PFPB 12,6% maior que os indivíduos que se declaram brancos. Esse dado é advindo da coluna intitulada Razão de Chance (RC).

No que concerne o estado civil, em relação aos indivíduos casados, os indivíduos solteiros apresentam uma probabilidade 8,1% maior de fazer uso dos medicamentos do PFPB para obter os medicamentos para controle da HA. Os indivíduos separados/divorciados têm a mesma probabilidade de fazer uso do PFPB 4,7% maior que os indivíduos casados. Nesse mesmo escopo, os viúvos possuem a chance de utilizar o PFPB 0,8% maior que os casados, conforme consta na Tabela 2.

VARIÁVEIS	UNIDADES	COEFICIENTE ( $\beta$ )	RC (Exp. $\beta$ )	p-valor (Sig)
Cor ou Raça <sup>a</sup>	Branca	-	1	-
	<b>Não Branca</b>	<b>0,119</b>	<b>1,126</b>	<b>0,052</b>
Estado Civil	Casado	-	1	-
	Separado/divorciado	0,046	1,047	0,079
	Viúvo	0,003	1,003	0,071
	Solteiro	0,078	1,081	0,062
Escolaridade <sup>b</sup>	Alfabetização	-	1	-
	Ensino Fundamental	-0,047	0,954	0,070
	Ensino Médio	-0,031	0,969	0,061
	Graduação	-0,502	0,605	0,083
	Pós Graduação	-1,077	0,340	0,312
Região	Norte	-	1	-
	Nordeste	-0,203	0,816	0,081
	Sudeste	0,312	1,366	0,081
	Sul	0,393	1,481	0,093
	Centro Oeste	0,135	1,145	0,093
Idade	18 à 24 anos	-	1	-
	25 à 59 anos	0,523	1,687	0,396
	60 à 150 anos	0,526	1,692	0,398

Sexo	Homem	-	1	-
	<b>Mulher</b>	<b>0,060</b>	<b>1,062</b>	<b>0,052</b>

Tabela 2. Perfil dos usuários do Programa Farmácia Popular do Brasil diagnosticados com Hipertensão Arterial com uso da Regressão Logística, Brasil, 2013. (Elaborado pelo autor com base nos dados da PNS, acesso em fevereiro, 2016).

<sup>a</sup> Cor da pele autorrelatada, segundo classificação do IBGE, 2010. <sup>b</sup> Segundo classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010

Em relação ao nível de escolaridade, percebe-se que quanto maior o tempo do indivíduo na escola, menor a probabilidade de ele fazer uso dos medicamentos do Programa. Em relação aos indivíduos que possuem apenas nível de Alfabetização, os que possuem Ensino Fundamental apresentam uma probabilidade 4,7% menor de fazer uso do PFPB para obter os medicamentos para HA via PFPB. Aqueles que possuem Ensino Médio apresentam uma chance 3,1% menor de utilizar o PFPB para obter o medicamento para HA. A maior redução de probabilidade de uso dos medicamentos da Farmácia Popular é observada nos indivíduos que possuem Graduação e Pós-Graduação. Dentre os graduados, verifica-se uma probabilidade 39,5% menor em comparação aos indivíduos alfabetizados, enquanto dentre os Pós-Graduados essa chance cai 66% em relação aqueles que possuem apenas alfabetização. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

Quando comparados aos indivíduos da região Norte, percebe-se que os indivíduos da região Nordeste possuem uma chance 18,4% menor que fazerem uso dos medicamentos para HA da Farmácia Popular. No mesmo parâmetro, ou seja, utilizando a região Norte como referência, os sujeitos da região Sudeste possuem uma probabilidade 36,6% maior de utilizarem os medicamentos do PFPB. Os indivíduos da região Sul possuem 48,1% maior probabilidade de fazer uso do PFPB para obter os medicamentos para HA, enquanto os da região Centro-Oeste têm essa chance aumentada de 14,5% em relação aos da região Norte.

No que concerne à idade, em relação aos sujeitos com idade entre 18 e 24 anos, os indivíduos que possuem entre 25 e 59 anos apresentam uma probabilidade 68,7% maior de fazerem uso do PFPB para obterem os medicamentos para HA, enquanto que aqueles que possuem idade maior ou igual a 60 anos apresentam a mesma chance 69,2% maior quando comparados aos jovens.

Em relação ao sexo, as mulheres com HA diagnosticada apresentam uma probabilidade 6,2% maior de fazerem uso do PFPB para obtenção dos medicamentos para HA que os homens.

Ao se fazer referência a região de maiores probabilidades de uso do PFPB a região Sudeste e Sul se encontram em maioria de estados contemplados, foi evidenciada em estudos realizados sobre o Programa que houve a implantação de maior número de unidades nos estados e municípios dessas regiões (PINTO; COSTA e CASTRO, 2011). No entanto, ao longo do tempo, está sendo incrementado o Programa nas outras regiões do Brasil. Na Região Norte por se tratar de uma região de grande

extensão demográfica, de locais longínquos e de poucos municípios a expansão de forma satisfatória o Programa encontra-se ainda em evolução.

## DISCUSSÃO

Os resultados da PNS sugerem que aproximadamente 23% da população brasileira já teve HA diagnosticada. No período de 2006 a 2011, essa prevalência aumentou progressivamente com a idade e foi maior entre mulheres e adultos de menor escolaridade (zero a oito anos de estudo) (ANDRADE *et al*, 2013).

Contudo, os resultados deste trabalho demonstraram que dentre os indivíduos diagnosticados com HA, segundo a PNS, apenas 21,57% faz uso do PFPB para obter algum dos medicamentos para controle da HA. Esse percentual é considerado pequeno, tendo em vista que esse programa proposto pelo governo federal foi idealizado para ser abrangente. Com as informações acima descritas espera-se que um percentual maior de indivíduos diagnosticados com HA consiga ter acesso aos medicamentos oferecidos pelo PFPB, uma vez que dos 13.327 apenas 2.874 fazem uso do Programa.

Observando os dados contidos na Tabela 2, pode-se tecer algumas observações relevantes. A primeira delas é em relação ao sexo dos entrevistados com HA diagnosticada e que faz uso do PFPB, onde há uma predominância de mulheres ( $p$ -valor = 0,052). E a segunda é em relação à cor da pele, o número de indivíduos que se declararam não-brancos também é significativo ( $p$ -valor = 0,052).

Os demais resultados na Tabela 2 observados neste trabalho como a prevalência de indivíduos com maior grau de instrução apresentar menor probabilidade de ser usuários do PFPB pode estar relacionado ao fato que usualmente indivíduos com maior escolaridade terem uma renda melhor e por isso não procuram o programa. Ainda pode-se ressaltar que o maior quantitativo de usuários do Programa se encontra nas regiões Sul e Sudeste, possivelmente esse achado esteja diretamente ligado ao fato dessas regiões serem mais populosas e desenvolvidas e pelo maior acesso a informações sobre como adquirir os medicamentos para controle de HA via PFPB. Enquanto as outras regiões com menor chance de apresentar usuários do programa com HA diagnosticada, sugere-se que as ações do Governo devem priorizar essas áreas do País onde a informação ainda não está difundida e enfocar, globalmente, a prevalência de todos os fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Com relação à raça/cor da pele, estudos apontam que a morbimortalidade em decorrência da HA e de outras doenças crônicas é maior entre pessoas de raça/cor da pele preta (BARROS *et al*, 2011) (LOTUFO & BENSENOR, 2013). Uma possível explicação para esse resultado estaria na fragilidade de uma associação entre raça ou cor da pele e hipertensão e outras doenças crônicas, posto que a raça/cor consiste em um marcador influenciado por uma interação complexa entre fatores genéticos e desigualdades nas condições de vida, ambos com poder de influência na adoção

de comportamentos saudáveis ou prejudiciais à saúde. A redução da prevalência da HA não se resume à meta global de redução da ocorrência da doença em 25%, a ser atingida até 2015. Sua consecução influencia diretamente o alcance da meta de redução da taxa de mortalidade prematura (entre <70 anos) por DCNT (ANDRADE *et al*, 2013).

O acesso a este resultado sugere algumas hipóteses, dentre as quais, destacam-se como principais: o fato de o diagnosticado com HA nunca ter obtido o medicamento via o PFPB pode ter relação com algum problema de divulgação ou publicidade do programa; os medicamentos podem estar mal distribuídos por regiões. Sendo assim, na tentativa responder a tais hipóteses, um estudo com mais detalhes deve ser realizado, destacando as minúcias regionais dos indivíduos portadores de pressão alta e sua necessidade por medicamentos. Com essas pesquisas, obtém-se não apenas o melhoramento do PFPB, como também um tratamento mais eficaz da HA.

Os trabalhos já publicados a respeito do PFPB com base na PNS relacionados a HA, não fazem menção a ATS, nem correspondência ao Engenheiro Biomédico nem tão pouco trata do perfil do usuário. O trabalho mais recente publicado pela revista Epidemiologia Serviço de Saúde em jan-março de 2016 trata apenas da obtenção de medicamentos através do PFPB, e abrange tanto hipertensos como diabéticos (COSTA *et al*, 2016).

## CONCLUSÃO

O trabalho pretendeu mostrar o perfil do usuário do PFPB com HA diagnosticada. Constatou-se que ainda é pequena a aquisição de medicamentos para controle da HA no PFPB, não se sabe se é por conta da gestão do programa ou outro motivo alheio a esta pesquisa. Enfim, conhecer esse perfil do usuário do PFPB é importante para a gestão do programa, tanto a nível do indivíduo, quanto a nível do território. Portanto, vale muito mais a pena investir fortemente em educação e prevenção de tratamento da HA do que deixá-lo chegar a altos níveis de complicações que irão elevar os custos da saúde pública.

A economia da saúde é uma área que envolve tanto conceitos e conhecimentos da medicina, como princípios da economia, de modo a fornecer um grande potencial de contribuição para a visibilidade do impacto das doenças pelos gestores de saúde. Esses resultados encontrados sugerem a reflexão e a revisão, por parte do Ministério da Saúde no gerenciamento do PFPB. Sendo assim, o governo federal, estadual e municipal deve se comprometer em uma ação conjunta (independente de controles partidários) para efetuarem o planejamento do cuidado integral com o portador de HA, o que envolveria a inclusão de ações educativas e exames na rotina das unidades de atenção básica à saúde e a criação de ambulatórios especializados no tratamento desses pacientes, para onde seriam referenciados os casos com riscos de complicações.

No estudo em questão não é possível afirmar as causas de muitos indivíduos que foram diagnosticados com HA não serem usuários do PFPB. Existem hipóteses positivas como a presença contínua de medicamentos nas unidades ou o bom atendimento oferecido; e as negativas, para o SUS, como a falta de medicamentos ou a insatisfação com o atendimento na rede pública. Mas o fato é que muitos usuários que deveriam estar obtendo seus medicamentos de forma gratuita vêm optando por obtê-los por outros meios de assistência à saúde ou reembolso próprio.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, Silvana Suely de *et al.* **Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira**, 2013. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 24(2): 297-304, abr-jun 2015. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/ress/v24n2/2237-9622-ress-24-02-00297.pdf>. Acesso em: abril de 2016.

BARROS MBA, *et al.* **Tendências das desigualdades sociais e demográficas na prevalência de doenças crônicas no Brasil**, PNAD: 2003- 2008. Cienc. Saúde Coletiva. 2011 set;16(9):3755-68.

BRASIL. **Projeto de Lei do Senado nº 219, de 2007**. Altera a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a oferta de procedimentos terapêuticos e a dispensação de medicamentos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília: Senado Federal; 2007.

BRASIL. **Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004**. Autoriza a Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz a disponibilizar medicamentos, mediante ressarcimento, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 2004 abr 14; Seção 1:1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Programa Farmácia Popular do Brasil: manual básico / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. 102 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

COSTA, K. S., *et al.* **Obtenção de medicamentos no Programa Farmácia Popular do Brasil**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 25(1):33-44, jan-mar 2016.

GUIMARÃES, Juliana Bahiense de Souza. **Análise Estatística utilizando o SPSS – guia prático de comandos**. Salvador – Bahia. Disponível em <http://www.prograd.uff.br/estatistica/sites/default/files/Apostila-SPSS.pdf>. Acesso em dezembro de 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde: 2013**. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014 [citado 2014 dez 22]. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>.

LOTUFO, PA & BENSONOR, IJM. **Raça e mortalidade cerebrovascular no Brasil**. Rev. Saúde Pública. 2013 dez;47(6):1201-4.

PINTO, C.D.B.S.; COSTA, N.R. e CASTRO, C.G.S.O. de. **Quem acessa o Programa Farmácia Popular do Brasil? Aspectos do fornecimento público de medicamentos**. Revista de Ciência & Saúde Coletiva, 2011. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232011000600034](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000600034). Acesso: setembro de 2016.

SANJULIANI, A F. **Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica**. Revista da SOCERJ, Vol XV No 4. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <http://www.rbconline.org.br/artigo/fisiopatologia-da-hipertensao-arterial-conceitos-teoricos-uteis-para-a-pratica-clinica/> Acesso outubro de 2016.

SCHMIDT, M. I. *et al.* **Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges.** *The Lancet*, London: The Lancet Publications; Oxford: Elsevier, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, June 4, 2011. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(11\)60135-9/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(11)60135-9/fulltext)>. Acesso em: junho, 2016.

SPSS Inc. **Statistical Analysis Using SPSS.** Chicago. 2001. Disponível em: [http://www.academia.dk/BiologiskAntropologi/Epidemiologi/PDF/SPSS\\_Statistical\\_Analyses\\_using\\_SPSS.pdf](http://www.academia.dk/BiologiskAntropologi/Epidemiologi/PDF/SPSS_Statistical_Analyses_using_SPSS.pdf). Acesso em: dezembro, 2015.

WEISBERG, S. **Applied Linear Regression.** 3<sup>a</sup> Edição, John Wiley and Sons, Inc., New York, 2005.

## ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA COM SORO DO LÁTEX DE *HIMANTHUS SUCUUBA*

**Janeth Silva Pinheiro Marciano**

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

**Renan Gonçalves da Silva**

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
(UNESP) – São Paulo

**Juliana da Silva Coppede**

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

**Sonia Marli Zingaretti**

Unidade de Biotecnologia (UNAERP) – São Paulo

**RESUMO:** A aplicação tópica de plantas medicinais tem sido utilizada na medicina popular para a cicatrização de feridas, no entanto, o mecanismo exato do processo de cicatrização não é muito bem esclarecido. O látex de *Himatanthus sucuuba* apresenta alguns compostos de interesse farmacológico e pode ser empregado em diversos tratamentos. O objetivo do estudo foi realizar um teste de agregação plaquetária com o soro do látex de *H. sucuuba*, para a compreensão inicial da presença de atividade proteolítica. 50 mL de sangue foram coletados e centrifugado para separação do plasma. Realizou-se o ensaio de agregação plaquetária pela adição do agonista fisiológico vitamina K e pela adição do soro de *H. sucuuba* em duas concentrações (70 e 350  $\mu\text{g/mL}$ ). A agregação foi determinada quando o plasma apresentou características de turbidez ou coagulação. O tempo de coagulação foi

mensurado. A análise foi feita em triplicata e a comparação de médias realizada pelo programa estatístico Agroestat. O soro do látex de *H. sucuuba* promoveu a agregação plaquetária no plasma humano nas concentrações utilizadas. A concentração de 350  $\mu\text{g/mL}$  do soro foi mais eficiente, com tempo de médio de coagulação de 5 minutos. As proteínas presentes no soro do látex de *H. sucuuba* podem interferir no sistema hemostático. O presente trabalho é o primeiro estudo que relata a possível presença de proteínas coagulantes no soro do látex dessa espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** coagulação, látex, planta medicinal, proteínas.

**ABSTRACT:** The topical application of medicinal plants has been used in folk medicine for wound healing, however, the exact mechanism of the healing process is not very well understood. Latex of *Himatanthus sucuuba* presents some compounds of pharmacological interest and can be used in several treatments. The objective of the study was to perform a platelet aggregation test with the serum of *H. sucuuba* latex, for the initial understanding of the presence of proteolytic activity. 50 mL of blood were collected and centrifuged for separation from the plasma. The platelet aggregation assay was performed by addition of the physiological vitamin K agonist and the addition of *H. sucuuba* serum

at two concentrations (70 and 350 µg/mL). Aggregation was determined when plasma showed turbidity or coagulation characteristics. Coagulation time was measured. The analysis was done in triplicate and the comparison of means performed by the statistical program Agroestat. The latex serum of *H. succuba* promoted platelet aggregation in human plasma at the concentrations used. The serum concentration of 350 µg/mL was more efficient, with coagulation mean time of 5 minutes. The proteins present in the serum of *H. succuba* latex may interfere with the hemostatic system. The present work is the first study that reports the possible presence of coagulant proteins in the latex serum of this species.

**KEYWORDS:** coagulation, latex, medicinal plant, proteins.

## INTRODUÇÃO

A aplicação tópica de plantas medicinais (látex, folhas, raízes, caule) tem sido utilizada na medicina popular para a cicatrização de feridas, no entanto, o mecanismo exato do processo de cicatrização não é plenamente esclarecido. Coagulação e fibrinólise são dois eventos proteolíticos importantes na cicatrização de feridas e reparo tecidual, essa atividade proteolítica encontra-se presente no látex de muitas plantas medicinalmente importantes.

O látex é uma complexa emulsão composta por proteínas, alcalóides, açúcares, amido, borracha, que muitas vezes acaba por coagular quando exposto ao ar (HAGEL et al., 2008). Estão presentes nos vasos laticíferos que são células secretórias alongadas do sistema laticífero (MAHLBERG, 1993; METCALFE, 1967). Estudos fisiológicos mostraram que o látex está associado a metabólitos vitais na defesa das plantas contra insetos (KEKWICK, 2001).

Segundo Alam et al., (2011), o látex extraído de diferentes espécies como de *Datura stramonium* L. (Solanaceae), *Euphorbia antiquorum* L. (Euphorbiaceae), *Euphorbia pilosa* (Euphorbiaceae), *Pelilanthus tithmaloids* (Euphorbiaceae), *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae), *Alstonia scholaris* R.Br. (Apocinaceae), *Calotropis procera* Br (Asclepidaceae) apresenta propriedades curativas em feridas e queimaduras.

O látex de *Ficus carica* é uma fonte rica de agentes antioxidantes naturais com características estabelecidas de atividade anti-carcinogênica que podem ser usadas em e Indústrias biofarmacêuticas (HASHEM et al., 2017). Em *Asclepias curassica* L., *Calotropis gigantea* R. Br., *Pergularia extensa* R. Br. e *Cynanchum puciflorum* R. Br. foi identificado uma cisteína protease que exibe ação de trombina e plasmina validando o uso popular do látex dessas plantas para estancar sangramento e cicatrizar feridas (SHIVAPRASAD et al., 2009).

No látex de *Synadenium grantii* há uma grande quantidade de proteases, enzimas hidrolíticas que desempenham importante função na fisiologia das plantas e apresentam diversas ações farmacológicas, interferindo na hemostasia. Também foi relatado nesta espécie o isolamento e caracterização de uma protease (glicoproteína)

que possui atividade fibrinolítica (RAJESH et al., 2006).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, apresenta-se como um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia (GEBHARDT, 2000).

O látex de *Himatanthus sucuuba* apresenta alguns compostos de interesse farmacológico, e tem sido muito utilizado em diversos tratamentos. A importância do gênero *Himatanthus* na medicina popular é considerável, visto que existem relatos de uso em diferentes comunidades locais no Brasil. Algumas preparações a partir da casca e do látex para diversos tratamentos são comercializadas (FERREIRA et al., 2009).

O látex dessa planta apresenta alguns compostos, como iridóides (plumieride, isoplumieride) (BARRETO et al., 2007), terpenos (acetato de lupeol,  $\alpha$ -amirina) (de MIRANDA et al., 2000), miscelaneos (cis-poliisoprene, arabinose, glicose, xilose) (SILVA et al., 2003) e compostos fenólicos (catecol, quercitrin) que apresentam propriedades biológicas interessantes como anti-inflamatória, anti-tumoral e analgésica (de MIRANDA et al., 2000).

Recentemente, muitas proteínas têm sido identificadas em diferentes espécies vegetais e em diferentes partes da planta, como nas folhas, caules, raízes e látex. Desse modo, objetivou-se realizar um teste de coagulação (agregação plaquetária) com o soro do látex de *H. sucuuba*, para a compreensão inicial da presença de atividade proteolítica no látex dessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sangue fresco (50 mL) foi centrifugado a 10°C, 12.000g, para separação do plasma. Realizou-se o ensaio de agregação plaquetária pela adição do agonista fisiológico (controle) - Vitamina K (1 mg/mL) e pela adição do soro de *H. sucuuba* em duas concentrações (70 e 350  $\mu$ g/mL).

A agregação foi considerada positiva quando observado o plasma com características de turbidez ou coagulação. O tempo total de coagulação foi mensurado por contador de tempo automático. As análises foram realizadas em triplicata. A análise de variância e o teste de comparação de médias (Teste de Tukey) foi realizado pelo programa estatístico Agroestat 1.1 (BARBOSA; MALDONADO JUNIOR, 2015).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O soro do látex de *H. sucuuba*, promoveu a agregação plaquetária no plasma humano nas duas concentrações utilizadas (Figura 1).

A concentração de 70  $\mu$ g/mL de soro promoveu a agregação total da amostra no tempo médio de 10 minutos, diferente do observado para a concentração de 350  $\mu$ g/

mL, com resultado mais satisfatório - tempo médio de coagulação do plasma sanguíneo em 5 minutos, estatisticamente similar ao resultado apresentado pelo teste controle, com a Vitamina K (Tabela 1).

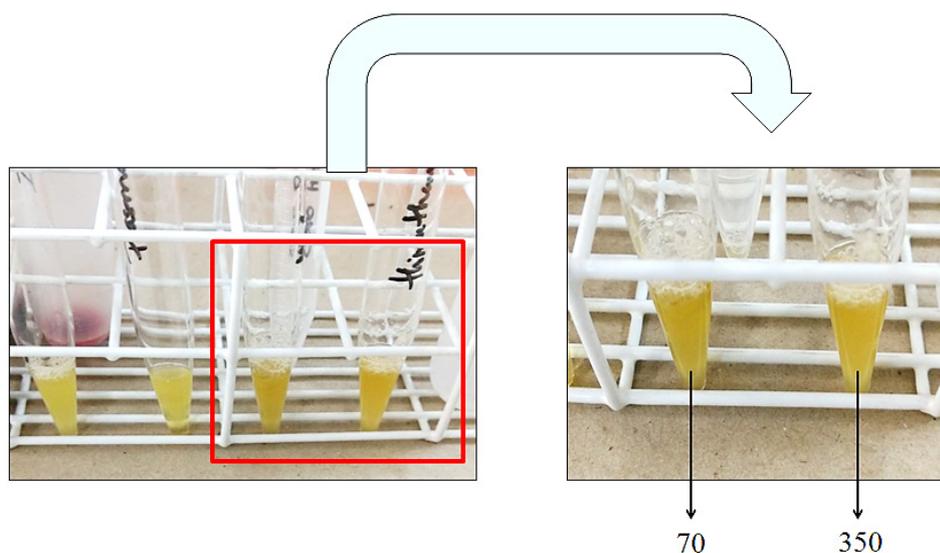


Figura 1. Agregação plaquetária nos diferentes tratamentos.

Fonte: autores.

Tratamento (amostra)	Quantidade da amostra por 1 mL de plasma	Tempo médio de coagulação (min) <sup>1</sup>
Vitamina K	350 ug	3 a
Soro	70 ug	10 b
	350 ug	5 a

Tabela 1. Tempo médio de coagulação, utilizando-se o soro do látex de *H. succuba* e controle (vitamina K).

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 1%.

O coeficiente de variação experimental (CV) foi de 7,85, o que representa ótima acurácia. Os dados indicam que o teste apresentou significância considerável ( $P < 0,0001$ ) (Figura 2).

#### Análise de Variância para Efeitos de Tratamentos

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamentos	2	79,166666667	39,583333333	178,13**<	0,0001
Resíduo	6	1,333333333	0,222222222		-
Total	8	80,500000000			-

Média Geral.....: 6,0000000  
 Desvio Padrão.....: 0,4714045  
 Erro Padrão da Média...: 0,2721655  
 Coeficiente de Variação: 7,8567420

Figura 2. Análise de variância dos dados.

Biomembranas, géis e pomadas com propriedades biológicas podem ser confeccionados a partir do látex de diversas espécies vegetais. O soro obtido a partir do látex de *H. succuba* pode apresentar propriedades interessantes para futuras aplicações na área médica e farmacêutica (Figura 3).

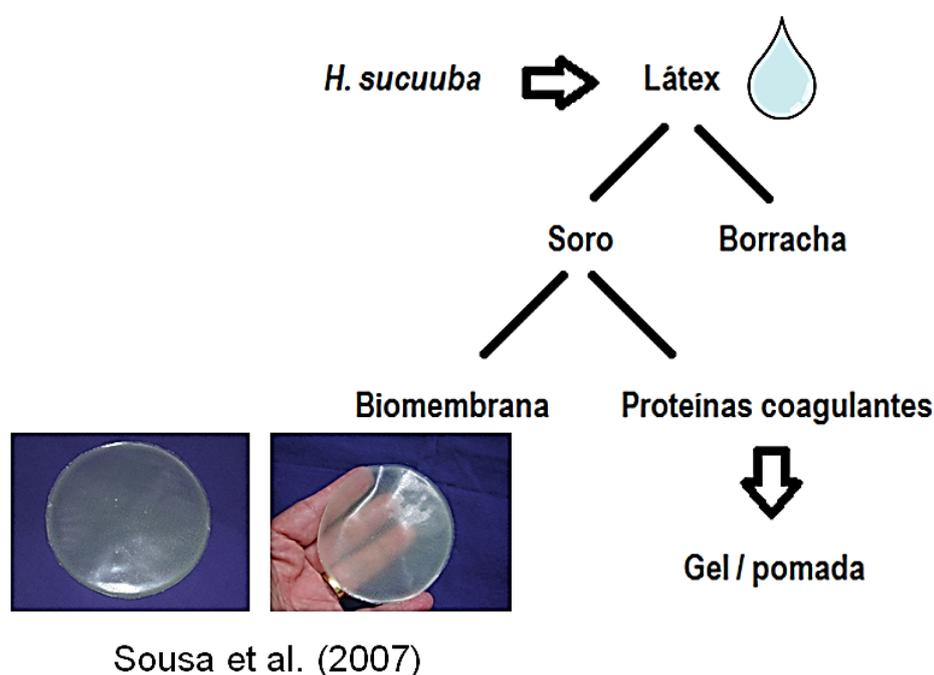


Figura 3. Aplicabilidade biotecnológica.

Fonte: autores.

A biomembrana de látex natural produzida por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP apresenta importantes propriedades biológicas, tais como: atividade neoangiogênica, promoção de adesão celular e formação de matriz extracelular (MRUÉ, 1996; MRUÉ, 2000).

Uma fração proteica do soro do látex *Hevea brasiliensis* (FrHB) foi utilizada na confecção de uma biomembrana usada como parte no tratamento para cicatrização de feridas no pé em pacientes diabéticos (ANDRADE et al., 2012).

As pesquisas com o látex da planta *Hevea brasiliensis* (seringueira), iniciadas pelo Professor Dr. Joaquim Coutinho Netto em 1993, já demonstravam inúmeras aplicabilidades na área médica, por sua ação indutora de angiogênese, semelhante ao fator de crescimento vascular endotelial, amplamente comprovada em animais de laboratório em 1997 (PELENOVA BIOTECNOLOGIA, 2017).

A empresa Pelenova Biotecnologia utiliza uma fração denominada proteína bioativa F1 do soro do látex da *H. brasiliensis* na regeneração tecidual, na formulação de cosméticos com propriedade anti-envelhecimento, géis, cremes, loções, na confecção de uma biomembrana (Biocure®) e REGEDERM® que possui atividade angiogênica e aceleradora do processo cicatricial e é indicado para o tratamento e cicatrização de feridas crônicas de diversas etiologias (PELENOVA BIOTECNOLOGIA, 2017).

A possível presença de proteínas coagulantes que participam do efeito de

agregação plaquetária observado no presente estudo, pode ser um caminho para novos estudos que objetivam avaliar a eficiência de biomembranas e géis sintetizados a partir do látex de *H. succuba* em processos de angiogênese e cicatrização.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o soro do látex de *H. succuba* pode interferir no sistema hemostático, ou seja, influenciar no processo de agregação de plaquetas e coagulação do sangue. Este é o primeiro estudo indicador da possível presença de proteínas coagulantes no soro do látex dessa espécie. Contudo, trata-se de um ensaio isolado, sendo necessárias investigações futuras.

## REFERÊNCIAS

- ALAM, G.; SINGH, M.P.; SINGH, A. **Wound healing potential of some medicinal plants.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v.9, n.026, 2011.
- ANDRADE, T.; CAETANO, G.; MASSON, D.; LANDIN, C.; COUTINHO-NETO, J.; FOSS, M.; FAAD, M. **Protein from *Hevea brasiliensis* latex rubber tree enhances wound healing in diabetic rats.** Endocrine Abstracts, v.29, p.542, 2012.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos versão 1.1.0.712.** Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2015.
- BARRETO, A.S.; AMARAL, A.C.F. Ácido 15-desmetilisoplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus succuba*. Quimica Nova, v.30, n.5, p.1133-1135, 2007.
- DE MIRANDA, A.L.P.; SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; PARRINI, J.S. **Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus succuba*.** Planta Medica, n.66, p.284-286, 2000.
- FERREIRA, J.L.P.; AMARAL, A.C.F.; ARAÚJO, R.B.; CARVALHO, J.R.; PROENÇA, C.E.B.; FRAGA, S.A.P.M.; SILVA, J.R.A. **Pharmacognostical comparison of three species of *Himatanthus*.** International Journal of Botany, v.5, n.2, p.171-175, 2009.
- GEBHARDT, R. **In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: Novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms.** Planta medica, v.66, n.2, p.99-105, 2000.
- HAGEL, J.M.; EDWARD C.; YEUNG, PETER J. FACCHINI. **Got milk? The secret life of laticifers.** Trends in Plant Science, v. 13, n. 12, p. 631–639, 2008.
- HASHEM, S.A.; MADANI, S.A.; FAZLI, M. A. ***Ficus Carica* latex; a review with focus on cancer.** Annals of Advanced Sciences, v.1, n.1, 2017.
- KEKWICK, R.G.O. **Látex and Laticifers.** Encyclopedia of Life Sciences, p.1-6, 2001.
- MAHLBERG, P.G. **Laticifers: An historical perspective.** Botanical Review, n.59, p.1-23, 1993.

METCALF, C.R. **Distribution of latex in the plant kingdom.** Economic Botany, v.21, n.2, p.115-127, 1967.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães.** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1996.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.

PELENOVA BIOTECNOLOGIA, 2017. **Látex de seringueira.** Disponível em: <<http://www.pelenova.com.br>>. Acesso em 14 de jan. 2018.

RAJESH, R.A.; NATARUJU, C.D.R.; GOWDA, B.M.; FREY, F.J.; FREY, B.S.V. **Purification and characterization of a 34-KDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot.** Biochimie, v.88, n.10, p.1313-1322, 2006.

SHIVAPRASAD, H.V.; RIAZ, M.; VENKATESH KUMAR, R.; DHARMAPPA, K. K.; SIDDESHA, J.M.; RAESH, R.; VISHWANATH, B.S. **Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities.** Journal Thrombosis Thrombolysis, n.28, p.304-308, 2009.

SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SIANI, A.C.; REZENDE, C.M.; FELCMAN, J.; PINTO, A.C. **Contribution to the study of *Himathanthus sucuba*: latex macromolecules, microelements and carbohydrates.** Acta Amazonica, n.33, p.105–10, 2003.

SOUSA, L.C.A.; PIZA, M.R.T.; COUTINHO-NETTO, J.; RUIZ, D.B.; SCHMIDT, V.B. **Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomias.** BJORL, v.73, n.3, 2007.

## PERFIL DO CONSUMO DE ÁLCOOL POR ESTUDANTES DE FISIOTERAPIA DE UMA UNIVERSIDADE PRIVADA DE SALVADOR

**Aísa de Santana Lima**

Universidade Salvador, Escola de Saúde  
Salvador-Ba

**Ana Paula Amaral de Brito**

Universidade Estadual da Bahia, Departamento  
de Ciências da Vida, Fisiologia  
Universidade Salvador, Escola de Saúde  
Salvador-Ba

**Átina Carneiro Rocha**

Universidade Salvador, Escola de Saúde  
Salvador-Ba

**Gleice de Jesus Oliveira**

Instituto de Educação e Pesquisa  
Salvador-Ba

**RESUMO:** O ingresso na universidade inicia um período em que os estudantes sofrem mudanças em seu modo de vida, entre elas o aumento do consumo de álcool. Seja por condições físicas, psicológicas ou como forma de interação social, esta droga lícita torna-se cada vez mais frequente no âmbito universitário fazendo com que estes indivíduos por vezes recorram ao álcool como paliativo. O consumo de álcool pode trazer diversos danos aos estudantes, e por isso é importante traçar metas e ações que possibilitem a conscientização e redução destes danos impactados pelo álcool. Este estudo foi realizado com estudantes do curso de fisioterapia de uma universidade privada de

Salvador mediante aplicação de questionário de autopreenchimento seguindo o modelo de “Bola de Neve”. Indivíduos do sexo masculino demonstraram maior consumo de bebidas em relação ao sexo feminino, sendo o grupo de etilistas concentrados em maior proporção na faixa etária de 17-25 anos. O estudo demonstra ainda que 37,2% das mulheres e 45,5% dos homens entrevistados consomem de 3 a 4 doses em um dia típico. Embora não tenha sido observada uma queda no desempenho acadêmico, os estudantes que consomem álcool demonstraram dificuldades em cumprir com seus compromissos quando comparados àqueles que não consomem álcool. Desta forma, fica explícito necessidade de atenção a essa população que futuramente será exemplo para a sociedade, não somente falando sobre bons hábitos de vida e saúde, e sim pelo fato de terem a responsabilidade de lidar com a vida dos seus pacientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desempenho acadêmico; Bingedrinking; AUDIT; RAPI.

**ABSTRACT:** Admission to university begins a period in which students experience changes in their way of life, including increased alcohol consumption. Whether due to physical or psychological conditions or as a form of social interaction, this licit drug becomes more and more frequent in the university environment,

making them sometimes use alcohol as a palliative. The consumption of alcohol can bring several damages to the students, and for this reason it is important to outline goals and actions that make possible the awareness and reduction of these damages impacted by alcohol. This study was carried out with students of the physiotherapy course of a private university in Salvador using a self-filling questionnaire following the “Ball of Snow” model. Male subjects showed higher consumption of beverages in relation to females, with the alcoholic group being concentrated in the 17-25 age group. The study also shows that 37.2% of women and 45.5% of men interviewed consume 3 to 4 doses on a typical day. Although no drop in academic performance has been observed, students who consume alcohol have shown difficulties in meeting their commitments when compared to those who do not consume alcohol. In this way, there is an explicit need for attention to this population that will be an example for society in the future, not only talking about good habits of life and health, but also the fact that they have a responsibility to deal with the lives of their patients.

**KEY WORDS:** Academic performance; Bingedrinking; AUDIT; RAPI.

## 1 | INTRODUÇÃO

O consumo de bebida alcoólica é um comportamento cultural que é permitido em praticamente todas as sociedades do mundo. O uso dessas substâncias tornou-se um grande problema de saúde pública e problema em todo o mundo. A dependência de álcool é, de fato, um importante fator de risco para mortalidade e incapacidade, e seu consumo é a terceira causa de morte evitável (MOKDAD et al. 2004). Em 2012, a Organização Mundial da Saúde relatou que 7,6% e 4% das mortes foram atribuídas ao álcool entre homens e mulheres, respectivamente (LIM et al. 2012).

De acordo com o V Levantamento Nacional com Estudantes (GALDUROZ et al. 2005), realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em 2004, 65,2% dos estudantes relataram uso de álcool na vida; 44,3%, nos 30 dias anteriores à pesquisa; 11,7% fizeram uso frequente; e 6,7%, uso pesado, ou seja, 20 ou mais vezes no mês que antecedeu a investigação.

O estudo do consumo de álcool em jovens universitários tem gerado interesse em todas as culturas e em todos os continentes. Pesquisas para explicar a ingestão dessa substância nessa população foram iniciadas em meados dos anos setenta nos países industrializados (ALVIRA, 1982).

O ingresso à universidade tem sido considerado um período crítico, com maior vulnerabilidade para o início e manutenção do consumo de álcool e de outras drogas (LORANT et al. 2013). Ao ingressar na universidade muitos estudantes vivenciam novas experiências, como se distanciar da família, residir com outros estudantes e passar a maior parte do tempo no ambiente universitário, além de adquirirem maior liberdade e independência para a tomada de decisões. Essas novas experiências podem favorecer um maior consumo de álcool, assim como os riscos associados a tal

consumo (FÓFANO et al. 2010; HAAS et al. 2012).

Além disso, um estudo realizado em 2011 com universitários comprovou que o consumo do álcool é estimulado pela mídia como uma prática relacionada ao prazer, à felicidade, à prática de esportes entre outras atividades de bem-estar que são veiculadas pelos meios de comunicação e estimulam cada vez mais o consumo indiscriminado (PEDROSA et al. 2011).

O uso indevido de álcool também foi relatado como um forte preditor da saúde mental dos estudantes no qual, foi atribuível ao aumento dos sintomas depressivos acompanhados de beber para lidar com isso (BRAVO, 2017; GONZALEZ, 2011), tentativa de comportamentos suicidas e automutilação (PELTZER et al. 2016; TOPRAK et al. 2011) e comportamentos agressivos (ALI et al. 2013). Hunt e Eisenberg (2010) relataram que estudantes com uso problemático de álcool têm menor probabilidade de procurar ajuda profissional para o problema de saúde mental. O uso problemático de álcool contribui para uma proporção significativa do engajamento dos alunos em comportamento sexual de risco (KASSA et al. 2016), funções executivas mais pobres (PARADA et al. 2012) e desempenho acadêmico ruim (MAZUR et al. 2016; AERTGEERTS et al. 2002).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar o perfil dos estudantes de uma Universidade Privada de Salvador. A pesquisa propõe identificar os grupos específicos mais expostos ao problema, fornecendo subsídios para futuras ações preventivas nesta população.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa trata-se de um estudo descritivo e de corte transversal, sendo desenvolvido após aprovação do comitê de Ética e Pesquisa. A coleta de dados foi realizada com estudantes do curso de fisioterapia de uma universidade privada de Salvador- Bahia, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os estudantes de fisioterapia foram escolhidos devido à escassez na literatura sobre o consumo de álcool nesse grupo. Dos 502 estudantes regularmente matriculados no curso de fisioterapia, 135 consentiram e responderam adequadamente os questionários.

A aplicação dos questionários ocorreu em horários estratégicos como intervalos e/ou dispensas das aulas, a fim de não comprometer o espaço do docente e o foco da atenção destes alunos nos horários de aprendizado. Os estudantes foram escolhidos de forma aleatória e seguindo o modelo “Bola de Neve” para aplicação, sendo assim, cada estudante escolhido deveria indicar três outros estudantes para participarem do estudo. Cada participante foi orientado a responder de forma anônima o questionário autopreenchível composto por 66 questões objetivas, tais como questões de ordem sociodemográficas, exemplificativamente: Sexo, idade, antecedentes familiares,

religião, notas acadêmicas (média ponderada), frequência e intensidade do consumo do álcool, dentre outras. Para análise das desordens relacionadas ao consumo de álcool foram utilizados os questionários já validados como o “*Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)*” e o “*Rutgers Alcohol Problem Index (RAPI)*”.

O *Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)* trata-se de um instrumento elaborado pela Organização Mundial de Saúde no fim da década de 1980, a partir de um projeto que envolveu seis países (BABOR et al. 2001) e validado para a população brasileira por Lima et al. (1999). As questões referem-se aos últimos 12 meses, sendo que as três primeiras medem a quantidade e frequência do uso regular ou ocasional do álcool, as três questões seguintes investigam sintomas de dependência e as quatro finais são a respeito de problemas na vida relacionados ao consumo do álcool. O escore varia de 0 a 40 e sua pontuação pode ser feita de vários modos. A pontuação superior a oito indica a necessidade de um diagnóstico mais específico. Atualmente, contudo, tem sido proposto quatro níveis de pontuação para o AUDIT (BABOR et al. 2001) permitindo a seguinte classificação:

- Consumo de baixo risco ou abstêmios = 0 a 7 pontos;
- Consumo de risco = 8 a 15 pontos;
- Uso nocivo ou consumo de alto risco = 16 a 19 pontos;
- Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo= 40 pontos)

Já o *Rutgers Alcohol Problem Index (RAPI)*, foi desenvolvido por White e Labouvie (1989) e tem como objetivo avaliar problemas relacionados ao consumo de álcool, indicando as consequências negativas associadas ao uso (SILVA; TUCCI, 2015). O RAPI é um instrumento constituído por 23 itens, os quais devem ser respondidos considerando uma escala de 0 a 4, sendo 0 = nunca, 1 = uma a duas vezes, 2 = três a cinco vezes, 3 = seis a dez vezes e 4 = mais que dez vezes, sendo que cada item deve ser respondido levando em consideração os últimos 12 meses e os últimos 30 dias. As respostas irão indicar o número de vezes em que um dado comportamento ocorreu em decorrência do consumo de bebidas alcoólicas (DIMEFF et al., 2002; WHITE; LABOUVIE, 1989).

As questões foram tabuladas e em seguida as porcentagens foram analisadas.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados ilustrados no Gráfico 1, 81,5% dos entrevistados do sexo masculino e 64,9% dos entrevistados do sexo feminino se declararam elitista. Esses dados corroboram os estudos de Andrade et al. (2012), e Ringwalt, Paschall e Gitelman (2011) que relataram um maior consumo de álcool entre estudantes do gênero masculino. Além disso, diversos estudiosos da área, como Colares, Franca e Gonzales (2009), Laranjeiras, Pinsky, Zaleski e Oliveira et al. (2010) já afirmavam que o consumo de álcool é mais prevalente no gênero masculino do que no feminino.

Contudo, a ascendência das mulheres entre os estudantes que se submeteram a participação do estudo também é notada em outros estudos sobre o uso do álcool (MARTINS, COELHO, FERREIRA, 2010; ROCHA et al., 2011).

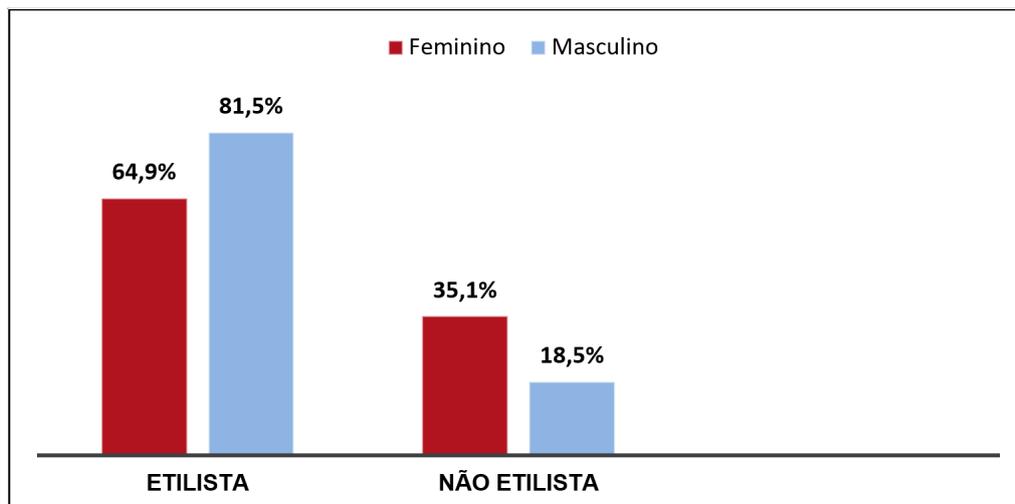


GRÁFICO 1: Distribuição por sexo quanto ao consumo de álcool.

A transição para a vida adulta acontece entre 18 e 25 anos, aproximadamente. Várias experiências e descobertas acontecem neste período, incluindo contato com álcool (ARNETT JJ, 2005). De fato, como descrito na Tabela 1, o grupo etilista concentra-se em maior proporção na faixa etária de 17-25 anos. Esse resultado pode ter sido decorrente da maioria dos alunos entrevistados estarem nessa faixa etária. No entanto, diversas literaturas justificam que quanto menor a idade maior o risco, devido a transição no ciclo de vida, da infância para a maturidade, momento específico e dramático de socialização. Destaca-se ainda que existe maior risco de consumo excessivo episódico de bebida alcoólica, internacionalmente, conhecido como *Binge Drinking*, em relação a menor idade de início de consumo, comprometendo a saúde dos adolescentes (STOLLE et al. 2009; FERNÁNDEZ et al. 2011).

Sexo	Masculino				Feminino				Total	
	Presente		Ausente		Presente		Ausente			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Idade em anos										
17-20	12	8,8	5	3,7	30	21,0	20	14,0	67	47,5
21-25	6	4,4	-	-	27	20,0	9	6,6	42	31,0
26-30	3	2,2	-	1,7	8	5,9	3	2,2	15	12,0
31-45	1	1,2	-	-	5	3,7	4	2,9	10	7,8
Não Respondeu	-	-	-	-	-	-	2	1,7	2	1,7
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>16,6</b>	<b>5</b>	<b>5,4</b>	<b>70</b>	<b>50,6</b>	<b>38</b>	<b>27,4</b>	<b>135</b>	<b>100</b>

TABELA 1: Faixa etária da amostra pesquisada. \*Ingestão de álcool

O grupo etilista foi analisado quanto à frequência da ingestão alcoólica nos últimos 12 meses. Os resultados demonstram que 45,5% dos entrevistados do sexo

masculino e 40% do sexo feminino ingeriram conteúdo alcoólico de 2-4 vezes por mês (Tabela 2). Esse padrão de frequência de ingestão alcoólica também se fez presente em um estudo realizado por Brites e Abreu (2014) em uma universidade pública do Rio de Janeiro, em que foi avaliado o Padrão de Consumo de Bebidas Alcoólicas entre os trabalhadores e perfil socioeconômico, o qual pode-se investigar 322 servidores públicos da universidade que freqüentavam o serviço de saúde do trabalhador.

Sexo	Feminino		Masculino	
	N	%	N	%
<i>Frequência do consumo de álcool</i>				
2-4 vezes por mês	28	40	10	45,5
1 vez ou menos por mês	23	32,8	7	31,9
Não consumiram nos últimos 12 meses	13	18,6	1	4,1
2-3 vezes por semana	5	7,1	2	9
4 ou mais vezes na semana	1	1,5	2	9
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>22</b>	<b>100</b>

TABELA 2. Frequência do consumo de álcool dos alunos do curso de fisioterapia.

Quando questionado sobre as doses consumidas em um típico dia quando o indivíduo está bebendo, o estudo demonstra que 37,2% das mulheres e 45,5% dos homens entrevistados consomem de 3 a 4 doses (Tabela 3).

Sexo	Feminino		Masculino	
	N	%	N	%
<i>Doses</i>				
10 ou mais	2	2,9	4	18,2
5-6	8	11,4	2	9,1
3-4	26	37,2	10	45,5
1-2	23	32,8	3	13,6
Nenhuma	11	15,7	3	13,6
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>22</b>	<b>100</b>

TABELA 3. Doses consumidas em um típico dia quando o indivíduo está bebendo.

Laranjeira et al. 2007 explicam que o comportamento de beber muitas doses em uma única ocasião está mais presente na faixa de 18 a 24 anos e 22% destes bebem com tais características acima de seis doses ao menos uma vez por semana. Os potenciais efeitos do consumo do álcool estão diretamente relacionados a frequência e quantidade de doses consumidas, podendo estas estarem intimamente ligadas a acidentes, brigas e comportamentos inadequados e prejudiciais, levando os indivíduos a agirem de maneira inconsequente.

Em relação às pontuações determinadas pelo questionário AUDIT, somente um entrevistado, do sexo masculino, apresentou provável dependência; duas mulheres apresentaram uso nocivo ou consumo de risco (Tabela 4). Com base nas pontuações determinadas pelo questionário AUDIT, classificaram-se como grupo de risco 12,9%

do sexo feminino e 27,3% do sexo masculino.

Sexo	Feminino		Masculino	
	N	%	N	%
<i>AUDIT</i>				
Consumo de baixo risco ou abstêmios	59	84,2	14	63,7
Consumo de risco	9	12,9	6	27,3
Uso nocivo ou consumo de alto risco	2	2,9	-	-
Provável dependência	-	-	1	4,5
Não respondeu	-	-	1	4,5
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>22</b>	<b>100</b>

TABELA 4. Pontuações determinadas a partir do AUDIT.

Martins et al. (2010) encontraram resultados semelhantes aos descritos no presente estudo quando comparados a prevalência de grupos de baixo risco que foram encontrados. Castaño e Vallejo (2014) realizaram um estudo com estudantes universitários e puderam constatar que 64,6% dos entrevistados não tinham problemas com consumo de álcool. Entretanto, 20,5% dos seus entrevistados apresentaram consumo de risco e 14,9% tinham risco de dependência, apontando um número significativo de estudantes que se expõe em condições de risco.

No que se refere ao desempenho acadêmico, 49,1% dos entrevistados relataram possuir média ponderada igual a sete. Desempenho menor do que nota 7 foi relatado por apenas 8,5% dos entrevistados e não parece existir nos entrevistados uma correlação direta com o consumo de álcool. Embora não tenha sido observada uma queda no desempenho acadêmico, os estudantes que consomem álcool demonstraram dificuldades em cumprir com seus compromissos quando comparados àqueles que não consomem álcool. Isso foi identificado através do relato de apresentarem na sua maioria dificuldades para cumprir com a jornada acadêmica, dormirem em sala de aula, atrasos e faltas.

Sexo	Masculino				Feminino				Total	
	Presente		Ausente		Presente		Ausente			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Etilismo*</b>										
<b>Desempenho escolar</b>										
Menor que 7	2	1,4	-	-	6	4,4	3	2,7	11	8,5
Igual a 7	10	7,4	3	2,2	37	27,5	17	12,0	67	49,1
Maior que 7	9	6,6	2	1,4	23	17,5	13	9,6	47	35,1
Não respondeu	1	0,7	-	-	4	2,9	5	3,7	10	7,3
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>16,1</b>	<b>5</b>	<b>3,6</b>	<b>70</b>	<b>52,3</b>	<b>38</b>	<b>28,0</b>	<b>135</b>	<b>100</b>

TABELA 5: Relação do consumo de álcool ao desempenho acadêmico. \*Ingestão de álcool.

A religiosidade é apontada como um fator de proteção que pode representar uma

alternativa aos comportamentos de risco identificados entre adolescentes, em especial o uso de bebida alcoólica. Os círculos de amizade formados no âmbito religioso com participação em grupos de jovens, estudos bíblicos e cultos dominicais, auxiliam na manutenção de comportamentos abstêmios em relação ao álcool, que recebem maior incentivo quando acompanhados de práticas esportivas, às vezes mantidas pela própria organização religiosa a que pertencem (ADAMCZYK, 2012).

Aspectos religiosos e espirituais podem apresentar relações complexas com o uso de substâncias psicoativas, como se observa em pesquisa em que se aplicaram o questionário AUDIT juntamente com a versão brasileira do questionário *Spirituality Self Rating Scale* a uma amostra de 138 indivíduos do sexo masculino, que tinham vínculo com instituições de reabilitação (GONÇALVES, 2014).

Como ilustrado na Tabela 5, dentre os homens e mulheres que responderam corretamente este quesito, 30,9% dos indivíduos que consomem álcool declararam ser da religião católica, seguidos de 11% que se declararam protestantes, corroborando com outros estudos que também investigaram a relação da religiosidade com o uso de bebida alcoólica (DALGALARRONDO et al., 2004; CARLINI et al., 2005). Dos entrevistados que não bebem, 60% dos homens e 52,63% das mulheres se declararam protestantes. Estes dados nos sugerem uma relação entre a religião e o não consumo de álcool.

Sexo	Masculino				Feminino				Total		
	Presente		Ausente		Presente		Ausente				
	Etilismo*	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Religião</b>											
<b>Sem religião</b>	4	2,9	-	-	7	5,1	1	0,7	12	8,7	
<b>Protestante</b>	2	1,4	3	2,2	13	9,6	20	14,5	38	27,7	
<b>Católico</b>	8	5,9	-	-	34	25,0	10	7,9	52	38,8	
<b>Candomblé</b>	1	0,7	1	1,2	-	-	-	-	2	1,9	
<b>Espírita</b>	3	2,2	-	-	4	2,9	2	1,4	9	6,5	
<b>Não respondeu</b>	4	2,9	1	1,0	12	8,8	5	3,7	22	16,4	
<b>Total</b>	22	16,0	5	4,4	70	51,4	38	28,2	135	100	

TABELA 5: Distribuição por sexo e religião quanto ao consumo de álcool. \*Ingestão de álcool

No que diz respeito aos questionamentos feitos pelo RAPI quanto ao comportamento do indivíduo perante a sociedade diante do consumo do álcool, escolheu-se a questão que mais se fez recorrente em relação ao último mês para ambos os sexos (Gráfico 2).

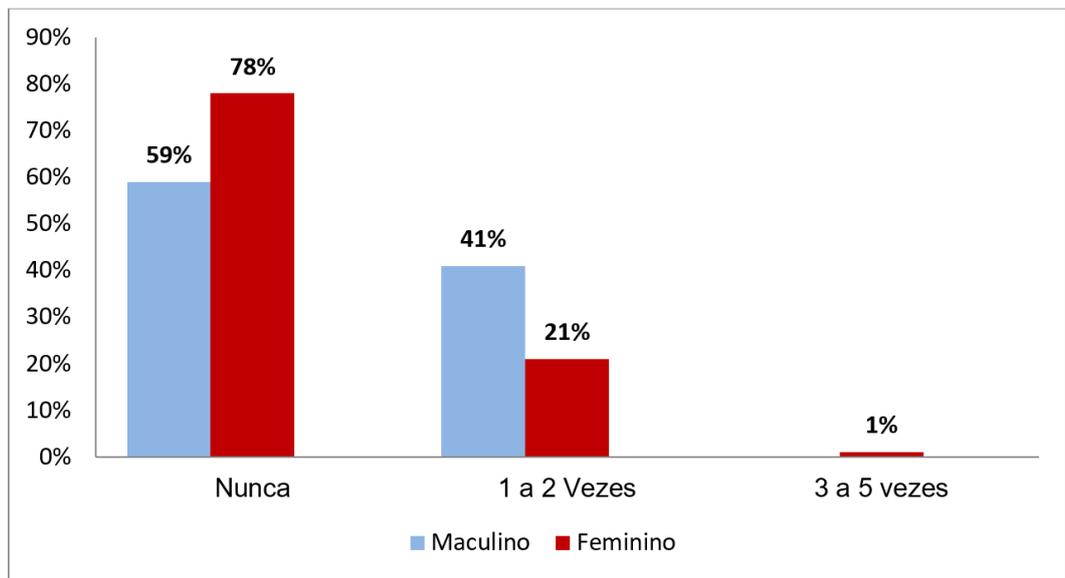


GRÁFICO 2:Prevalência das afirmativas do RAPI no ÚLTIMO MÊS. Afirmação dos homens: Tentou diminuir ou parar de beber. Afirmação das mulheres: Brigou, agiu mal ou fez coisas erradas

Dos entrevistados, 21% das mulheres relatam que “brigou, agiu mal ou fez coisas erradas” após ingestão de álcool. Este dado corrobora como estudo feito por Ribeiro (2007) em que 8,2% de seus entrevistados relataram que já se envolveram em brigas ao menos uma vez na vida após beber.

Quanto aos homens, 41% relataram que “Tentou diminuir ou parar de beber”. Apesar de existir escassez literária de dados que possam contribuir com os achados desta questão, é possível supor que indivíduos que relatam diminuir parar a ingestão de álcool o fazem porque a ingestão deve estar acima do que o seu organismo suporta ou mesmo por estar prejudicando em algum aspecto da sua vida social.

Neste estudo, considerou-se também o estado psicológico dos entrevistados que ingerem bebidas alcoólicas através da percepção de felicidade. Dos entrevistados, 10,5% do total da amostra declarada etilista responderam “Mais ou Menos” quando questionados sobre sua felicidade, sendo que estes não fazem parte do grupo que apresenta consumo de risco. Entretanto, Ashton e Kamali (1995) apontam que o prazer é o motivo principal para o uso do álcool e também outras drogas, o que nos leva a pensar acerca dos limites que devem existir nessa prática que para muitos é considerada um passa-tempo, mas para outros trata-se do “algo mais” para se divertir, socializar ou serem felizes em suas perspectivas, podendo evoluir para um consumo de risco e uma provável dependência.

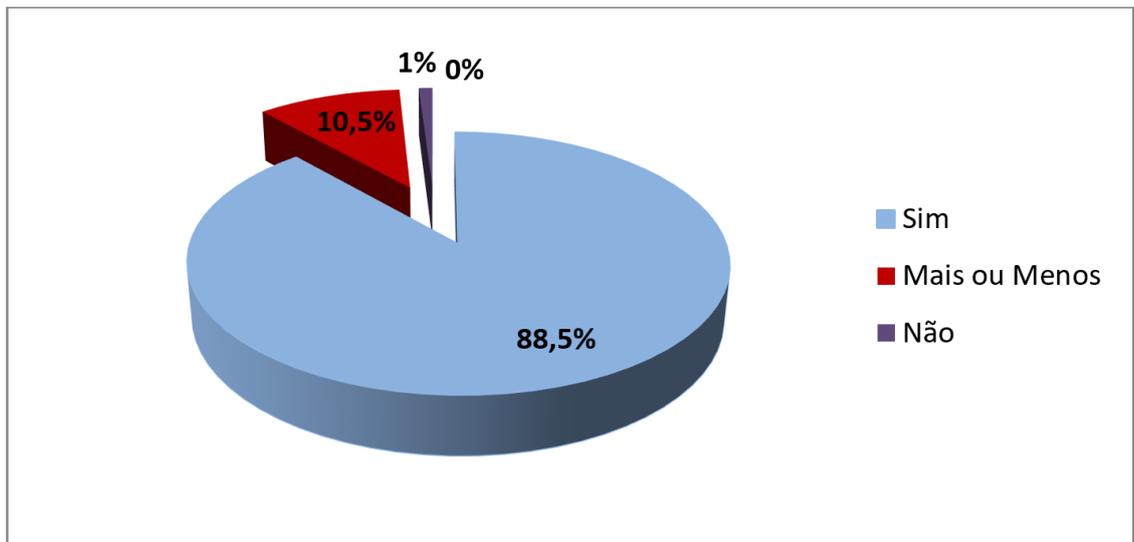


GRÁFICO 4: Questionamento sobre afirmação individual de felicidade.

Achados importantes trazidos por Cavarini et al. (2012) através de um estudo domiciliar de base populacional realizado na região metropolitana de São Paulo, descreveram sentimentos negativos como tristeza, solidão e situações de risco associados a situações de ingestão de álcool. No presente estudo apenas uma pessoa (mulher) sinalizou que não era feliz e esta não justificou sua resposta.

#### 4 | CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o número de universitários etilistas do curso de Fisioterapia é elevado, e que, embora a maior participação voluntária na pesquisa tenha sido do sexo feminino, a prevalência do consumo e este sendo classificado como de risco foi constatado maior no sexo masculino.

As consequências sociais da ingestão nociva do álcool revela um caráter de urgência na atenção a esses jovens visto que os estudos demonstram mudanças comportamentais sociais destes indivíduos.

Tendo em vista que as consequências trazidas pelo uso excessivo do álcool podem ser devastadoras tanto na vida acadêmica quanto na vida social e no bem estar individual fica claro a partir do presente estudo que políticas redutoras de risco se tornam necessárias no meio acadêmico.

Diante do que foi abordado, investigações acerca do tema fazem-se necessárias a fim de buscar formas mais efetivas de prevenção e elaboração de políticas de redução de danos. Portanto, fica explícito a real e urgente necessidade de atenção a essa população que futuramente será exemplo para a sociedade, não somente falando sobre bons hábitos de vida e saúde, e sim pelo fato de terem a responsabilidade de lidar com a vida dos seus pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, A. **Extracurricular activities and teens' alcohol use: the role of religious and secular sponsorship.** Social Science Research, v. 41, n. 2, p. 412-424, 2012.
- AERTGEERTS, B.; BUNTINX, F. **The relation between alcohol abuse or dependence and academic performance in first-year college students.** J Adolesc Health, v. 3, n. 3, p. 223–5, 2002.
- ALI B.; RYAN J. S; BECK K. H, & DAUGHTERS S, B. **Trait aggression and problematic alcohol use among college students: the moderating effect of distress tolerance.** Alcoholism Clinical and Experimental Research, v. 37, n. 12, p. 2138-44, 2013.
- ALVIRA- MARTIN F. **Pautas de consumo de bebidas alcohólicas entre los jóvenes Españoles.** Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, p. 220, 1982.
- ANDRADE, A. G.; DUARTE, P. C. A. V.; BARROSO, L. P.; NISHIMURA, R.; ALBERGHINI, G., & OLIVEIRA, L. G. **Use of alcohol and other drugs among Brazilian college students: Effects of gender and age.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 34, n. 3, p. 294-305, 2012.
- ARNETT, J. J. **The developmental context of substance use in emerging adulthood.** J Drug Issues, v. 35, p. 235-53, 2005.
- ASHTON, C. H.; KAMALI, F. **Personality, lifestyles, alcohol and drug consumption is a sample of British medical students.** Medical Education, v. 29, p. 187–192, 1995.
- BABOR, T. F; HIGGINS-BIDDLE, J; SAUNDERS, J; MONTEIRO, M. **The alcohol use disorders identification test: guidelines for use in primary care.** World Health Organization, Genebra, v. 2, 2001.
- BORINI, P. ET AL. **Padrão de uso de bebidas alcoólicas em estudantes de medicina.** (Marília São Paulo) – PARTE I. Jornal Brasileiro de Psiquiatria, v. 43, n. 1, p. 93-103, 1994.
- BRAVO, A. J; PEARSON, M. R; HENSON, J. M. **Drinking to cope with depressive symptoms and ruminative thinking: a multiple mediation model among college students.** Subst Use Misuse, v. 52, n. 1, p. 52, 2017.
- BRITES, R. M. R.; ABREU, A. M. M. **Padrão de Consumo de Bebidas Alcoólicas entre os Trabalhadores e Perfil Socioeconômico.** Acta Paulista de Enfermagem, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 93-99, 2014.
- CARLINI, E. A.; GALDURO, Z. J. C. F.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M; CARLINI, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; NAPPO, A. S.; MOURA, Y. G. & SANCHEZ, Z.M. **II Levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – [s.n.], 2005.**
- CASTAÑO-PEREZ, G. A & CALDERON VALLEJO, G. A. **Problems associated with alcohol consumption by university students.** Revista Latino Americana de enfermagem, v. 22, n. 5, p. 739-746, 2014.
- CAVARINI, M. B. et al. **Expectativas positivas com o uso de álcool e o beber se embriagando: diferenças de gênero em estudo do Projeto GENACIS,** São Paulo, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 28, n. 7, p. 1394-1404, 2012.
- COLARES, V.; FRANCA, C. & GONZALEZ, E. **Condutas de saúde entre universitários: Diferenças entre gêneros.** Cadernos de Saúde Pública, v. 25, n. 3, p. 521-528, 2009.

DALGALARRONDO, P.; SOLDERA, M. A.; CORREA FILHO, H. R. & SILVA, C. A. M. **Religião e uso de drogas por adolescentes.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 26, n. 2, p. 82-90, 2004.

DIMEFF, L. A.; BAER, J. S.; KIVLAHAN, D. R. & MARLATT, G. A. **Alcoolismo entre estudantes universitários: Uma abordagem de redução de danos.** São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, [s.n.], 2002.

FERNÁNDEZ, A. R.; PILLON, S. C. **Social risk factors for alcohol use among adolescents and youth.** Revista Latino-Americana de Enfermagem, v. 19 (Spec), p. 771-81, 2011.

FÓFANO, G. A.; RIBEIRO, L. C. & RIBEIRO, M. S. **Perfil dos calouros da UFJF com relação ao uso de substâncias psicoativas.** Trabalho apresentado no XVII Encontro Nacional de Estudos Populacionais, Caxambu, MG, Brasil, [s.n.], 2010.

GALDUROZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M.; CARLINI, E. A. **V Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras:** São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Universidade Federal de São Paulo; [s.n.], 2005.

GONÇALVES, A. M. D. S.; SANTOS, M. A. D. & PILLON, S. C. **Uso de álcool e/ou drogas: avaliação dos aspectos da espiritualidade e religiosos.** SMAD. Revista Eletronica Saúde Mental Álcool e Drogas, v. 10, n. 2, p. 61-69, 2014.

GONZALEZ, V. M.; REYNOLDS, B.; SKEWES, M. C. **Role of impulsivity in the relationship between depression and alcohol problems among emerging adult college drinkers.** Experimental and Clinical Psychopharmacology, v. 19, n. 4, p. 303-13, 2011.

HAAS, A. L.; SMITH, S. K.; KAGAN, K. & JACOB, T. **Pre-college pre-gaming: Practices, risk factors, and relationship to other indices of problematic drinking during the transition from high school to college.** Psychology of Addictive Behaviors, v. 26, n. 4, p. 931-938, 2012.

HUNT, J.; EISENBERG, D. **Mental health problems and help-seeking behavior among college students.** J Adolesc Health, v. 46, n. 1, p. 3–10, 2010.

KASSA, G. M. et al. **Risky sexual behaviors and associated factors among jiga high school and preparatory school students, Amhara region, Ethiopia.** International scholarly research notices, [s. n.], 2016.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESKY, M.; CAETANO, R. **I Levantamento Nacional sobre Padrões do Consumo de Álcool na População Brasileira.** Secretaria Nacional Antidrogas. Brasília, [s.n.], 2007.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; SANCHES, M.; ZALESKI, M.; CAETANO, R. **Alcohol use patterns among Brazilian adults.** Revista Brasileira Psiquiatria, v. 32, p. 231-41, 2010.

LIM, S.S. et al. **A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study**, v. 380, n. 9859, p. 2224–60, Lancet, 2012.

LIMA, C. T.; FREIRE, A. C.; SILVA, A. P.; TEIXEIRA, R. M.; FARRELL, M. & PRINCE, M. **Concurrent and construct validity of the AUDIT in a urban Brazilian sample.** Alcohol & Alcoholism, v. 40, n. 6, p. 584-589, 1999.

LORANT, V.; NICAISE, P.; SOTO, V. E. & D’HOORE, W. **Alcohol drinking among college students: College responsibility for personal troubles.** BMC Public Health, v. 13, n. 615, p. 1-9, 2013.

MARTINS, J. S.; COELHO, M. S.; FERREIRA, J. A. **Hábitos de consumo de álcool em estudantes**

**do ensino superior universitário: alguns dados empíricos.** Revista. *Psychologica*, v. 53, p. 397-411, 2010.

MAZUR, J.; TABAK, I.; DZIELSKA, A.; WAŻ, K.; OBLACIŃSKA, A. **The relationship between multiple substance use, perceived academic achievements, and selected socio-demographic factors in a polish adolescent sample.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 12, 2016.

MOKDAD, A. H.; STROUP, D.; MARKS, J. S.; GERBERDING, J. **Actual causes of death in the United States.** *JAMA*, [s.n.], 2004.

PARADA, M.; CORRAL, M.; MOTA, N.; CREGO, A.; RODRÍGUEZ, H. S.; CADAVEIRA, F. **Executive function in gand alcohol binge drinking in university students.** *Addict Behav*, v. 37, n. 2, 2012.

PEDROSA, A. A. S. et al. **Consumo de álcool entre estudantes universitários.** *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, Aug. 2011.

PELTZER, K.; PENGPID, S & TEPIROU, C. **Associations of alcohol use with mental health and alcohol exposure among school-going students in Cambodia.** *Nagoya International Journal of Medical Sciences*, v. 78, n. 4, p. 415, 2016.

RIBEIRO, E. **Padrão de consumo de bebidas alcoólicas entre universitários da área da saúde de uma faculdade do interior do Estado de São Paulo.** 2007. 125 f. Dissertação – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, [s.n.], 2017.

RINGWALT, C. L.; PASCHALL, M. K.; & GITELMAN, A. M. **Alcohol prevention strategies on college campuses and student alcohol abuse and related problems.** *Journal of Drug Education*, v. 41, n. 1, p. 99-118, 2011.

ROCHA, L. A.; LOPES, A. C.F.; MARTELLI, D. R. S.; LIMA, V. B & MARTELLI H. **Consumo de Álcool entre Estudantes de Faculdades de Medicina de Minas Gerais, Brasil.** *Revista Brasileira de Educação Médica*, 369, v. 35, n. 3, p. 369-375, 2011.

SILVA, E. C.; TUCCI, A. M. **Intervenção Breve para Redução do Consumo de Álcool e suas Consequências em Estudantes Universitários Brasileiros,** *Psychology/Psicologia Reflexão e Crítica*, v. 28, n. 4, p. 728-736, 2015.

STOLLE, M.; SACK, P. M.; THOMASIU, R. **Binge Drinking in Childhood and Adolescence.** *Epidemiology, Consequences and Interventions.* *Dtsch Arztebl*, v. 106, n. 9, p. 323-8, 2009.

TOPRAK, S.; CETIN, I.; GUVEN, T.; CAN, G.; DEMIRCAN, C. **Self-harm, suicidal ideation and suicide attempts among college students.** *Psychiatry Research*, v. 187, n. 1–2, p. 140–4, 2011.

WHITE, H. R. & LABOUVIE, E. W. **Towards the assessment of adolescent problem drinking.** *Journal of Studies on Alcohol*, v. 50, n. 1, p. 30-37, 1989.

## USO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA REMOÇÃO DE FÁRMACOS

### **Caroline Aparecida Vaz de Araujo**

Pós- doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR

### **Elidiane Andressa Rodrigues**

Acadêmica do curso de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica Maringá – PR

### **Giselle Maria Maciel**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Departamento de Química e Biologia – Curitiba –PR

### **Priscila Ayumi Sybuia**

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR

### **Wagner Mansano Cavalini**

Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR

### **Cristina Giatti Marques de Souza**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica Maringá – PR

**RESUMO:** Nos últimos anos, fármacos têm sido detectados com frequência no âmbito mundial em efluentes das estações de tratamento de esgoto, águas superficiais, etc. A entrada contínua de fármacos pode levar efeitos negativos para os seres humanos e o ecossistema aquático. O objetivo do trabalho

foi avaliar o potencial da biomassa de *Trametes* sp em absorver os antibióticos trimetoprima e sulfametoxazol, que são conhecidos por serem resistentes a biodegradação. As culturas foram feitas utilizando biomassa tratada com o calor e/ou com soluções ácida (HCl 0.1 M), básica (NaOH 0.1M) e salina (NaCl 0.1 M) em 50 mgL<sup>-1</sup> de trimetoprima e sulfametoxazol sob agitação por 24 horas. A maior quantidade de trimetoprima adsorvida foi com a biomassa tratada apenas com o calor (53,62%) enquanto que para o sulfametoxazol foi com a biomassa submetida ao tratamento com solução básica (35,74%). A redução da quantidade dos fármacos foi observada por análises em HPLC.

**PALAVRA-CHAVE:** Biossorção, Antibióticos, Fungos da Podridão Branca da Madeira

**ABSTRACT:** In the last years, pharmaceuticals have been detected in effluents from sewage treatment plants, surface water, etc. Continued entry of drugs can have negative effects on humans and the aquatic ecosystem. The objective of this study was to evaluate the potential of *Trametes* sp. in absorbing trimethoprim and sulfamethoxazole antibiotics, which are known to be resistant to biodegradation. Cultures were made using biomass treated with heat and/or acid (0.1 M HCl), basic (0.1M NaOH) and saline solutions (0.1 M NaCl) in 50 mgL<sup>-1</sup> trimethoprim and

sulfamethoxazole by agitation for 24 hours. The highest amount of trimethoprim adsorbed was with the biomass treated only with heat (53.62%) whereas for the sulfamethoxazole it was with the biomass submitted to treatment with basic solution (35.74%). Reduction in the amount of the drugs was observed by HPLC analysis.

**KEYWORDS:** Biosorption, Antibiotics, White-rot fungi

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os compostos ativos farmacêuticos (CAFs) têm despertado interesse na comunidade científica em consequência de sua ampla presença no meio ambiente (Cruz-Maratóet al., 2014). Muitos estudos em diferentes países relataram a ocorrência de fármacos e hormônios estrógenos em águas superficiais, efluentes e lodos de estações de tratamento de esgoto e águas subterrâneas, com concentrações variando geralmente na faixa de ng/L a  $\mu\text{g/L}$  (Silva et al., 2011). Estudos relataram que após a administração de medicamentos, parte significativa dos fármacos é excretada na forma inalterada e/ou metabolizada (25-75%) pela urina e fezes (Chee-Sanfordet al., 2001) e seu maior destino é o esgoto doméstico. A principal rota de introdução dessas substâncias em águas superficiais são as estações de tratamento de esgoto (ETEs) tradicionais, pois vários fármacos e hormônios não são completamente removidos nas ETEs (Zhou et al., 2009, Liu et al., 2011). Outras fontes potenciais de contaminação de ambientes aquáticos são os efluentes industriais e hospitalares (Escher et al., 2011; Sanchez et al., 2011; Sim et al., 2011).

Os fármacos são considerados micropoluentes, e mesmo em concentrações bastante reduzidas, a entrada contínua nos corpos aquáticos podem levar a exposição crônica de baixo nível e acumulação com efeitos negativos potenciais na dinâmica dos ecossistemas, em seres humanos e no ambiente, como por exemplo, o surgimento de bactérias resistentes e recombinantes mais patogênicas (Baquero et al., 2008; Christen et al., 2010; Lloret et al., 2010). Muitos fármacos e hormônios por serem solúveis em água, de difícil biodegradação e despejados constantemente em águas que recebem esgoto de efluentes (rios, por exemplo) possuem potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (Zhou et al., 2009).

O sulfametoxazol (SMX) e o trimetoprima (TMP) (Figura 1) exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro, geralmente empregados de maneira conjunta (ex. Bactrim e Infectrin). São encontrados frequentemente em águas residuais e são bastante resistentes aos tratamentos biológicos mais utilizados nas estações de tratamento de esgoto (Valcárcelet al., 2011). Ambos foram classificados como compostos de alto risco e de elevada relevância ambiental devido à ocorrência em águas superficiais e ecotoxicidade (Besse&Garric, 2008). Os estudos de Zouet al., (2012) mostraram que o sulfametoxazol ocupa o terceiro lugar em toxicidade aguda e o trimetoprima o sexto lugar, no entanto quando se faz a comparação da toxicidade crônica, o TMP se destaca ocupando o primeiro lugar.

Várias formas de tratamento são propostas para reduzir a presença dessas substâncias em ambientes aquáticos, no entanto, é importante avaliar não somente a eficácia do tratamento de degradação, mas também a capacidade de eliminar a sua atividade farmacológica.

Bioprocessos são opções tecnológicas competitivas economicamente. Métodos baseados em tratamentos enzimáticos possuem propriedades atraentes como consumo energético reduzido e eficiência em condições moderadas de pH, temperatura e força iônica (Torres et al., 2003). Entre os bioprocessos, a biossorção pode ser considerada uma alternativa para o tratamento de efluentes aquosos, pois tem baixo custo relativo, alta seletividade, eficiência e certa facilidade operacional, visto que a adsorção pode, em princípio, manter grandes vazões e produzir efluentes de alta qualidade sem produzir substâncias nocivas como o ozônio e radicais livres formados a partir dos processos de fotodegradação utilizando UV (Erdem et al., 2005; Gupta et al., 2005). O mecanismo de biossorção tem se destacado por indicar uma série de processos independentes do metabolismo (adsorção física e química, interação eletrostática, troca iônica, complexação, quelação e microprecipitação), ocorrendo, essencialmente, na parede celular de bactérias, leveduras, fungos e algas, podendo adsorver diferentes tipos de poluentes, ao invés de oxidar por metabolismo anaeróbico ou aeróbico (biodegradação). A biossorção pode ser utilizada na recuperação ou descarte ambientalmente correto de efluentes (Aksu, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biossortivo da biomassa de *Trametes* sp em reduzir a quantidade dos agentes antimicrobianos trimetoprima (TMT) e sulfametoxazol (SMZ), que são frequentemente encontrados em águas residuais.

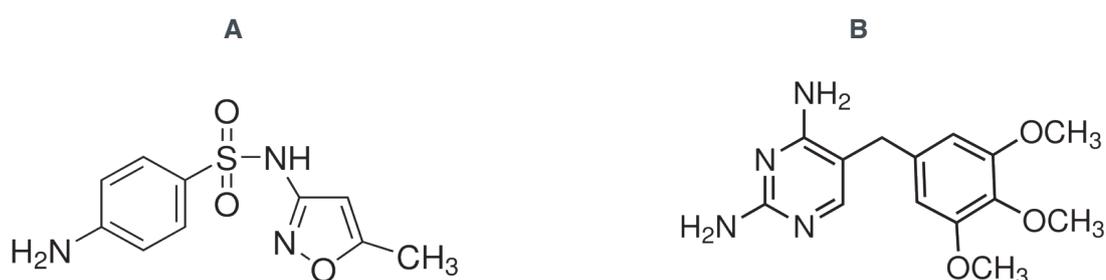


Figura 1. Estrutura química dos antimicrobianos sulfametoxazol (A) e trimetoprima (B).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Condições de Cultura

Cinco discos de micélio (Ø15 mm) obtidos de placas de petri contendo batata dextrose agar (BDA) colonizadas pelo fungo, foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio de batata dextrose (BD). Os frascos foram

incubados por 5 dias a 28°C e sob agitação de 120 rpm. Os pellets foram colhidos assepticamente, lavados com água destilada e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após a autoclavagem, parte dos pellets ficou imerso em soluções ácida (HCl 0,1 M), básica (NaOH 0,1 M) e salina (NaCl 0,1 M) por 1 hora e posteriormente lavados sucessivamente. Aproximadamente 73 mg de peso seco foram colocados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mg/L de TMT e SMZ e deixados por 24 horas em agitação de 120 rpm a 28°C. O material foi filtrado em bomba a vácuo e centrifugado (10 min, 10.000 x g, 4 °C). O processo foi realizado em duplicata.

## 2.2 Análise de Biossorção por HPLC

A análise da quantidade de trimetoprima e sulfametoxazol adsorvidos foi feita em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As amostras foram filtradas (0,2 mm, Millipore, Bedford, MA) e injetadas em um sistema aparelho Shimadzu, coluna de 5mm C18 120 Å (4,6 mm x 250 mm), com detector equipado com arranjo diodo e com software LC-Solution. A coluna foi mantida a 40 °C durante toda a análise e a detecção foi em 265 nm. Para análise isocrática, a fase móvel usada foi uma mistura de ácido fórmico (0,1%)-acetonitrila a 77:23 (v/v) com um vazão de 0,5 mLmin<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL. A quantidade de fármacos adsorvido no micélio (mgg<sup>-1</sup> de biomassa seca) foi calculada de acordo com a equação (Pimentel, 1995):

$$q = (C - C_0) \times V / m$$

onde:

$q$  = quantidade de fármaco adsorvido em uma unidade de biomassa (mgg<sup>-1</sup>)

$C_0$  e  $C$  = concentração de fármaco na solução inicial (mgL<sup>-1</sup>) e após a biossorção

$V$  = volume da solução de fármaco

$m$  = quantidade de biomassa (g) utilizada no experimento

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial de *Trametes* sp. em processos biossorbitivos para a remoção de trimetoprima e sulfametoxazol foi avaliado submetendo a biomassa a 4 tipos de tratamentos. De acordo com os resultados, houve aumento na capacidade biossorbitiva para TMT com a biomassa tratada apenas com o calor (adsorção de 53,62%) quando comparado com os tratamentos submetidos à solução ácida e salina (adsorção 37,45% e 39%, respectivamente). Para SMZ a maior adsorção ocorreu quando a biomassa foi tratada com solução básica (35,74%). Em geral, a biomassa fúngica teve maior absorção do antibiótico TMT (Tabela 1).

Tipos de Tratamentos	Biossorção (%) TMT	mg de TMT adsorvido/g de biomassa seca	Biossorção (%) SMZ	mg de SMZ adsorvido/g de biomassa seca
Apenas calor	53,62	9,18	29,60	5,07
NaOH	41,29	7,07	35,74	6,11
HCl	37,45	6,41	32	5,48
NaCl	39	6,68	29,62	5,97

Tabela 1. Taxa de biossorção em % e mg/g de biomassa seca de trimetoprima (TMT) e sulfametoxazol (SMZ) a 50 mg/L.

A diferença na quantidade dos fármacos adsorvidos na biomassa fúngica pode ser atribuída às mudanças ocorridas na parede celular do micélio. Adsorção de solutos a partir de soluções ou materiais sólidos em suspensão (adsorventes) ocorre principalmente através de um dos seguintes mecanismos: troca de moléculas a partir da solução ao adsorvente, adsorção física, devido à forças de van der Waals e quimissorção (Bhole et al., 2004). As análises em HPLC mostraram que o tempo de retenção para TMT foi de aproximadamente 5 minutos e para SMZ de 10 minutos e que houve redução da quantidade dos antibióticos nas soluções contendo os fármacos e os pellets de *Trametes* sp. após 24 horas de contato (Figura 1).

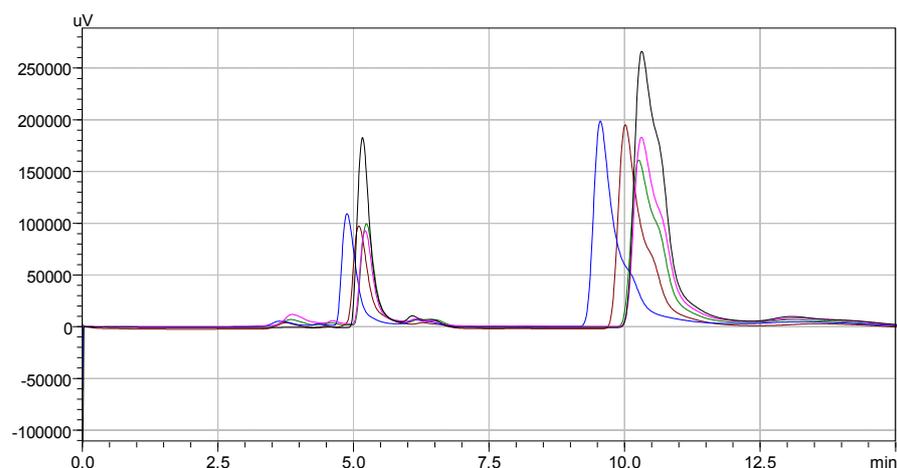


Figura 2. Cromatografia das amostras após 24 horas de contato dos pellets de *Trametes* sp. com as soluções contendo os fármacos: padrões trimetoprima e sulfametoxazol (—), biomassa tratada apenas com o calor (—), solução ácida (—), solução básica (—) e solução salina (—).

#### 4 | CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que *Trametes* sp foi capaz de reduzir as concentrações de sulfametoxazol e trimetoprima a partir de processos de adsorção. Os resultados mostram que para a melhor remoção de trimetoprima, por meio de biossorção a utilização da biomassa tratada apenas com o calor foi mais eficiente. Embora não tenha havido diferença entre os tipos de tratamento da biomassa usada na remoção de sulfametoxazol, a biomassa tratada com solução básica foi capaz de adsorver mais este fármaco. Sendo assim, *Trametes* sp pode ser utilizado como biossorvente no

tratamento complementar de águas residuais contendo este tipo de poluente.

## AGÊNCIAS DE FOMENTO

CNPq, Capes

## REFERÊNCIAS

- AKSU, Z. **Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review.** Process Biochemistry, v.40, p.997–1026, 2005.
- BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.-L.; CANTON, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.** Current Opinion in Biotechnology, v.19, n.3, p.260-265, 2008.
- BESSE, J.P.; GARRIC, J. **Human pharmaceuticals in surface waters implementation of a prioritization methodology and application to the french situation.** Toxicology Letters, v.176, n.2, p.104-123, 2008.
- BHOLE, B.D.; GANGULY, B.; MADHURAM, A.; DESHPANDE, D.; JOSHI, J. **Biosorption of methyl violet, basic fuchsin in and their mixture using dead fungal biomass.** Current Science, v.86, n.12, p.1641–1645, 2004.
- CHEE-SANFORD, J.C.; AMINOV, R.I.; KRAPAC, I.J.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. **Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities.** Applied and Environmental Microbiology, v.67, n.4, p.1494-1502, 2001.
- CHRISTEN, V., HICKMANN, S., RECHENBERG, B., FENT, K. **Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action.** Aquatic Toxicology, v.96, n.3, p.167-181, 2010.
- CRUZ-MARATÓ, C.; LUCAS, D.; LLORCA, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.; VICENT, T.; SARRÀ, M.; MARCO-URREA, E. **Hospital waste water treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceutical sand endocrine disruptor compounds.** Science of the Total Environment, v.493, p.365-376, 2014.
- ERDEM, E.; ÇÖLGEÇEN, G.; DONAT, R. **The removal of textile dyes by diatomite earth.** Journal of Colloid and Interface Science v.282, n.2, p.314-319, 2005.
- ESCHER, B.I.; BAUMGARTNER, R.; KOLLER, M.; TREYER, K.; LIENERT, J.; MCARDELL, C.S. **Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater.** Water Research, v.45, n.1, p.75-92, 2011.
- GUPTA, VK.; ALI, I.; SAINI, VK. **Removal of Dyes from Wastewater Using Bottom Ash.** Industrial Engineering Chemistry Research, v.44, n.10, p.3655-3664, 2005.
- LIU, S.; YING, G.-G.; ZHAO, J.-L.; CHEN, F.; YANG, B.; ZHOU, L.-J.; LAI, H.-J. 2011. **Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v.1218, n.10, p.1367-1378.
- LLORET, L.; EIBES, G.; LU-CHAU, T.A.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. **Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens.** Biochemical Engineering Journal, v.51, n.3, p.124-131, 2010.

PIMENTEL, D. **Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics.** Journal of Agricultural and Environmental Ethics, v.8, p.17–29, 1995.

SANCHEZ, W.; SREMSKI, W.; PICCINI, B.; PALLUEL, O.; MAILLOT-MARECHAL, E.; BETOULLE, S.; JAFFAL, A.; AIT-AISSA, S.; BRION, F.; THYBAUD, E.; HINFRAY, N.; PORCHER, J.-M. **Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges.** Environment International, v.37, n.8, p.1342-1348, 2011.

SILVA, B.F.D.; JELIC, A.; LÓPEZ-SERNA, R.; MOZETO, A.A.; PETROVIC, M.;

BARCELÓ, D. **Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the ebro river basin.** Chemosphere, Espanha, v.85, n.8, p.1331-1339, 2011.

SIM, W.-J.; LEE, J.-W.; LEE, E.-S.; SHIN, S.-K.; HWANG, S.-R.; OH, J.-E. **Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures.** Chemosphere, v.82, n.2, p.179-186, 2011.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. **Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants.** Applied catalysis B: Environmental, v.46, n.1, p.1-15, 2003.

VALCÁRCEL, Y.; GONZÁLEZ ALONSO, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J.L.; GIL, A.; CATALÁ, M. **Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the madrid region (spain) and potential ecotoxicological risk.** Chemosphere, v.84, n.10, p.1336-1348, 2011.

ZHOU, J.L.; ZHANG, Z.L.; BANKS, E.; GROVER, D.; JIANG, J.Q. **Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water.** Journal of Hazardous Materials, v.166, n.2-3, p.655-661, 2009.

ZOU, X.; LIN, Z.; DENG, Z.; ZHANG, Y. **The joint effects of sulfonamides and their potentiators on photobacterium phosphoreum: differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms.** Chemosphere, v.86, n. 1, p.30-35, 2012.

## ANORMALIDADES ERITROCÍTICAS EM *Sciades herzbergii* E FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE RIOS DA ILHA DO MARANHÃO

**Natália Jovita Pereira**

Universidade Estadual do Maranhão

São Luís - Maranhão

**Nayara Duarte da Silva**

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - São Paulo

**Sildiane Martins Cantanhêde**

Universidade Federal do Pará

Belém – Pará

**Janderson Bruzaca Gomes**

Universidade Estadual do Maranhão

São Luís - Maranhão

**Ligia Tchaicka**

Universidade Estadual do Maranhão

São Luís - Maranhão

**Débora Martins Silva Santos**

Universidade Estadual do Maranhão

São Luís - Maranhão

**RESUMO:** Os ambientes aquáticos vêm sofrendo intensa degradação em sua composição de fauna e flora, devido à intensa urbanização desordenada. O presente trabalho objetivou avaliar a contaminação de dois rios da Ilha do Maranhão através da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Sciades herzbergii* associada a análises de variáveis bióticas e abióticas da água. As áreas de estudo foram os rios Bacanga

e Santo Antônio, da macrorregião de São Luís, onde foram realizadas coletas simultâneas de peixes e amostras de água de agosto de 2015 a julho de 2016. Nas amostras de água foram aferidos os parâmetros de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, e determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes. Na análise hematológica, o sangue dos peixes foi coletado e preparado extensões sanguíneas para análise e contagem de micronúcleo e das anormalidades nucleares. Como resultados, os parâmetros físico-químicos da água apresentaram-se constantes. No entanto, os valores de oxigênio dissolvido de todas as amostras estavam abaixo do recomendado pela legislação. Já a concentração de coliformes termotolerantes foi acima do permitido, indicando que os rios Bacanga e Santo Antônio recebem lançamento de carga poluidora de dejetos humanos. Na análise hematológica foram encontradas micronúcleos e irregularidades no contorno da carioteca em todos os espécimes coletados, essas alterações podem estar relacionadas à exposição de xenobióticos presentes no local. Conclui-se que biomarcadores hematológicos associados com variáveis bióticas e abióticas são ferramentas promissoras na avaliação da contaminação de ambientes aquáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Peixe, Hematologia, Monitoramento aquático.

**ABSTRACT:** The aquatic environments have suffered intense degradation in their composition of fauna and flora, because the intense disordered urbanization. The present work aimed to evaluate the contamination of two rivers of the Island of Maranhão through the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Sciades herzbergii* associated with analyzes biotic and abiotic variables of the waters. The study areas were the Bacanga and Santo Antônio rivers, from the São Luís macroregion, where simultaneous fish and water samples were collected from August 2015 to July 2016. In the water samples, were measured the parameters of temperature, pH, dissolved oxygen and determination of the most probable number of thermotolerant coliforms. In the hematological analysis, fish blood was collected and were prepared blood extensions for analysis and micronucleus and nuclear abnormalities score. As a result, the physical-chemical parameters of water were constant. However, the dissolved oxygen values of all samples were below that recommended by the legislation. The concentration of thermotolerant coliforms was above the permeate, indicating that the Bacanga and Santo Antônio rivers receive a pollutant load of human waste. In the haematological analysis micronuclei and irregularities in the carioteca contour were found in all specimens collected, these alterations may be related to the exposure of xenobiotics present in the site. It is concluded that hematological biomarkers associated with biotic and abiotic variables are promising tools in the evaluation of aquatic environment contamination.

**KEYWORDS:** Fish, Hematology, Aquatic Monitoring

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente (MARTINHO et al., 2016). Onde, a biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão (ARIAS et al, 2007). Tal fato tem contribuindo para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da sanidade dessa biota que habita esses ecossistemas (VENTURA et al., 2015).

Para Manso et al. (2015) os peixes são excelentes biomonitoradores para os estudos avaliativos do potencial mutagênico e/ou carcinogênico, uma vez que, segundo Bueno et al. (2017), esses organismos apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, podendo metabolizar, concentrar e armazenar substâncias contaminantes na água.

Segundo Lupepsa et al., (2018), os agentes mutágenos, conseqüentemente genotóxicos, podem interagir quimicamente com o material genético de peixes, originando segregação e quebras em cromossomos e cromátides.

Ensaio citogenéticos utilizando parâmetros hematológicos vêm sendo comumente utilizados em vários sistemas biológicos para o monitoramento de genotoxicidade

ambiental (ARAUJO et al., 2015; VIANA et al., 2017), com o objetivo de avaliar o potencial que as substâncias têm de causar danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos em células em estágio de divisão (CARVALHO et al., 2017), uma vez que esses danos podem comprometer a oxigenação nos tecidos e causar efeitos deletérios quanto a integridade do material genético do animal (RANZINI-PAIVA, SILVA-SOUZA, 2004; FERREIRA, 2004).

Com a utilização de biomonitores da espécie *Sciades herzbergii*, esse estudo objetivou avaliar a contaminação de dois rios da Ilha do Maranhão através da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos dos peixes, associada a análises de variáveis abióticas das águas dos locais.

## 2 | METODOLOGIA

As áreas de estudo selecionadas foram o rio Bacanga e rio Santo Antônio, da macrorregião de São Luís, Maranhão (Figura 1). O rio Bacanga está localizado na porção noroeste da Ilha de São Luís, com área de aproximadamente de 110 km<sup>2</sup> (SANTOS et al., 2017), correspondendo a um sistema biofísico e socioeconômico onde são desenvolvidas atividades agrícolas e industriais em seu entorno. O rio Santo Antônio está localizado no município de Paço do Lumiar, com curso total de 100,46 km<sup>2</sup> (DE ARAÚJO et al., 2009), onde as atividades antrópicas de influência nesse corpo hídrico se caracterizam por práticas rurais de subsistência.

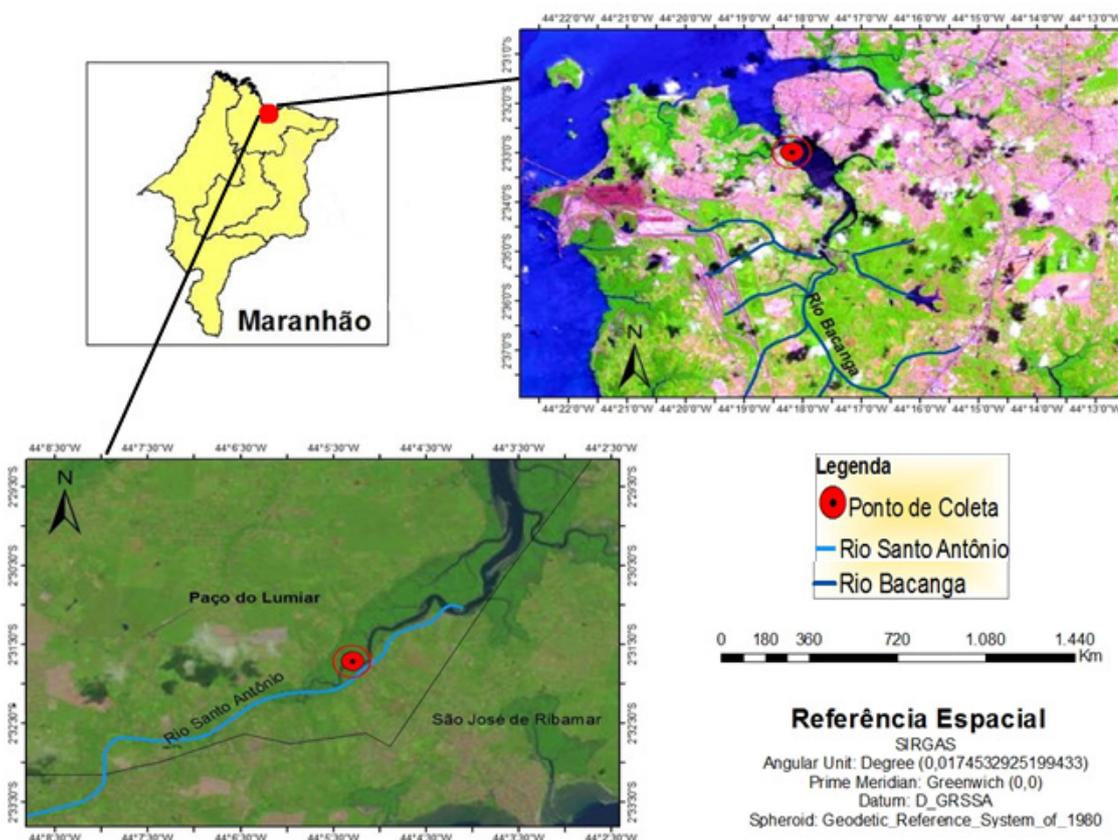


Figura 1. Localização das áreas de estudo do rio Bacanga e rio Santo Antônio, Ilha do Maranhão, Brasil.

A espécie biomonitora para avaliação da qualidade das áreas de estudo foi *Sciades herzbergii*, que pertence à superordem Ostariophysi, ordem dos Siluriformes, compreendendo 35 famílias, 412 gêneros e 2405 espécies (CASTRO et al., 2003). Ocorrem em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce (MARCENIUK, 2005), sendo recursos pesqueiros abundantes em arrastos de fundo de zonas litorâneas tropicais, possuindo boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes e apresentando alto potencial de comercialização (DE LIMA et al., 2016).

Foram realizadas coletas simultâneas de *Sciades herzbergii* e amostras de água nos dois locais, de agosto de 2015 a julho de 2016, compreendendo os períodos sazonais característicos do Maranhão, seco e chuvoso, sendo a primeira realizada na estiagem e a segunda na estação de chuvas.

Para as amostras de água foram aferidos os parâmetros físico-químicos de temperatura (T°) e pH, utilizando o método Eletrométrico e oxigênio dissolvido (OD) através do método Tilulométrico; e o parâmetro microbiológico de determinação do número mais provável (NMP) de Coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*), utilizando o teste do substrato enzimático cromogênico (ONPG) e fluorogênico (MUG) (APHA, 2005).

Com uma média de 15 animais por coleta, totalizando 64 espécimes capturados, a coleta dos biomonitores deu-se por pesca artesanal, com uso de tarrafa, onde os procedimentos de manejo e laboratoriais seguiram as normas de conduta do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Na preparação hematológica para análises de micronúcleos e deformidades nucleares foi retirado 1mL de sangue de cada peixe através de punção branquial com auxílio de seringa (RANZANI-PAIVA et al., 2013) ainda em campo, sendo posteriormente confeccionadas extensões sanguíneas. No Laboratório de Morfofisiologia Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), as lâminas secaram durante 24 horas, sendo coradas em seguida com o corante Rosenfeld modificado. As extensões sanguíneas foram analisadas em microscópio de luz em objetiva de 1000x, com a utilização de óleo de imersão. Para a contagem das anormalidades nucleares, contabilizou-se uma média 2.000 células por peixe, e seguiu-se a identificação de anormalidades adaptado de Fenech et al. (2003).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para os dados abióticos aferidos nos rios em estudo estão indicados na tabela 1. A temperatura da superfície da água e o pH dos ambientes apresentaram-se constantes nos dois pontos de coleta. No entanto, os valores de oxigênio dissolvido encontrados de todas as amostras estão abaixo do recomendado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - Conama.

Parâmetros abióticos	Coleta 1 (Período seco)		Coleta 2 (Período chuvoso)		Valores recomendados
	S1	S2	S1	S2	
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	3,70	2,9	3,5	2,30	≥ 5*
pH	7,6	8,09	8,0	7,8	6,5 a 8,5*
Temperatura (°C)	20,2	24	27,5	28,4	≤ 40*

Tabela 1. Valores dos parâmetros físicos e químicos das amostras de água dos rios Bacanga e Santo Antônio, Maranhão.

S1= rio Bacanga; S2= rio Santo Antônio; \* Resolução Conama nº357/2005 e nº430/2011

Oxigênio dissolvido (OD) é um sensível indicador de fenômenos biológicos e químicos, sendo o mais importante na caracterização ambiental, podendo ser usado como indicador de condições de poluição por matéria orgânica (ZENI, OSTRENSKY, 2016).

Os níveis de concentração de OD podem ser influenciados pela atmosfera, através de movimentos ondulatórios ocasionados pelos ventos e oscilações de temperatura da água (PEZZI et al., 2016); pela fotossíntese, realizada pelos organismos clorofilados que desdobram o gás carbônico sob a ação da luz solar liberando o oxigênio no meio (BARBOSA et al., 2014); e pela decomposição de matéria orgânica por bactérias, com o consumo de oxigênio disponível no meio pelos micro-organismos decompositores (ABREU et al., 2017).

Os valores encontrados do NMP de coliformes termotolerantes por 100mL nas análises microbiológicas seguem na tabela 2, onde todas as amostras de água dos locais demonstraram a presença de bactérias termotolerantes em valores superiores ao estabelecido pelo Conama.

Parâmetro microbiológico	Coleta 1 (Período seco)		Coleta 2 (Período chuvoso)		Valor recomendado
	S1	S2	S1	S2	
NMP/100mL de coliformes termotolerantes	>2.400	>2.400	>2.400	>1.986	≤1.000 *

Tabela 2. Valores das análises microbiológicas das amostras de água dos rios Bacanga e Santo Antônio, Maranhão.

S1= rio Bacanga; S2= rio Santo Antônio; \* Resolução Conama nº357/2005 e nº430/2011

Os coliformes termotolerantes compreendem as bactérias que são encontradas no intestino de homens e animais, tendo como principal representante a *Escherichia coli* (SILVA, et al., 2005). Esta vive exclusivamente no intestino humano, onde, sua presença em corpos d'água é um grande indicativo de que o ambiente foi contaminado por efluentes domésticos sem tratamento (CABRAL, 2010; OLIVEIRA et al., 2016). Sendo assim, os coliformes termotolerantes são usados frequentemente para avaliar

a qualidade da água e indicar a contaminação por dejetos de excreção fecal (ARRUDA et al., 2016).

A alta concentração de coliformes termotolerantes é indicativa de que os rios Bacanga e Santo Antônio estão recebendo lançamento de carga poluidora de dejetos humanos *in natura*, possibilitando a proliferação de bactérias e provocando problemas quanto a contaminação por esses microorganismos, onde se recomenda a não utilização da água desses locais para qualquer que seja a finalidade.

Os resultados obtidos para o Bacanga estão em consonância com os de outros estudos desenvolvidos no local. Martins (2008) relatou que os parâmetros abióticos encontrados estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, e Coelho e Damázio (2006) ressaltaram a contaminação das águas de superfície e dos aquíferos da bacia do Bacanga.

As baixas quantidades de oxigênio dissolvido encontradas nos locais em análise levam a consideração de que os níveis de OD dos rios estão diretamente relacionados a intensa atividade bacteriana dos coliformes termotolerantes, a qual decompõe a matéria orgânica lançada no corpo d'água, consumindo assim o oxigênio disponível.

Nas análises de micronúcleos e deformidades nucleares, foram encontradas anormalidades eritrocíticas em todos os espécimes coletados, considerando-se micronúcleos e irregularidades no contorno da carioteca, segundo adaptado de Fenech et al. (2003) (Figura 2).

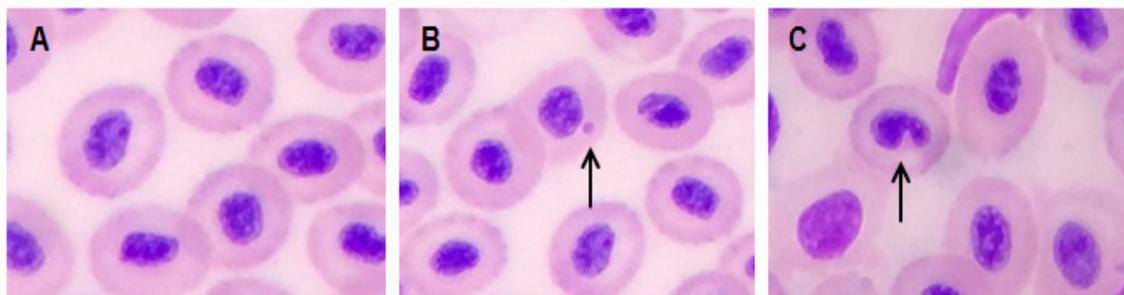


Figura 2. Anormalidades em eritrócitos de *Sciades herzbergii* coletados nos rios Bacanga e Santo Antônio, Maranhão. Em A eritrócitos normais; B micronúcleo (seta); C deformidade nuclear. Coloração Rosenfeld modificada. Aumento 1000x.

A frequência de micronúcleos e deformidades nucleares pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (MERSCH, BEAUVAIS, 1997; GALINDO et al., 2012), uma vez que as células sofrem alterações na distribuição ou quebra de suas cromátides durante a anáfase, onde os fragmentos cromossômicos não acompanham a migração para os pólos da célula, e, após a telófase, tais fragmentos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (VON LEDEBUR, SCHMID, 1973), ou anomalias no contorno da carioteca, devido a ação de agentes tóxicos (FERREIRA, 2004).

As anormalidades eritrocíticas são considerados marcadores simples, que podem

ser examinados em preparações citológicas, onde sua constância aparece aumentada em organismos expostos a xenobióticos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente (FERREIRA, 2004). Assim, análises de sangue periférico em peixes possibilita a detecção de efeitos genotóxicos provocados por vários agentes químicos e físicos difusos, podendo ser utilizado para avaliação das condições ambientais aquáticas (THOMÉ et al., 2016).

A função dos eritrócitos consiste no transporte de gases respiratórios, por meio de ligação com a hemoglobina (SATAKE et al., 2009), além de abrigar o material genético envolto pela carioteca (FERREIRA, 2004). Deficiências em número ou forma dos eritrócitos pode comprometer a oxigenação nos tecidos (RANZINI-PAIVA, SILVA-SOUZA, 2004), e pode significar menor capacidade de transporte de gases no interior do corpo do animal (SATAKE et al., 2009) interferindo em processos metabólicos envolvendo o estado nutricional, a maturação e desenvolvimento sexual e crescimento.

Os baixos valores de OD em conjunto com as altas concentrações de bactérias termotolerantes podem intensificar o comprometimento de oxigenação dos tecidos dos peixes e formação das anormalidades no eritrócitos, sendo fatores sinérgicos que se somam influenciando na sanidade dos espécimes píceos.

A fragmentação cromossômica, causando aglomerações de cromatina e consequente formação de micronúcleos, pode originar células filhas com deletérios quanto a integridade do material genético do animal, que resultam em insuficiências de segregação ou recombinação na duplicação do material genético (FERREIRA, 2004; VIANA et al., 2017). Dessa forma, animais que contenham grande quantidade de eritrócitos com micronúcleos podem apresentar dificuldades na renovação de células sanguíneas.

Em relação a frequência de micronúcleos e deformidades nucleares nos locais em estudo, na tabela 3 observa-se que houve maior quantidade de micronúcleos em *Sciades herzbergii* do rio Bacanga, e pouca variação para deformidades na carioteca em ambos locais.

Anormalidades eritrocíticas	Coleta 1 (Período seco)		Coleta 2 (Período chuvoso)	
	S1	S2	S1	S2
<b>Micronúcleos</b>	6,05	0,67	8,78	0,72
<b>Deformidades nucleares</b>	1,4	1,51	1,42	1,0

Tabela 3. Médias das frequências de micronúcleos e deformidades nucleares em eritrócitos de *Sciades herzbergii* coletados nos rios Bacanga e Santo Antônio, Maranhão.

A localização do rio Bacanga na região central de São Luís, e por ser aporte de lançamento de afluentes agrícolas e industriais, pode ter influenciado na maior frequência dos micronúcleos, enquanto que, o rio Santo Antônio, localizado na região

rural de Paço do Lumiar, na macrorregião de São Luís, apresenta práticas rurais de subsistência em seu entorno, sem grandes empreendimentos e indústrias próximos. Assim, considera-se altas as concentrações de agentes clastogênicos e aneugênicos presentes no Baganca, onde a presença de micronúcleos foi interpretada como indício de danos genotóxicos nos peixes ocasionados por contaminantes desse rio.

As alterações identificadas na estrutura das células sanguíneas podem ser utilizadas como ferramenta para avaliação prognósticas em peixes expostos a situações de estresse por xenobióticos aquáticos (ZAMINHAN et al., 2017), assim, infere-se a evolução de processos patológicos a partir da avaliação qualitativa e quantitativa de células sanguíneas (SATAKE et al., 2009).

De acordo com Ranzini-Paiva e Silva-Souza (2004), a aplicação da citologia em pesquisas com animais é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnóstico. Em peixes, este tipo de diagnóstico vem sendo aperfeiçoado e cada vez mais utilizado, por se tratar de uma importante ferramenta para o diagnóstico do estado patológico dos peixes (ARAUJO et al. 2015).

A detecção de anormalidades em eritrócitos de peixes tem sido uma técnica muito utilizada para avaliar danos às estruturas cromossômicas causado por substâncias xenobióticas nos organismos (MELO et al., 2014; VENTURA et al., 2015; GOES et al., 2016), sendo eficiente nas respostas fisiológicas dos animais, além de representar um diagnóstico de sanidade que limita-se a extração de uma pequena quantidade de sangue, em que o animal pode ser devolvido em vida, sem danos, ao ambiente aquático em que habita.

O conhecimento de análises citológicas em eritrócitos em peixes de ambientes naturais é importante para identificar as alterações metabólicas, derivadas sanidade e de fatores ambientais, que possam interferir no sistema de defesa dos animais (KNOWLES et al., 2006; ARAUJO et al. 2015).

#### 4 | CONCLUSÃO

As baixas quantidades de oxigênio dissolvido associadas as altas concentrações de coliformes termotolerantes podem influenciar na disponibilidade de oxigênio para a biota aquática dos rios Bacanga e Santo Antônio, sendo agravado pela má formação dos eritrócitos em peixes, interferindo no transporte de gases pela corrente sanguínea e na integridade do material genético dos animais. A preparação hematológica diante da frequência de micronúcleos e deformidades no contorno da carioteca encontrados em *Sciades herzbergii* levaram a avaliações diagnósticas indicando a contaminação dos rios maranhenses pela presença de xenobióticos nos locais.

## REFERÊNCIAS

ABREU, A.; FREGONESI, B.; DE, K.; VILELA, T.; SMIDT, B.; BELTRAMINI, T.; SEGURA-MUÑOZ, S. Y DA, R. **Diagnóstico espacial e temporal de condições físico-químicas e microbiológicas do Córrego do Tanquinho, Ribeirão Preto, SP, Brasil**. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, vol. 12, no. 2, p. 282-298, 2017. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92849898010>>.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 19 th . ed. Washington, 1995. Disponível em: <[https://www.mwa.co.th/download/file\\_upload/SMWW\\_1000-3000.pdf](https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf)>.

ARAUJO, D. D. M.; JUNIOR, F.; CALVO, A.; TEIXEIRA, C. P.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. **Perfil hematológico de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes lipídeos e estimuladas por baixa temperatura**. *Revista Caatinga*, p. 220-227, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/128437>>

ARIAS, R. L. A.; BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, p. 61-72, 2007. Disponível em: <<https://www.scielosp.org/article/csc/2007.v12n1/61-72/>>.

ARRUDA, M. O.; DALMAS, B. R.; F., MILITÃO, F. A.; SANTOS, J. C.; GARCIA, A. P. **Análise geoambiental aplicada ao estudo da relação entre qualidade da água e ocupação das margens da represa Guarapiranga (São Paulo/SP), entre 2004 e 2014**. *Revista Geociências*, v. 15, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/geociencias/article/viewFile/2383/1740>>.

BARBOSA, M. R.; SILVA, A. M. M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. **Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas**. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33130091011>>.

BUENO, A. P. M.; DA GRAÇA VASCONCELOS; M., FRANCISCO, C. M.; PAVANIN, L. A. **Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, Minas Gerais**. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 32-36, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.22571/Actabra13201755>>.

CABRAL, J. P. **Water microbiology. Bacterial pathogens and water**. *International journal of environmental research and public health*, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7103657>>.

CARVALHO, L. G.; BRITTO, F. F.; MARIN-MORALES, M. A.; MAFFEI, E. M. D. **Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo**. *Revista da Biologia*, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017. Disponível em: DOI: 10.7594/revbio.17.01.01.

CASTRO, R.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; FERREIRA, K. M.; RIBEIRO, A. C., BENINE; R. C.; BOCKMANN, F. A. **Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil**. *Biota Neotropica*, v. 3, n. 1, p. 1-31, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032003000100007>>.

COELHO, C. J. DA C.; DAMÁZIO, E. Aspectos da disponibilidade e dos usos da água na bacia do rio Bacanga/ Ilha do Maranhão (São Luís) – MA. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, n. 19, p. 73-84, 2006.

Conama – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>.

Conama – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 430, de**

**13 de maio de 2011.** Brasília: Diário Oficial da União, 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/res43011.pdf>>.

DE ARAÚJO, E. P.; TELES, M. G. L.; LAGO, W. J. S. **Delimitação das bacias hidrográficas da Ilha do Maranhão a partir de dados SRTM.** Anais... XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, Brasil, 25 a 30 de abril de 2009, INPE, p. 4631- 4638. Disponível em: <<http://marte.sid.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2008/11.17.23.07.25/doc/4631-4638.pdf>>.

DE LIMA, L. T. B.; OLIVEIRA, M. R.; NÓBREGA, M. F.; DE CARVALHO, M. M.; CHELLAPPA, S.; OLIVEIRA, J. E. L. **Biologia reprodutiva de Bagre marinus (Mitchill, 1815)(Siluriformes: Ariidae) das águas costeiras do Rio Grande do Norte, Brasil.** Biota Amazônia, v. 6, n. 4, p. 81-86, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n4p81-86>>.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. **HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)>.

FERREIRA, C. M. **Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática.** Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Editora Varela, p. 273-284, 2004.

GALINDO, T.; DA SILVA, E.; ROSÁRIO, I. **Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de Bathygobius soporator (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no Litoral de Salvador (BA), Brasil.** Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14210/bjast.v16n1.p1-7>>.

GOES, I. M. C.; DE ABREU FREITAS, J. S.; SANTOS, J. M. K.; MACIEL, L. A. M.; PORTELA, A. **Avaliação da poluição do rio tapajós, no município de Santarém-PA, através do teste do micronúcleo, utilizando peixes como bioindicador.** Revista EM FOCO-Fundação Esperança/ IESPE, v. 1, n. 23, p. 6-16, 2015. Disponível em: <<http://iespes.edu.br/revistaemfoco/index.php/Foco/article/view/40/33>>.

KNOWLES, S.; HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; BAKAL, R. S. **Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (Acipenser brevirostrum).** Veterinary Clinical Pathology, v. 35, n. 4, p. 434-440, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00160.x>>.

LUPEPSA, L.; DE ALMEIDA, D. J.; DIAS, F. V. **Ação de estrogênios naturais ( $\beta$ -estradiol) e sintéticos (17  $\alpha$ -etinilestradiol) sobre distintas comunidades de peixes: sob ênfase genotóxica.** Revista Uningá, v. 53, n. 2, 2018. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/1422>>

MANSO, J. A. X.; HANUSCH, A. L.; DA SILVA, C. C.; DA CRUZ, A. D.; DA CRUZ, D. M. **Avaliação do Potencial Mutagênico de *Bauhinia L. sp.*** Estudos, v. 41, p. 75-82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18224/est.v41i0.3853>>.

MARCENIUK, A. P. **Redescrição de *Genidens barbatus* (Lacépède, 1803) e *Genidens machadoi* (Miranda-Ribeiro, 1918), bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) do Atlântico sul ocidental.** Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo), v. 45, n. 11, p. 111-125, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0031-10492005001100001>>.

MARTINHO, H. M. G.; FERREIRA, R. M.; BORGES, J. C. S. **Indicadores biológicos aquáticos como instrumentos de prova pericial em ambiente marinho por contaminação petrolífera utilizando legislação específica.** Revista Direito Mackenzie, v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://editorarevistas.mackenzie.br/index.php/rmd/issue/view/542>>.

MARTINS, A. L. P. **Avaliação da qualidade ambiental da bacia hidrográfica do Bacanga (São**

**Luís- MA) com base em variáveis físico-químicas, biológicas e populacionais: subsídios para um manejo sustentável.** São Luís, 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas). Universidade Federal do Maranhão, 2008. Disponível em: <<https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/1201>>.

MELO, K. M.; GRISOLIA, C. K.; PIECZARKA, J. C.; DE SOUZA, L. R.; FILHO, J. D. S.; NAGAMACHI, C. Y. **Fish in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Mutagenesis*, v. 29, n. 3, p. 215-219, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/mutage/geu005>>.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N. **The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments.** *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 393, n. 1, p. 141-149, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00099-5)>.

OLIVEIRA, A. J.; SANTOS, M. C. H.; ITAYA, N. M.; CALIL, R. M. **Coliformes Termotolerantes: bioindicadores da qualidade da água destinada ao consumo humano.** *Atas de Saúde Ambiental-ASA*, v. 3, n. 2, p. 24-29, 2016. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ASA/article/view/949>>.

PEZZI, L. P.; SOUZA, R. B.; QUADRO, M.; PIAZ, M. A. D.; FRANKE, L. L. C.; BALESTRIN, M. R.; PICOLI, M. C. A. **Uma revisão dos processos de interação oceano-atmosfera em regiões de intenso gradiente termal do oceano atlântico sul baseada em dados observacionais.** *Revista Brasileira de Meteorologia*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 428-453, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0102-778631231420150032>>.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes.** Maringá: Eduem, 2013, 140p.

RANZINI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de peixes brasileiros.** In: RANZINI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Ed. Varela, 2004. cap.4, p. 89-120.

SANTOS, A. K. D.; CUTRIM, M. V. J.; FERREIRA, F. S.; SANTOS, R. LUVIZOTTO; CUTRIM, A. C. G. A.; ARAÚJO, B. O.; DINIZ, S. C. D. **Aquatic life protection index of an urban river Bacanga basin in northern Brazil, São Luís-MA.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 77, n. 3, p. 602-615, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.01016>>.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. **Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica.** In: TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. 1o ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-45, 2009.

SILVA, N. D.; NETO, R. C.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. D. A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** São Paulo: Varela, 2005, 164p.

THOMÉ, R. G.; DA SILVA, P. M.; DOS SANTOS, H. B. **Avaliação de Genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de *Danio rerio*.** *Conexão Ciência (Online)*, v. 11, n. 2, p. 9-16, 2016. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/311665042>>.

VENTURA, A. S.; CORSINI, F. E.; DE ARAÚJO GABRIEL, A. M. **Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes.** *Nutritime*, v. 12, n. 6, p. 4500-4507, 2015. Disponível em: <[http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/354\\_-\\_4500-4507\\_-\\_NRE\\_12-6\\_nov-dez\\_2015.pdf](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/354_-_4500-4507_-_NRE_12-6_nov-dez_2015.pdf)>.

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; DO AMARAL CRISPIM, B.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. **Mutagenic and genotoxic effects and metal contaminations in fish of the Amambai River, Upper Paraná River, Brazil.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 35, p. 27104-27112, 2017. Disponível em: DOI: 10.1007/s11356-017-0276-8

VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. **The micronucleus test methodological aspects**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 19, n. 1, p. 109-117, 1973. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90118-8)>.

ZAMINHAN, M.; MALUF, M. L. F.; FRIES, E. M.; SALVADOR, S. C.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. **Parâmetros hematológicos e bioquímicos do surubim do Iguçu (*Steindachneridion melanodermatum*) criados em tanques-rede**. Agrarian, v. 10, n. 36, p. 181-188, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.30612/agrarian.v10i36.4115>>.

ZENI, T. O.; OSTRENSKY, A. **Respostas adaptativas de peixes a alterações ambientais de temperatura e de oxigênio dissolvido**. Archives of Veterinary Science, v. 21, n. 3, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v21i3.40165>>.

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES: CORDYCIPTACEAE) E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Pogostemon cablin* (LAMIALES: LAMIACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus* (GALLIFORMES: PHASIANIDAE)

### Lucas Trentin Larentis

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Curso de Ciências Biológicas  
Dois Vizinhos – PR

### Tainá dos Santos

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Curso de Ciências Biológicas  
Dois Vizinhos – PR

### Alanda de Oliveira

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Curso de Ciências Biológicas  
Dois Vizinhos – PR

### Patricia Franchi de Freitas

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas  
Dois Vizinhos – PR

**RESUMO:** Testes com ovos embrionados de galinha, usando o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Patchouli), foram realizados para avaliação de seus efeitos sobre o desenvolvimento inicial de vertebrados. Os ovos receberam injeção na câmara de ar das diferentes soluções testadas, previamente à incubação, exceto os do grupo controle fechado, os quais não foram injetados. Em seguida, os ovos foram incubados por três dias (72 horas). Após este período, eles foram abertos para a contabilização de embriões que

desenvolveram e estavam vivos, embriões que continuaram a se desenvolver e morreram e embriões inviáveis, que nem retomaram o desenvolvimento. Os embriões vivos foram então eutanasiados, coletados, preparados por montagem total e analisados morfológicamente para a determinação do estágio e verificação da presença de malformações. De acordo com os dados obtidos, verificou-se que o tratamento com a suspensão do fungo entomopatogênico *B. bassiana* induziu maiores taxas de inviabilidade embrionária, mortalidade e malformações, enquanto que as menores foram encontradas no tratamento com o óleo essencial. Embora essas taxas tenham sido menores no tratamento com o óleo essencial, elas foram semelhantes no tratamento utilizando somente o veículo (Tween® 80). Desta forma, concluiu-se que testes futuros devem ser realizados, utilizando outro(s) veículo(s).

**PALAVRAS-CHAVE:** fungo entomopatogênico, Patchouli, malformações, Embriotoxicologia.

**ABSTRACT:** Tests with embryonated chicken eggs using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and essential oil of *Pogostemon cablin* (Patchouli) were carried out to evaluate their effects on the initial development of vertebrates. The different tested solutions were injected into the eggs' air chamber, prior to incubation, except for the control group, which

were not injected. The eggs were then incubated for three days (72 hours). After this period, they were opened for the counting of embryos that had developed and were alive, embryos that continued to develop and died, and unviable embryos – that did not resume development. The live embryos were euthanized, collected, prepared by total assembly and morphologically analyzed for stage determination and malformation verification. According to the data obtained, the treatment with the entomopathogenic fungus *B. bassiana* was found to induce higher rates of embryonic unviability, mortality and malformations, whereas the lowest ones were found in the treatment with the essential oil. Although these rates were lower in essential oil treatment, the results were similar to the vehicle group (using Tween® 80). By this mean, it was concluded that future tests should be performed using other vehicle(s).

**KEYWORDS:** entomopathogenic fungus, Patchouli, malformations, Embryotoxicology.

## 1 | INTRODUÇÃO

Para minimizar os danos causados pelo uso de produtos fitossanitários sintéticos, investe-se, em especial, em dois tipos de controle de espécies-praga: os controles alternativo e biológico. Entende-se por controle alternativo, o uso de compostos, substâncias e/ou atividades que não agridam o ambiente, mas atinjam determinado inseto-praga. O controle biológico se utiliza de organismos predadores ou outros seres vivos que possam controlar uma espécie-praga específica.

Em embriotoxicologia, a utilização do embrião de ave tem sido fortemente ampliada, pois há alguns aspectos favoráveis ao seu uso, tais como: (i) os ovos são do tipo telolécito; (ii) apresentam membranas envoltórias resistentes; (iii) o tempo total de desenvolvimento é curto (21 dias); (iv) os embriões se desenvolvem na ausência do organismo materno e na região superior do ovo, permitindo o acompanhamento em laboratório e (v) seu desenvolvimento é documentado. Tais características fazem do embrião de ave um excelente modelo para avaliar os efeitos de agentes químicos ou biológicos sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados. O presente trabalho teve por objetivo analisar os efeitos de agentes de controle biológico e alternativo sobre embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram adquiridos de um incubatório comercial do município de Dois Vizinhos. No Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV, os 120 ovos foram divididos em cinco grupos experimentais: 1) Controle fechado (CF): ovos não injetados; 2) Controle veículo (CV): ovos injetados com 100 µl de Tween® 80 a 0,01%; 3) Óleo essencial a 0,75% (OEP0,75): ovos injetados com 100 µl de solução de óleo essencial de *P. cablin* a 0,75% em Tween® 80 a 0,01%; 4) Óleo essencial a 1% (OEP1): ovos injetados com 100 µl de solução de óleo essencial de *P. cablin* a

1% em Tween® 80 a 0,01%; e 5) Fungo *B. bassiana* (FBB): ovos injetados com 100 µl de suspensão do fungo *B. bassiana* na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> em Tween® 80 a 0,01%. Após 72 horas de incubação (em incubadora Chocmaster Juli 70), os ovos foram abertos e quando continha embrião, este foi observado para verificar se estava vivo (através da aferição da frequência cardíaca) e contabilizado para a análise de mortalidade. Então os embriões vivos foram coletados, eutanasiados e preparados pela técnica de montagem total. A análise morfológica e tomada fotográfica dos embriões foram realizadas em estereomicroscópio Physis. Os estágios de desenvolvimento de cada embrião e a presença de malformações foram verificados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até o momento demonstraram que o tratamento com FBB induziu maiores taxas de mortalidade, inviabilidade embrionária e malformações (30%, 55% e 66,7%, respectivamente – Tabela 1). É comprovada a eficácia de *B. bassiana* no controle de ácaros em galinhas (RASSETTE et al., 2011), porém, a exposição dos ovos férteis, pareceu induzir a inviabilidade embrionária.

Grupos	Ovos incubados	Vivos	Mortos	Inviáveis	Malformações*
CF	16 (100%)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	-	-
CV	18 (100%)	11 (61,1%)	2 (11,1%)	5 (27,8%)	3 (27,3%)
FBB	20 (100%)	3 (15%)	6 (30%)	11 (55%)	2 (66,7%)
OEP0,75	19 (100%)	12 (63,16%)	5(26,31%)	2(10,53%)	3 (25%)
OEP1	18 (100%)	11 (61,1%)	4 (22,2%)	3 (16,7%)	2 (18,2%)

Tabela 1 – Taxa de mortalidade, inviabilidade e malformações

\*Percentual calculado considerando apenas os embriões vivos no momento da abertura do ovo.

Nos grupos experimentais tratados com OEP0,75 e OEP1, foi possível observar mais de 60% de viabilidade (63,16% e 61,1%, respectivamente), enquanto que as taxas de mortalidade foram de 26,31% e 22,2%, respectivamente. A inviabilidade embrionária foi de 10,53%, em OEP0,75 e de 16,7% no OEP1, como contabilizada na Tabela 1. Atividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas, dentre outras aplicações, foram descritas por Swamy e Sinniah (2015) através de diversos estudos com óleo essencial de Patchouli. No CV, 61,1% dos embriões estavam vivos, 11,1% mortos e 27,8% foram considerados inviáveis.

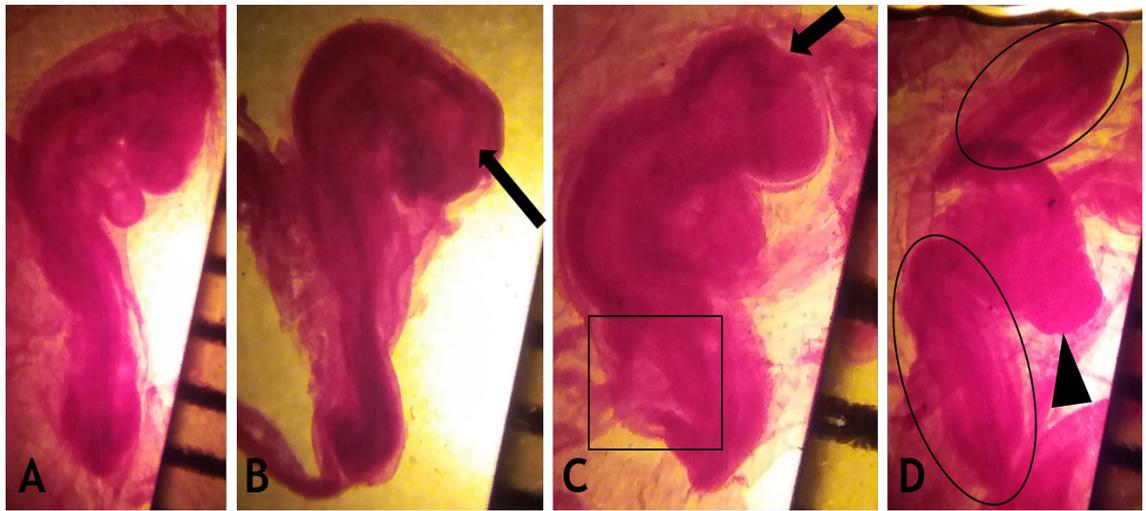


Figura 1 – Embriões de ave com 72h de incubação preparados por montagem total. A: Embrião normal no estágio 18. B: Embrião no estágio 19 com falha no fechamento do tubo neural na região cefálica (seta). C: Embrião de estágio indeterminado com falha no fechamento lateral do corpo (área quadriculada) e falha no fechamento do tubo neural na região cefálica (seta). D: Embrião gemelar imperfeito (em  $\lambda$ ) – contendo dois eixos corporais (áreas circuladas) e uma única região cefálica (cabeça de seta). Régua em mm.

Verificou-se que 66,7% dos embriões vivos tratados com *B. bassiana* apresentaram malformações, desde encurtamento do corpo e da cauda até falhas no fechamento do tubo neural da região cefálica (Figura 1B). O OEP1 apresentou a incidência de 25% de malformações. Dentre as mais graves registradas estão atrofia cefálica (microcefalia), agenesia caudal, dilatação do canal lacrimal e falhas no fechamento do tubo neural. Falha no fechamento do tubo neural na região cefálica (anencefalia), malformação caudal, falha no fechamento da parede do corpo (gastrosquise) (Figura 1C), atrofia do placoide óptico e formação de gêmeos imperfeitos (Figura 1D) constituem a gama de malformações encontradas no grupo CV.

#### 4 | CONCLUSÕES

Apesar de constituírem resultados parciais e preliminares, pois o projeto possui etapas ainda não realizadas, os dados obtidos até o presente momento pareceram indicar que tanto o OEP como o FBB apresentam efeito teratogênico para embriões de ave, contribuindo para um aumento na taxa de mortalidade. Adicionalmente, o FBB parece afetar a viabilidade embrionária. No entanto, testes futuros utilizando OEP e FBB em outro veículo, necessitam ser realizados, pois o veículo Tween® 80 aqui utilizado também demonstrou um efeito teratogênico. Desta forma, foi impossível determinar se esse efeito é decorrente do OEP ou FBB, ou apenas do veículo utilizado. Concluiu-se, então, que testes futuros devem ser realizados, utilizando outro(s) veículo(s) e/ou outras concentrações do mesmo veículo.

## REFERÊNCIAS

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, 88: 49-92, 1951.

RASSETTE, M. S. W.; PIERPONT, E. I.; WAHL, T.; BERRES, M. Use of *Beauveria bassiana* to control northern fowl mites (*Ornithonyssus sylviarum*) on roosters in an agricultural research facility. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 50, n. 6, p. 910–5, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3228930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SWAMY, M. K.; SINNIHAH, U. R. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An aromatic medicinal plant of industrial importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8521–8547, 2015.

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DO ISOLADO JUANT028 NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

**Igor Shoiti Shiraishi**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Londrina – Paraná

**Wellington Luiz de Oliveira**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Londrina – Paraná

**Robert Frans Huibert Dekker**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Londrina – Paraná

**Aneli de Melo Barbosa-Dekker**

Universidade Estadual de Londrina  
Londrina – Paraná

**Juliana Feijó de Souza Daniel**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Londrina – Paraná

**RESUMO:** Os fungos produzem metabólitos secundários com relevante potencial para o controle biológico de pragas e doenças de plantas, constituindo uma alternativa para o controle químico. No presente estudo, o extrato de um isolado fúngico codificado como JUANT028 foi avaliado de acordo com o seu potencial de inibir três fitopatógenos: *Botryosphaeria rhodina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. O isolado JUANT028 foi crescido sob fermentação submersa e também em meio sólido de arroz. A biomassa micelial e os filtrados dos cultivos

foram tratados com diferentes solventes, e os extratos obtidos foram adicionados em meio de BDA em diferentes concentrações (50, 150, 250 e 350  $\mu\text{g/mL}$ ) seguido pela inoculação de discos colonizados com cada um dos fitopatógenos no centro de cada placa de Petri, para avaliar o potencial de inibição dos extratos. Cultivos controles (sem extrato) como também cultivos enriquecidos com o fungicida Fluazinam (5 ppm) foram testados. A inibição do crescimento do *B. rhodina* foi 69,3 % usando 350  $\mu\text{g/mL}$  do extrato do meio de arroz extraído com acetato de etila, e 86,9 % para o fitopatógeno *F. oxysporum* com 350  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de clorofórmio obtido do meio de arroz, que apresentou inibição mais alta do que a obtida com fungicida químico (2,5 %). O *S. sclerotiorum* foi completamente inibido (100 %) por 250  $\mu\text{g/mL}$  do extrato obtido com clorofórmio. Os resultados apresentaram uma expressiva atividade biológica antagônica maior do que o tratamento químico, o que encoraja a pesquisas futuras para isolar e caracterizar os compostos ativos presentes nestes extratos.

**PALAVRAS-CHAVE:** controle biológico, fungo fitopatogênico, metabólitos, atividade antagônica.

**ABSTRACT:** Fungi produce secondary metabolites with relevant biocontrol potential against plant pests and diseases, being an alternative for chemical control. In the present

study, the extract of an isolated fungal strain codified as JUANT028 was evaluated according to its inhibition potential against three phytopathogens: *Botryosphaeria rhodina*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*. The fungal isolate JUANT028 was grown under submerged fermentation and in rice solid medium. The mycelial biomass and the culture filtrates were treated with different solvents, and the extracts obtained were added to PDA medium in different concentrations (50, 150, 250 e 350  $\mu\text{g/mL}$ ) followed by the inoculation of pellets colonized by the phytopathogen in the center of the Petri dish, in order to evaluate the inhibition potential of the extracts. Control cultures (no extract) as well as cultures enriched with fungicide Fluazinam (5 ppm) were also tested. The inhibition growth of *B. rhodina* was 69.3% using 350  $\mu\text{g/mL}$  of the rice medium extracted with ethyl acetate, and 86.9% for the phytopathogen *F. oxysporum* with 350  $\mu\text{g/mL}$  of chloroform extract from the rice medium, which was higher than the inhibition due to the chemical fungicide (2,5%). *S. sclerotiorum* was completely inhibited (100%) by 250  $\mu\text{g/mL}$  of chloroform extract. The results presented expressive biological activity of antagonism, higher than the chemical treatment, which encourage future research for isolation and characterization of the active compounds presented in these extracts.

**KEYWORDS:** biological control, phytopathogenic fungus, metabolites, antagonistic activity.

## INTRODUÇÃO

Estima-se que as infecções fúngicas na agricultura já provocam a perda de 125 milhões de toneladas nas culturas de arroz, trigo, milho, batata e soja. Somente no caso das três primeiras, os prejuízos anuais são da ordem de US\$ 60 bilhões (FREIRE, 2015). Entre os fungos fitopatogênicos, *Botryosphaeria rhodina* é o responsável por causar resinoses em partes lenhosas de plantas, juntamente com transporte de toxinas e perecimento da planta (ÚRBEZ-TORRES, 1979). O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é agente causal do mofo branco em diversos vegetais como feijão, batata, repolho entre outros (PURDY, 1979), enquanto *Fusarium oxysporum* ocasiona apodrecimento das raízes de tomateiros (JARVIS, 1989) e de culturas de batatas (MEJDOUB-TREBELSI et al., 2017).

O combate das pragas agrícolas é essencial à boa produtividade nas plantações, alavancando o uso desenfreado de inúmeras substâncias químicas tóxicas ao homem e aos animais. Do ponto de vista ambiental, os agroquímicos acarretam na diminuição do potencial de controle efetuado por predadores, parasitoides e patógenos, agentes naturais na supressão dos organismos indesejados (LOUREIRO, 2002). Além disso, a utilização indiscriminada desses compostos não satisfaz às exigências do mercado cada vez mais exigente, que prioriza a qualidade dos produtos em seus aspectos mercadológicos, ecológicos e sociais (GASSEN, 2006).

Uma alternativa importante ao uso dos pesticidas químicos é o controle biológico,

que se refere a qualquer atividade de uma espécie com capacidade de inibir o efeito negativo de outra; assim, a população das pragas agrícolas pode ser reduzida, evitando maiores prejuízos econômicos (ALSTON, 2011). O controle biológico utilizando-se de fungos é uma área de pesquisa com rápido desenvolvimento. Além da utilização de organismos vivos presentes no ambiente como inibidores das pragas, existe grande interesse em se explorar as substâncias que tais organismos produzem (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001). Estas substâncias são conhecidas como produtos naturais oriundas do metabolismo secundário (BRÁZ-FILHO, 2012).

Os fungos do gênero *Penicillium* são comumente estudados quanto à sua atividade antibiótica, desde a descoberta da penicilina. Metabólitos secundários como os policetídeos (Figura 1) foram relatados a esse gênero, apresentando bioatividade contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (PASTRE et. al., 2007, KHAMTHONG et al., 2012, MARINHO et al., 2013), além dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp (MEJDOUB-TREBELSI et al., 2017).

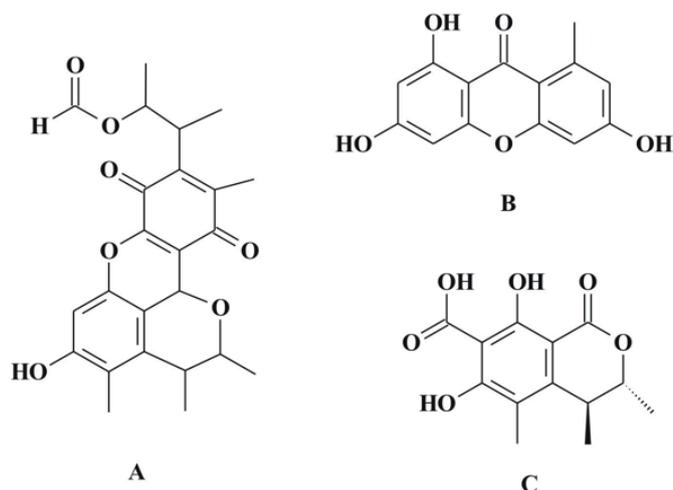


Figura 1: Policetídeos produzidos por fungo *Penicillium* com atividade antibiótica: A) citrinina, B) diidroxitrinona e C) fusaridina.

Fonte: PASTRE et. al., 2007.

Assim, a busca por alternativas ao controle utilizando agroquímicos, que oferecem grandes riscos aos seres humanos e ao meio ambiente, incentivou este trabalho, cujo objetivo foi avaliar o potencial de controle dos fungos fitopatogênicos *B. rhodina*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* por extratos orgânicos do isolado fúngico JUANT028 (possível gênero *Penicillium*), isolado da lagarta *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Isolamento dos fungos

Os fungos cuja atividade antagônica foi avaliada foram isolados de insetos coletados em uma plantação de soja no município de Londrina (PR), coordenadas: 23°18'5"S e 51°6'21"O, por meio da técnica de câmara úmida (referência livro). Estes microrganismos compõem a Rede Sisbiota (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade) da CNPq. O isolado fúngico JUANT028 foi isolado da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).

Quanto aos fungos fitopatogênicos, *B. rhodina* foi cedido gentilmente pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aneli de Melo Barbosa Dekker (Universidade Estadual de Londrina), *S. sclerotiorum* pelo Prof. Dr. Ciro H. Sumida (Universidade Estadual de Londrina) e *F. oxysporum* pela Dr.<sup>a</sup> Solange Monteiro de Toledo Piza Gomes Carneiro (Instituto Agrônomo do Paraná)

### Seleção dos isolados fúngicos

Os quatro isolados fúngicos (JUANT029, JULAGL004, JUANT079, JUANT028) pertencentes à micoteca do grupo QuiMiBio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina foram selecionados e cultivados assepticamente separadamente em frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido (30g dextrose, 5g bactopectona, 3g extrato de levedura, 0,3g MgSO<sub>4</sub>, 0,3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para um litro de água destilada), sendo que para cada fungo foi preparado 1 L de meio. Os frascos inoculados, com 5 discos de 1 cm contendo micélio fúngico, foram incubados em mesa agitadora 180 rpm, 28°C e durante um período de 20 dias, assim como 250 mL do controle (meio líquido sem inoculação por fungo). Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados. Os filtrados foram tratados com acetato de etila (1:1) por partição líquido-líquido, enquanto que as respectivas biomassas miceliais foram tratadas com metanol.

Os extratos tratados com acetato de etila e metanólicos dessas quatro cepas foram utilizados em testes antifúngicos contra *Botryosphaeria rhodina*, na concentração de 6,4 mg/placa, em duplicata. As determinações dos diâmetros dos halos de crescimento dos respectivos fungos foram acompanhadas diariamente, e no terceiro dia, quando as placas controle foram completamente colonizadas, após a inoculação, foram medidos os respectivos diâmetros do crescimento do *B. rhodina*, para calcular o potencial de inibição, conforme a equação descrita por Wang e colaboradores (2012): Taxa de inibição = 1 - (diâmetro do controle / diâmetro do tratamento) \* 100%. A cepa cujo extrato apresentou maior taxa de inibição foi utilizada nas etapas seguintes.

### Cultivo em meio líquido, em maior escala, do isolado JUANT028

A cepa selecionada, JUANT028 foi cultivada no meio líquido citado anteriormente

(6 litros) em mesa agitadora 180 rpm, bem como em 25 frascos contendo meio sólido de arroz (90g de arroz parboilizado com 75mL de água destilada por frasco de 500 mL) (WANG et al., 2012). Discos de meio sólido de BDA colonizados por micélios do fungo (de 7 dias) foram inoculados em frascos de Erlenmeyer e estes foram mantidos estáticos, no escuro, por volta de 28°C, durante 20 dias. Dois frascos foram preparados como controle.

### Preparação dos extratos do isolado JUANT028

Após o período de incubação, o meio líquido foi filtrado e os micélios foram extraídos com metanol enquanto o sobrenadante por partição líquido-líquido com acetato de etila (1:1). Os cultivos em meio de arroz foram macerados, e os metabólitos extraídos duas vezes com clorofórmio (200 mL), seguido de seis extrações consecutivas com acetato de etila (200 mL) e por último uma extração com metanol, conforme mostra a Figura 2.

O extrato seco foi separado para utilização em testes de inibição em placa, sendo que o cultivo do isolado JUANT028 em meio líquido resultou em 0,56g de extrato de acetato de etila e 20,7g de extrato metanólico. O cultivo em meio de arroz de arroz resultou em 31,8 g de extrato de clorofórmio, 19,97 g de extrato de acetato de etila e 387,97 g de extrato metanólico (massa seca).

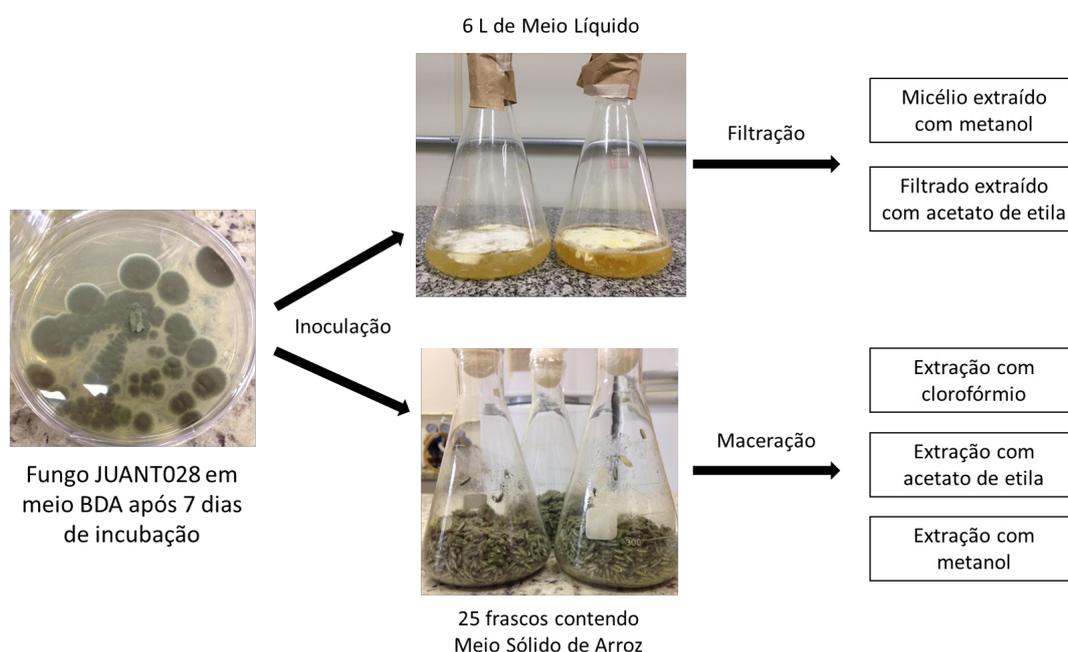


Figura 2: Procedimento experimental de cultivo do fungo JUANT028 e extração dos metabólitos produzidos.

Fonte: autoria própria

### Teste da atividade antagônica do extrato do JUANT028 contra fungos fitopatogênicos em placas de Petri

A ação antifúngica dos diferentes extratos de JUANT028 foi avaliada por testes

em quintuplicata, nas concentrações 50, 150, 250 e 350 µg/placa, meio BDA (batata, dextrose e ágar) contra os fungos fitopatogênicos *Botryosphaeria rhodina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. O fitopatógeno foi inoculado no centro das placas e estas foram incubadas em BOD, no escuro, por volta de 28°C. Paralelamente, foram preparadas placas contendo o fungicida Fluazinam 0,01 ppm e placas sem a presença do extrato (controle). As medidas finais para o cálculo de inibição foram de 3, 14 e 7 dias, para *B. rhodina*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* respectivamente, e a taxa foi calculada pela Equação anteriormente descrita de Wang e colaboradores (2012).

A concentração utilizada do fungicida Fluazinam neste trabalho foi de 0,01 ppm, pois Sumida et al. (2014) relatou que o fitopatógeno *S. sclerotiorum* sofreu 100% de inibição em 0,5 ppm, logo, a concentração foi reduzida para que os resultados pudessem ser comparados com a inibição dos extratos.

### Teste da atividade antibiótica do extrato do JUANT028 em placas de Petri

A atividade antagonica dos extratos foi avaliada para as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os microrganismos foram inoculados em uma solução 0,85% de NaCl até atingir uma turvação equivalente à 0,5 Farland, esta solução apresenta turbidez próxima a uma densidade bacteriana de 108 UFC (unidades formadoras de colônias).

Foram semeados 50 µL dos inóculos microbianos na superfície das placas de petri contendo 20 ml de Ágar Mueller Hinton (38g L<sup>-1</sup>). Posteriormente, fez-se furos no meio sólido (poços), que foram preenchidos com 50 µL de solução de extrato nas concentrações de 5, 6 e 7 mg/mL, baseado na metodologia descrita por Bell e Grundy (1968).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção dos extratos fúngicos com atividade inibitória

No processo de seleção dos extratos fungicos o extrato do isolado JUANT028 foi o que mostrou maior capacidade de inibição, obtido com o acetato de etila (Tabela 1), portanto este foi o isolado selecionado para o cultivo em maior escala, tanto em meio líquido quanto em meio sólido de arroz.

Extratos	Taxa de Inibição (%) de <i>B. rhodina</i> pelos isolados fúngicos			
	JUANT029	JULAGL004	JUANT079	JUANT028
Acetato de Etila	40,4	0	37,8	45,3
Metanólico	12,2	1,7	20,6	10,3

Tabela 1: Comparação da taxa de inibição do fitopatógeno *B. rhodina* pelos extratos em acetato de etila e metanol obtidos dos isolados fúngicos JUANT029, JULAGL004, JUANT079 e JUANT028.

## Teste em placa para avaliar a atividade antagônica do extrato do isolado

### JUANT028 contra fungos fitopatogênicos

Os resultados apontaram que o fitopatógeno *B. rhodina* sofreu maior inibição com o extrato de acetato de etila, obtido do meio sólido de arroz (MS-A), sendo que as concentrações de 250 e 350  $\mu\text{g/mL}$  resultaram em 68,1 e 69,3 % de inibição, respectivamente.

Destaca-se que o extrato ML-A conseguiu maior inibição que o fungicida, a partir da concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$ . Entre todos os extratos testados para este fitopatógeno, o único que não obteve maior inibição superior ao fungicida foi o Metanol - Meio Sólido de Arroz (MS-M).

Extratos	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>B. rhodina</i>		<i>F. oxysporum</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
		Diâmetro do halo (cm)	Inibição (%)	Diâmetro do halo (cm)	Inibição (%)	Diâmetro do halo (cm)	Inibição (%)
Acetato de etila - Meio Líquido (ML-A)	50	7,8	8,5	7,7	0	3,8	40,8
	150	7,2	16,0	6,6	15,5	3,4	49,8
	250	6,5	25,9	6,0	24,9	3,4	51,0
	350	6,3	29,0	5,9	25,3	2,6	66,3
Metanol (micélio) -Meio Líquido (ML-M)	50	8,0	5,5	8,4	0	5,9	0
	150	7,7	9,3	5,8	27,0	5,2	11,9
	250	7,1	17,9	5,6	30,0	4,9	19,6
	350	6,4	27,6	5,5	32,3	4,6	25,8
Clorofórmio - Meio Sólido (MS-C)	50	6,9	20,3	3,3	64,8	2,1	77,9
	150	5,9	33,4	3,0	70,5	1,5	90,2
	250	5,2	42,9	2,0	84,9	1,0	100
	350	3,9	60,7	1,9	86,9	1,0	100
Acetato de etila Meio Sólido (MS-A)	50	6,0	32,9	7,3	4,6	5,6	4,8
	150	5,6	38,0	6,7	14,6	4,3	30,6
	250	3,4	68,1	5,6	31,2	2,9	59,6
	350	3,3	69,3	5,0	39,5	2,6	67,7
Metanol - Meio Sólido de Arroz (MS-M)	50	9,0	0	8,1	0	4,3	31,3
	150	9,0	0	7,3	5,1	3,6	46,7
	250	9,0	0	7,3	4,5	2,4	71,9
	350	9,0	0	6,4	18,7	2,1	78,1
Fungicida	5ppm	6,6	24,0	7,5	2,5	2,8	62,9

Tabela 2: Diâmetro do halo de crescimento e taxa de inibição dos fitopatógenos *B. rhodina*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum* pelos extratos produzidos pelo isolado JUANT028

O fitopatógeno *F. oxysporum* foi mais inibido pelo extrato MS-C, enquanto os extratos ML-A e MS-M apresentaram os menores resultados, quando comparadas as concentrações de 350  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, é importante destacar que todos os extratos apresentaram atividade antagônica superior à do fungicida, a partir da concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$ .

Os autores Sharifi e Ramezani (2003) utilizaram os metabólitos produzidos por

bactérias *Bacillus* spp e obtiveram inibição de até 56% do *F. oxysporum*. Carvalho e colaboradores (2014) relataram inibições de 23 até 40% do crescimento de uma cepa do fitopatógeno em questão frente a metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelo fungo *Trichoderma harzanium*.

Para o fungo *S. sclerotiorum*, observou-se que o extrato MS-C apresentou maior inibição, impedindo que o este fitopatógeno crescesse a partir da concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ .

O estudo realizado por Cavalcanti (2018) também apresentou expressiva inibição desse fitopatógeno a partir de extratos das bactérias *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus macauenses* e da levedura *Candida labiduridarum*, da ordem de 74,61 a 87,61%. Os autores Abdullah, Ali e Suleman relatam inibição de até 55% no crescimento de *S. sclerotiorum* pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*

O cultivo em meio de arroz induziu maior produção dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade antagônica. Com exceção do extrato ML-A, todos os outros apresentaram efeito antagônico superior ao do fungicida na concentração de 350  $\mu\text{g/mL}$ .

O extrato do isolado JUANT028 não apresentou atividade antibiótica contra as bactérias as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* avaliados.

## CONCLUSÃO

Os extratos produzidos pelo isolado fúngico JUANT028 mostraram importante atividade biológica na inibição de três fungos fitopatogênicos. O parasita *B. rhodina* sofreu inibição 68,1 e 69,3 % com o extrato de acetato de etila do cultivo em meio de arroz, nas concentrações de 250 e 350  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. *F. oxysporum* foi inibido em 86,9% e *S. sclerotiorum* em 100% a partir do extrato obtido em meio de arroz, nas concentrações 350 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Portanto, vê-se um grande interesse na identificação dos metabólitos produzidos e seu potencial uso no controle de pragas agrícolas.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzanium* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354-1359, 2008.

ALSTON, D.G. **General Concepts of Biological Control. Utah Pests fact sheet.** Utah State University, 2011. Disponível em:

<<https://extension.usu.edu/files/publications/publication/gen-biocontrol96.pdf>> Acesso em 15 ago. 2018.

BRÁZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldade e perspectivas. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

- BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. CABI, 390p., 2001.
- CARVALHO, D.D.C. et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.5, p. 384-391, 2014.
- CAVALCANTI, V. P. **Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by yeast and *Bacillus* spp. in *Allium sativum* L. and its effect on the bioactive compounds content and antioxidant activity**. 2018. 107 p. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- FREIRE, F.C.O. A introdução de fitopatógenos e doenças emergentes na agricultura cearense. **Essentia**, v. 16, n. 2, p. 22-39, 2015.
- GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o *Psilídeo* da goiabeira *Triozoida* sp. (Hemiptera: Psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico**. 2006. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulísisy “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus de Botucatu.
- JARVIS, W.R. *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. **Phytoprotection**, v. 69, p. 49-64, 1989.
- KHAMTHONG, N. et al. Bioactive polyketides from sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8245-8250, 2012.
- LOUREIRO, E.S. et al. Efeito de Produtos Fitossanitários Químicos Utilizados em Alface e Crisântemo Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 263-269, 2002.
- MARINHO, A.M.R. et al. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 909-9012, 2013.
- MEJDOUB-TREBELSI, B. et al. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites from *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. Naturally Associated to Potato against *Fusarium* species Causing Tuber Dry Rot. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 9, n. 4, p. 181-190, 2017.
- PASTRE, R. et al. Diversidade de Policetídios produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **The American Phytopathological Society**, v. 69, p. 875-880, 1979.
- SHARIFI, T.A.; RAMEZANI, M. Biological control of *Fusarium oxysporum*, the causal agent of onion wilt by antagonistic bacteria. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 68, p. 543-547, 2003.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R. et al. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, v. 90, n. 12, p.1490-1503, 2006.
- WANG, H. et al. Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. **PLoS ONE**, v. 7, 7 p., 2012.

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATO VEGETAL DE *Cymbopogon winterianus* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE AVE

### **Gabrielly Cristina Galvão**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Dois Vizinhos – Paraná

### **Juliana Marcelli Hofma Lopes**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Dois Vizinhos – Paraná

### **Letícia Mencatto Bueno**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Dois Vizinhos – Paraná

### **Patricia Franchi de Freitas**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Dois Vizinhos – Paraná

**RESUMO:** A presente pesquisa tem o objetivo de investigar o efeito do extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus* (citronela) sobre o desenvolvimento embrionário de ave (*Gallus gallus*), para avaliar o risco de exposição na fase inicial do desenvolvimento. Quarenta ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram igualmente divididos em um grupo controle - CF: ovos não injetados, e três grupos tratados - ovos injetados na câmara de ar com 100µl de solução de extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus* (EVC) em soro fisiológico em três concentrações diferentes: EVC 2,5%, EVC

5%, e EVC 10%. Após as injeções, os ovos foram incubados por três dias e então abertos. Quando continha embrião, este foi observado para verificar se estava vivo (batimentos cardíacos), e contabilizado para a análise de mortalidade. Em seguida, os embriões vivos foram eutanaziados, coletados e preparados através da técnica de montagem total em lâmina histológica para a análise morfológica. Essa análise, juntamente com a tomada fotográfica, foi realizada sob estereomicroscópio. Dos quarenta ovos incubados, vinte continham embriões, destes, 20 estavam vivos no momento da abertura do ovo, sendo seis do grupo CF, sete do grupo EVC 2,5%, dois do grupo EVC 5% e cinco do grupo EVC 10%. Foram observadas malformações apenas em três embriões dos grupos tratados com o EVC, sendo um embrião malformado para cada uma das concentrações de EVC. Apesar de constituírem resultados preliminares, pois o projeto possui etapas ainda não realizadas, os dados obtidos até o presente momento indicam que o EVC apresenta efeito teratogênico para embriões de ave.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cymbopogon winterianus*, extrato vegetal, embrião de ave

**ABSTRACT:** The objective of the research is investigating the effects of plant extract of *Cymbopogon winterianus* (citronella) on the embryonic development of fowl (*Gallus gallus*),

to evaluate the risk of exposure in the early stages of development. Forty fertilized eggs of *Gallus gallus* were equally divided into a control group - CF: uninjected eggs, and three treated groups - eggs injected into the air chamber with 100 µl of solution of *Cymbopogon winterianus* plant extract (EVC) in saline solution in three different concentrations: EVC 2.5%, EVC 5%, and EVC 10%. After the injections, the eggs were incubated for three days and then opened. When there was embryo, this was observed to verify if it was alive (heart beats), and accounted for the analysis of mortality. Afterwards, live embryos were euthanized, collected and prepared using the technique of total histological slide assembly for morphological analysis. This analysis, together with the photographic acquisition, was performed under stereomicroscope. Of the forty eggs incubated, twenty contained embryos, of these 20 were alive at the time of egg opening, being six of the CF group, seven of the EVC group 2.5%, two of the EVC group 5% and five of the EVC group 10%. Malformations were observed only in three embryos of the groups treated with the EVC, being a malformed embryo for each of the concentrations of EVC. Although preliminary results are obtained, since the project has stages not yet performed, the data obtained until the present moment indicate that the EVC has a teratogenic effect for avian embryos.

**KEYWORDS:** *Cymbopogon winterianus*, plant extract, avian embryo

## 1 | INTRODUÇÃO

A intensa utilização dos produtos fitossanitários sintéticos tem causado a seleção de populações de pragas resistentes, eliminação de inimigos naturais, contaminação de alimentos, do solo e da água, além de intoxicação direta do homem (GALLO et al., 2002; GLIESSMAN, 2005). É cada vez mais frequente a procura por alimentos mais “limpos” e saudáveis, de forma que os sistemas alternativos de produção ganham cada vez mais espaço no cenário agrícola nacional, inclusive como parte integrante de políticas governamentais.

Na embriotoxicologia, a utilização do embrião de ave tem sido fortemente ampliada, pois seu desenvolvimento externo evita que determinadas análises, como a exposição a contaminantes, possam sofrer alterações devido à interação embrião/progenitor (MATTSON et al., 2015). Além disso, alguns aspectos favorecem o uso dos embriões de aves como modelo de estudo em toxicologia: (1) os ovos são do tipo megalécito (dispondo de reservas nutricionais e não dependendo do ambiente externo ou organismo materno para o desenvolvimento ocorrer); (2) apresentam membranas envoltórias resistentes; (3) o tempo total de desenvolvimento é curto (21 dias); (4) os embriões desenvolvem-se na ausência do organismo materno e na região superior do ovo permitindo que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado diariamente em laboratório (SCHOENWOLF, 1999) e, (5) seu desenvolvimento é muito bem documentado (HAMBURGER e HAMILTON, 1951).

O presente trabalho utilizou o embrião de galinha (*Gallus gallus*) como modelo para avaliar os efeitos tóxicos do extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus* utilizado

como insumo agrícola sobre o desenvolvimento embrionário. Foram analisadas a taxa de mortalidade e de anormalidades, e as malformações anatômicas encontradas.

## 2 | MÉTODOS

Quarenta ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram utilizados para a realização do experimento. Estes foram igualmente divididos em um grupo controle (CF) - ovos não injetados, e três grupos tratados - ovos injetados na câmara de ar com 100µl de solução de extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus* (EVC) em soro fisiológico em três concentrações diferentes: EVC a 2,5%, EVC a 5% e EVC a 10%. Após as injeções, os ovos foram incubados por 3 dias (em incubadora Chocmaster Juli 70) e então abertos.

Quando continha embrião, este foi observado para verificar se estava vivo (batimentos cardíacos), e contabilizado para a análise de mortalidade. Em seguida, os embriões vivos foram eutanaziados, coletados e preparados através da técnica de montagem total em lâmina histológica para a análise morfológica segundo Hamburger e Hamilton (1951). Essa análise, juntamente com a tomada fotográfica, foi realizada sob estereomicroscópio (Medlux).

## 3 | RESULTADOS

Foram incubados por três dias 40 ovos, sendo 10 ovos para cada um dos grupos experimentais (CF, EVC 2,5%, EVC 5%, e EVC 10%). No momento da coleta, foi realizada a análise da mortalidade através da visualização da presença de embrião e de batimentos cardíacos. Os dados desta análise estão expressos na Tabela 1 a seguir.

SITUAÇÃO	CF	EVC 2,5%	EVC 5%	EVC 10%
Incubados	10	10	10	10
Vivos	6	7	2	5
Mortos	4	3	2	5
Não desenvolvidos	-	-	6	-

Tabela 1 - Mortalidade

Fonte: A autoria própria (2017).

Os vinte embriões que estavam vivos foram coletados e preparados pela técnica de montagem total. Os embriões obtidos por essa técnica foram analisados morfológicamente e tiveram seus estágios determinados em estereomicroscópio (Medlux), levando em consideração alguns aspectos de desenvolvimento, como o tamanho e forma dos brotos dos membros, curvatura do corpo e tamanho e forma das vesículas encefálicas, conforme descrito por Hamburger & Hamilton (1951).

Foram encontrados seis embriões no estágio 17 e cinco no estágio 18. Dois embriões apresentavam características compartilhadas entre dois estágios sucessivos: 16/17 e 17/18. (Tabela 2)

ESTÁGIO	CF	EVC 2,5%	EVC 5%	EVC 10%
16/17	-	1	-	-
17	1	2	2	1
17/18	-	1	-	-
18	2	-	-	3
Indeterminados*	3	3	-	1

Tabela 2 – Estágios de Desenvolvimento

Fonte: Autoria própria (2017).

\* Não foi possível a determinação dos estágios devido às malformações ou à perda do embrião no momento da montagem.

Dentre os vinte embriões analisados, três apresentaram malformações (MF), sendo um embrião para cada grupo experimental injetado com EVC (Tabela 3).

GRUPOS	Malformados	Estágio
CF	-	-
EVC 2,5%	1	Indeterminado
EVC 5%	1	17
EVC 10%	1	18

Tabela 3 - Malformações

Fonte: Autoria própria (2017).

No grupo CF não foi encontrado embrião com malformação (Figura 1a). O embrião que recebeu o EVC 2,5% apresentou agenesia caudal e de brotos de membros e região cefálica totalmente alterada. (Figura 1b). Na concentração EVC 5% o embrião apresentou falha no fechamento do tubo neural na região cefálica (Figura 1c). A malformação encontrada no embrião injetado com EVC 10% foi o encurtamento na região facial e o tubo neural na região do romboencéfalo aberto. (Figura 1d).

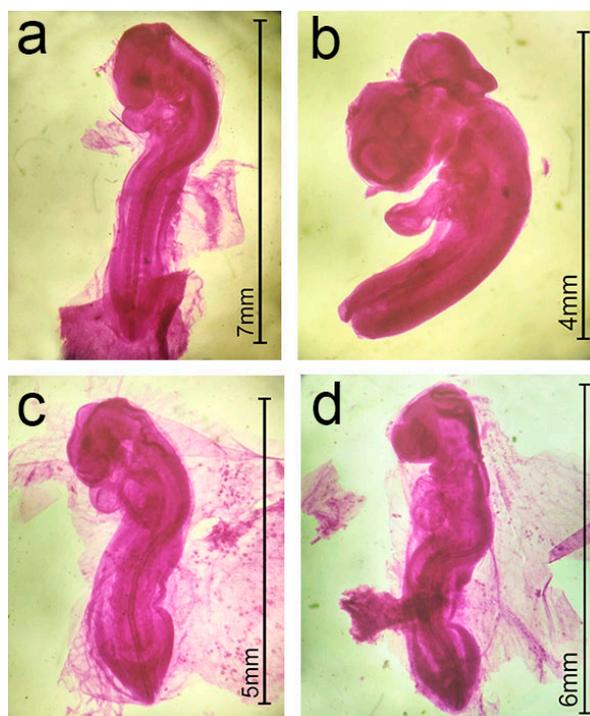


Figura 1 - Embriões de ave (*Gallus gallus*) de três dias preparados por montagem total. a) Embrião do grupo controle fechado: não apresentou malformação. b) Embrião do grupo EVC 2,5%: apresentou malformação nas vesículas encefálicas e agenesia caudal e de brotos de membros. c) Embrião do grupo EVC 5%: apresentou falha no fechamento do tubo neural e, conseqüentemente, na segmentação das vesículas encefálicas. d) Embrião do grupo EVC 10%: apresentou atrofia da região facial e falha no fechamento do tubo neural na região do romboencéfalo.

Fonte: Autorial Própria (2017).

## 4 | DISCUSSÃO

Até o momento não existe embasamento teórico em relação aos efeitos do extrato vegetal de citronela (EVC) no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*, portanto, há indícios de possíveis alterações no desenvolvimento dos embriões de ave, com base nos resultados já obtidos.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de constituírem resultados parciais e preliminares, pois o projeto possui etapas ainda não realizadas, os dados obtidos até o presente momento indicam que o EVC apresenta efeito teratogênico para embriões de ave.

## REFERÊNCIAS

BOSVELD, A.T.C. Species differences for in vitro cytochrome P450 1A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and various polychlorinated biphenyls in hepatocytes from the common tern, the black-headed gull, the herring gull, and the chicken. In: **Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on piscivorous avian wildlife** (thesis), University Utrecht, the Netherlands, 1995.

ENGWALL, M.; BRUNSTRÖM, B.; JAKOBSSON, E. Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)-inducing potency and lethality of chlorinated naphthalenes in chicken (*Gallus domesticus*) and eider duck (*Somateria mollissima*) embryos. **Archives of Toxicology** 68 37-42, 1994.

FARHAT, A. et al. In Ovo effects of two organophosphate flame retardants -TCPP and TDCPP- on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos. **Toxicological sciences**, v. 134, n. 1, p. 92–102, 2013.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, C.G.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, v.10. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, 88: 49-92, 1951.

MATTSSON, A. et al. Metabolic Profiling of Chicken Embryos Exposed to Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Agonists to Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0143780 1-20, 2015.

SANDERSON, J.T.; BELLWARD, G.D. Hepatic microsomal ethoxyresorufin-O-deethylase-inducing potency in ovo and cytosolic Ah receptor binding affinity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: comparison of four avian species. **Toxicology and Applied Pharmacology** 132 131-145, 1995.

SCHOENWOLF, G. C. **The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology**. In: MOODY, S. A. Cell lineage and fate determination. San Diego: Academic Press, 644p, 1999.

SHARP, A. A.; FEDOROVICH, Y. Teratogenic effects of pyridoxine on the spinal cord and dorsal root ganglia of embryonic chickens. **Neuroscience**, v. 289, n. 4, p. 233–241, 2015.

## EXTRATO DE *Fusarium graminearum* É UMA ALTERNATIVA NÃO TÓXICA PARA USO COMO CORANTE NATURAL: OBTENÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

### **Brenda Kischkel**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia  
Maringá-PR

### **Beatriz Paes Silva**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica  
Maringá-PR

### **Fabiana Gomes da Silva Dantas**

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Dourados-MS

### **Kelly Mari Pires de Oliveira**

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Dourados-MS

### **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina  
Maringá-PR

### **Melyssa Negri**

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina  
Maringá-PR

**RESUMO:** A obtenção de corantes naturais de fungos apresenta algumas vantagens como ser de fonte renovável, de baixo impacto ambiental e alta capacidade de biodegradação, sendo mais harmônica com meio ambiente e menos

nociva à saúde do que os corantes sintéticos. Os pigmentos naturais têm ampla aplicação e podem ser utilizados nas indústrias têxtil, farmacêutica e alimentícia. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um bioprocessamento simples para a produção e extração de pigmentos de *Fusarium graminearum*, bem como avaliação de possíveis atividades biológicas do extrato. Para otimizar a produção de pigmento pelo fungo, este foi exposto a fermentação submersa e semi-sólida, variando a composição do meio, temperatura e pH. Além disso, o extrato de pigmentos foi exposto a diferentes condições físico-químicas e parâmetros de tingimento para avaliação de sua estabilidade. A confiabilidade do extrato foi determinada através de metodologias para avaliação de atividade antibacteriana, citotoxicidade e mutagenicidade. A produção de pigmentos pelo fungo apresentou potencial em meio PDA semissólido, pH 6, incubado a 27 °C na ausência de luz. Os pigmentos obtidos foram estáveis aos parâmetros testados: temperatura, pH, vapor quente e condições de tingimento. O extrato demonstrou baixa citotoxicidade, efeito antibacteriano e não apresentou potencial mutagênico. Esses resultados são animadores, pois atestam a confiabilidade do extrato para uso industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fermentação semissólida, Pigmentos, Fungos, Bioprocessamento, Citotoxicidade.

**ABSTRACT:** The obtaining natural dyes from fungi present some advantages as a replaceable source, low environmental impact and high capacity for biodegradation, being more harmonic with environment and less harmful to health than synthetic dyes. The natural pigments have wide application and can be used in the textile, pharmaceutical and food industries. This study aimed to develop a simple bioprocess for the production and extraction of pigments from *Fusarium graminearum*, as well as evaluation of possible biological activities of the extract. To optimize pigment production by the fungus, it was exposed to submerged and semi-solid fermentation, varying the composition of the medium, temperature and pH. In addition, the pigment extract was exposed to different physicochemical conditions and dyeing parameters to evaluate its stability. The reliability of the extract was determined through methodologies for evaluation of antimicrobial activity, cytotoxicity and mutagenicity. The production of pigments by the fungus presented potential in a semi-solid PDA medium, pH 6, incubated at 27 ° C in the absence of light. The pigments obtained was stable to the parameters tested as temperature, pH, hot steam and dyeing conditions. The extract showed low cytotoxicity, antibacterial effect and did not present mutagenic potential. These results are encouraging since they attest to the reliability of the extract for industrial use.

**KEYWORDS:** Semi-solid Fermentation, Pigments, Fungi, Bioprocess, Cytotoxicity.

## 1 | INTRODUÇÃO

Durante muito tempo a industrialização foi imprescindível na sociedade e trouxe consigo a deposição de materiais, produtos e substâncias potencialmente tóxicos ao meio ambiente, como os resíduos de processos industriais (ZAGATTO, 2008). Entre essas substâncias encontram-se os corantes sintéticos utilizados em diversos processos, como a coloração de tecidos, alimentos e cosméticos (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016). Anualmente, são produzidas 700 mil toneladas de corantes e estima-se que 50% dos corantes utilizados pela indústria têxtil estejam depositados em efluentes, que se não tratados corretamente, podem prejudicar e modificar o efluente (RANI *et al.*, 2014). A presença destes compostos interfere na absorção de luz e oxigênio pelas plantas e animais aquáticos (TEIXEIRA *et al.*, 2014) alterando o ecossistema circundante e interferindo na saúde da população, uma vez que possui efeitos tóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (SURYAVATHI *et al.*, 2005; BABHITA, SOCCOL & PANDEY, 2007; KUMAR *et al.*, 2017). Assim, a produção de materiais que podem afetar diretamente a saúde da população, como a coloração de alimentos e tingimento de roupas, especialmente roupas infantis, apresentam a necessidade de utilização de corantes ecológicos, não-tóxicos (SIVAKUMAR *et al.*, 2009).

Um conceito que atrai interesse na pesquisa é a biorrefinaria, que se trata da conversão de substratos em produtos de valor agregado (BABHITA, SOCCOL & PANDEY, 2007). Os produtos oriundos de fontes renováveis e sustentáveis vêm ganhando destaque devido aos benefícios que trazem à saúde e ao meio ambiente,

como corantes naturais que podem ser obtidos através de plantas, insetos, minerais e micro-organismos (SHARID, UL-ISLAM & MOHAMMAD, 2013). O crescente interesse, por fontes alternativas, para a produção de pigmentos tem incentivado a investigação de fungos filamentosos como potenciais produtores (BLUMENTHAL, 2004), uma vez que os pigmentos obtidos podem apresentar atividade biológica adicional, como propriedades anticancerígenas (TORRES et al., 2016).

Os fungos filamentosos além de desempenharem papéis importantes na natureza, produzem uma ampla gama de substâncias metabolicamente ativas (SUN et al., 2011) que são amplamente exploradas industrialmente como fornecedores de ácido cítrico, glucônico e itacônico, além de enzimas, antibióticos e pigmentos (FERREIRA et al., 2016). Fungos ascomicetos como *Monascus*, *Penicillium*, *Neurospora* e *Fusarium* já foram importantes fontes de pigmentos (FERREIRA et al., 2016), sendo estes últimos, produtores eficientes devido à presença de pigmentos de antraquinona, um grupo de policetídeos aromáticos que são produzidos como metabólitos secundários pelos fungos e responsáveis pelo fenômeno da cor (VELMURUGAN et al., 2010a; DUVAL et al., 2016).

A principal fonte de pigmentos naturais atualmente são as plantas, mas seu uso tende a ser limitado (VELMURUGAN et al., 2010b) e ter algumas desvantagens como quantidade disponível, questões ecológicas, uso do solo e trabalho intenso (SANCHEZ, RUTZ & RODRÍGUEZ-SANOJA, 2013). Em contrapartida, a obtenção de pigmentos de fungos apresenta vantagens como ser de fonte renovável, baixo impacto ambiental e alta capacidade de biodegradação, muito mais harmônica com o meio ambiente (MIRJALILI, NAZARPOOR & KARIMI, 2011). Em 2010, 40% dos corantes disponíveis no mercado eram sintéticos, enquanto o restante representava corantes naturais ou corantes idênticos aos encontrados na natureza. Desta forma, entende-se que a fermentação de micro-organismos como os fungos, são uma fonte muito próspera de pigmentos naturais, segundo Pagano e Dhar (2015), os corantes naturais, devem substituir os corantes sintéticos no futuro.

Levando isso em consideração, este estudo teve como proposta padronizar uma metodologia com melhor qualidade de pigmento natural sintetizado por *Fusarium graminearum*, avaliando os pigmentos obtidos quanto a estabilidade aos parâmetros de produção, possibilidade de apresentar atividade antimicrobiana, efeitos citotóxicos e genotóxicos.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo

*Fusarium graminearum* foi isolado do campo de trigo da Cooperativa Central de Pesquisa Agropecuária (CODETEC) de Palotina - Brasil. A cepa foi gentilmente

cedida pela professora Marialba A. Alves Castro Prado do Departamento de Ciências Biológicas da UEM e atualmente está armazenada no laboratório de Micologia Médica da UEM.

## 2.2 Meio de cultura e condições iniciais para a produção de pigmentos

O fungo foi cultivado em dois meios de cultura: submerso (sais-glicose) e semissólido de batata (PDA semissólido). O meio de sais-glicose foi preparado contendo por litro de água deionizada 20 g de glucose; 848 mg  $\text{NaNO}_3$ ; 165 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 300 mg KCl; 0,4 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 100 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 40 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 5,7 mg  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ; 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 3,1 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 4,4 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O segundo meio foi o PDA semissólido, contendo 50 g de batata por litro de água deionizada; 7,0 g de dextrose (D-glicose anidra; Synth; São Paulo, Brasil) e 1,8 g de ágar bacteriano (Kasvi; Itália) em erlenmeyer. Ambos os meios foram inoculados com pedaços do micélio (aproximadamente 12 mm de diâmetro) da cultura de *F. graminearum* recém crescidos em ágar batata e incubados a 28°C em condições estacionárias e ausência de luz por 4-6 semanas.

## 2.3 Avaliação do pH e temperatura ideais para a melhor produção de pigmentos

Após o período inicial de incubação, os meios que propiciaram a coloração foram selecionados para as etapas subsequentes. A avaliação do pH foi realizada no meio selecionado, em frascos diferentes, e em duplicata para cada faixa de pH (2, 3, 4, 5, 6 e 7). O efeito da temperatura foi avaliado no mesmo meio, com o pH que forneceu pigmentos mais fortemente expressos em experimentos anteriores, sendo avaliada a temperatura a 20 e 27°C (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; NAGIA, ELMOUHAMED, 2007). Todas as condições de cultura foram incubadas durante 4-6 semanas na ausência de luz.

## 2.4 Extração do pigmento fúngico e obtenção de biomassa

Posteriormente, os pigmentos foram extraídos de todas as culturas testadas, bem como a retenção da biomassa constituída pelo fungo. O micélio foi separado por filtração em gaze estéril. Em seguida, uma solução a 95% (v/v) de etanol (Synth; São Paulo, Brasil) foi adicionada ao filtrado. A mistura foi incubada em agitador (Nova Ética, 430 - RDBP, Brasil) a 180 rpm a 30 °C por 30 min, centrifugada a 4000 rpm por 10 min, então o sobrenadante foi recuperado e filtrado em filtro Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ . O extrato livre de células foi analisado em espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis - Quimis®; São Paulo, Brasil) a 530, pois representa a absorção máxima de pigmentos vermelhos. O micélio foi incubado em estufa para secagem e obtenção do peso seco.

## 2.5 Estabilidade dos pigmentos

Os testes de estabilidade seguiram a metodologia descrita por Velmurugan et al (2010b) e Perumal et al (2009). Após a produção e extração dos pigmentos (500 mL da cultura fermentada otimizada), a solução extraída foi rotaevaporada e ao extrato resultante, foram adicionados 150 mL de água destilada. Nos tubos de ensaio foram adicionados 3 mL do extrato de pigmento e cada tubo foi submetido a condições diferentes. Os tubos foram submetidos à análise no espectrofotômetro UV-Vis antes e após a exposição às seguintes condições: temperatura de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C por 10 min, mudança de pH para 2, 4, 6, 8, 10 e 12, incubação a 60 °C por 12 h, exposição à luz solar por 2 h, exposição à solução salina de cloreto de sódio (NaCl; Synth; São Paulo, Brasil) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1% e solução ácida de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; Synth; São Paulo, Brasil) sob faixa de concentração de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1%.

O percentual de estabilidade (S%) foi calculado usando a seguinte equação:  $S (\%) = [(A0-A1) \times 100] / 3$  onde A0 representa a absorbância do extrato antes dos tratamentos e A1 representa a absorbância do extrato após os tratamentos.

## 2.6 Atividade antibacteriana do extrato de pigmento

Neste estudo, foram utilizadas cepas de referência de *Enterococcus faecalis* 51299 e *Staphylococcus aureus* 29213 da American Type Culture Collection (ATCC - Rockville, MD, EUA). Para o teste de suscetibilidade, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A6 para bactérias, com algumas modificações para produtos naturais.

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), o extrato foi diluído nas concentrações de 15; 7,5; 3,75; 1,8; 0,9; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02 mg/mL em placas de 96 poços e em seguida foi adicionado o inóculo de cada bactéria preparado em caldo Müller-Hinton (MHB; Difco™, EUA) correspondente a 0,5 da escala de McFarland. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), após o período de incubação, os poços foram homogeneizados e 10 µL de cada poço foram transferidos para placas de ágar Müller-Hinton (MHA; Difco™, EUA) e incubados novamente por 24 h. CIM foi considerada a menor concentração em que não houve crescimento evidente de bactérias, tendo como referência os controles positivos.

## 2.7 Ensaio de Citotoxicidade

Este ensaio foi utilizado para avaliar se o extrato obtido possui propriedades nocivas às células. Utilizaram-se linhas celulares HeLa e SiHa, oriundas de carcinoma cervical humano, mantidas no Laboratório Multiusuário de Cultura Celular e Tecidos da Universidade Estadual de Maringá. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (contendo L-Glutamina, tamponada com 2 g/L de bicarbonato de sódio - Gibco, NY,

EUA), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS; Life Technologies; Itapevi, Brasil), 0,5 % de anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 0,5% de penicilina / estreptomicina (Gibco; NY, EUA). Para realizar o ensaio, um inóculo de  $2 \times 10^5$  células/mL foi preparado em meio RPMI 1640 e 200  $\mu$ L distribuídos em placas de 96 poços. A placa foi incubada a 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com solução tampão de fosfato de sódio 0,1% (PBS, pH 7,4) e adicionado o extrato diluído em RPMI 1640 nas concentrações de 30; 15; 7,5; 3,75; 1,8; 0,9; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 mg/mL.

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio Cell Titer 96 (Promega, Madison, WI, EUA), que consiste na redução de MTS (3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -5-[3-carboximetoxifenil].] -2- [4-sulfofenil] -2H-tetrazólio). O MTS foi diluído 1:10 em DMEM isento de fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), do qual foram adicionados 100  $\mu$ L a cada poço. A placa foi incubada novamente na ausência de luz por três horas. Após, foi realizada a leitura da placa em leitor de microplacas ASYS (Biochrom, Holliston, MA, EUA) a 490 nm. Poços contendo apenas meio de cultura e meio de cultura com células, foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A percentagem de viabilidade celular (CV%) foi calculada pela seguinte equação:  $CV = \frac{A - B}{C} \times 100$ , onde (A), corresponde a amostra, e (B), o controle negativo.

## 2.8 Teste de mutagenicidade

O potencial mutagênico do extrato foi avaliado pelo método de microssuspensão, com adaptações, proposto por Kado et al (1983). Os ensaios foram realizados com cepas de *Salmonella* TA100 (hisG46 / rfa /  $\Delta$ uvrB / pKM101 / ApR) na presença e ausência de ativação metabólica, a partir da fração S9 (Molotoxic Molecular Toxicology Inc., EUA).

Foi preparado um inóculo de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL em PBS 0,2 mM (pH 7,4). No ensaio de ativação não metabólica, foi adicionado 5  $\mu$ L de diferentes concentrações de extrato etanólico (22,5; 7,5; 0,8 e 0,2 mg / mL), 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana e 50  $\mu$ L de PBS 0,2 mM em cada tubo de ensaio. Para o ensaio de ativação metabólica, foram adicionados 50  $\mu$ L da fração S9, substituindo o PBS. Subsequentemente, os tubos foram pré-incubados durante 90 minutos a 37 °C. Após a pré-incubação, 2 mL de top ágar foram adicionados à solução e os tubos foram homogeneizados e vertidos em placas com ágar mínimo glicado (MGA). O número de colônias revertentes por placa, his+, foi mensurado em número absoluto após 66 horas a 37 °C.

O controle positivo utilizado nos testes sem ativação metabólica foi a azida sódica 2,5  $\mu$ g/placa (Sigma-Aldrich, EUA). Nos ensaios de ativação metabólica foi utilizado o composto 2-aminoantraceno 0,625  $\mu$ g/placa (2-AA; Sigma-Aldrich, EUA). Controles negativos foram realizados com o solvente da amostra, Etanol (5 mL/placa). O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado de acordo com a seguinte fórmula, em que (N) corresponde ao Número de revertentes e (C-) Controle negativo:  $IM = N/C-$

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação do meio de cultura, pH e temperatura

A expressão de pigmentos pelo fungo é influenciada diretamente por suas condições de desenvolvimento, fatores externos como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, podem favorecer ou inibir a sua produção (AKILANDESWARI E PRADEEP 2016). Os processos de fermentação realizados neste estudo ocorreram sob a ausência de luz, considerando que a luz também é um fator que pode influenciar significativamente o crescimento e expressão de pigmentos intracelulares e extracelulares. Resultados satisfatórios com diferentes espécies de fungos incubados na escuridão total já foram relatados, enquanto a exposição a diferentes comprimentos de onda da luz prejudicou ou inibiu a produção de pigmentos (VELMURUGAN et al 2010b).

O crescimento do fungo foi avaliado em dois meios de cultura: submerso (sais-glicose) e PDA semissólido. Decorrido o período de incubação houve confirmação visual de pigmentos vermelhos no meio PDA semissólido. Enquanto, no meio submerso não houve produção de pigmentos. Resultados divergentes dos encontrados para *F. oxysporum*, no qual o meio artificial de sais-glicose foi eficiente para obtenção de pigmento (NAGIA & EL-MOHAMEDY, 2007). Em culturas submersas, fungos filamentosos podem apresentar características morfológicas distintas (BEVORIC et al., 1991; GMOSER et al., 2017) que podem influenciar na secreção de metabólitos e conseqüentemente na expressão de pigmentos no meio, uma vez que pode interferir na absorção de oxigênio e nutrientes (TORRES et al., 2016; CHOUDHARI et al., 2007; LV et al., 2017). Em nosso estudo, *F. graminearum* exibiu características morfológicas distintas nos dois meios, sendo que o meio PDA semissólido proporcionou maior esporulação o que está de acordo com a literatura (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997; ANWER, 2017). Esse tipo de crescimento está associado com maior expressão de metabólitos secundários, confirmando ser a melhor das duas formulações (Machado et al., 2013).

A fermentação de *F. graminearum* foi avaliada no meio PDA semissólido incubado a 20 e 27°C (Figura 1A). A maior produção de pigmentos vermelhos foi observado a 27°C, sendo a temperatura escolhida como ideal para o processo de produção de pigmentos e avaliado em pH 2, 3, 4, 5, 6, e 7 (Figura 1B). A produção de pigmentos foi estimulada com o aumento do pH, desta forma, a menor absorbância foi observada em pH 2 e maior em pH 7, apesar disso, visualmente no pH 6 apresentou pigmentos vermelhos mais escuros, provavelmente porque a partir de preparações com pH 7 e acima, foi observada maior turbidez não relacionada a pigmento, sendo descartada deste estudo. A produção de biomassa, em alguns casos, foi igualmente estimulada conforme o aumento de pH.

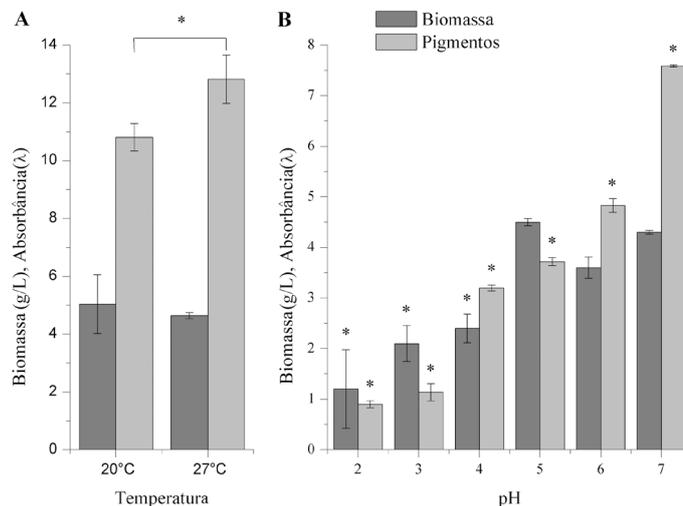


Figura 1. Produção de pigmentos por *Fusarium graminearum* em meio semissólido de batatas sob diferentes faixas de: **A.** Temperatura (20 e 27 °C), **B.** pH (2, 3, 4, 5, 6 e 7). \* representa valores de biomassa e pigmento estatisticamente diferentes comparado com todas as demais faixas de temperatura ou pH testados de acordo com o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Nossos resultados corroboram aos obtidos para produção de pigmentos vermelhos por *Isaria farinosa*, avaliada a 20, 27 e 35°C e pH 4, 5, 6, 7, 8 e 9, e conseguiu maior rendimento de pigmentos a 27°C, em pH 5-6 e ainda, produção de biomassa mais elevada nesses parâmetros (VELMURUGAN et al., 2010b). Apesar disso, a padronização de variáveis como temperatura e pH, em relação ao tipo de meio de cultura utilizado e a espécie de fungo em estudo, é de extrema importância, uma vez que os fatores ideais para produção de pigmentos para cada espécie de fungo poderá ser diferente nessas condições, assim como *Penicillium purpurogenum* GH2, também investigado pela produção de pigmentos vermelhos, em meio submerso foi observado maior produção em pH 5, a 24°C (MÉNDEZ et al., 2011). Ao contrário do observado em cultura sólida, no qual apresentou condições ótimas de cultura a pH 10 e 24 °C (ESPINOZA-HERNANDEZ et al., 2013).

Méndez e colaboradores (2011) ressaltaram a importância do controle de pH e temperatura durante os processos industriais, já que estes são fatores capazes de influenciar significativamente a biossíntese de metabólitos primários e secundários, o crescimento celular e formação do micélio. Assim, em nosso estudo, as melhores condições para expressão de pigmentos por *F. graminearum* foram padronizadas em: incubação em meio PDA semissólido, em pH 6 a 27°C.

### 3.2 Teste de Estabilidade do extrato de pigmentos

Nas últimas décadas observa-se uma busca a alternativas aos corantes sintéticos, como os ecológicos, para serem incluídos na produção de produtos que podem afetar diretamente a saúde da população, como a coloração de alimentos e tingimento de roupas, principalmente infantis (SIVAKUMAR et al., 2009). No entanto, uma das desvantagens na aplicação de corantes naturais é que estes são

susceptíveis à degradação durante os processos de fabricação, e armazenamento do produto produzido, interferindo assim, na cor final desejada do produto (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005). Deste modo, é de fundamental importância a determinação da estabilidade de um corante natural.

Os resultados obtidos pela exposição de alíquotas do extrato submetido a condições extremas podem ser observadas na Tabela 1. A cor inicial do pigmento era vermelha escura e um tom diferente de cor resultou após exposição do extrato a luz solar e ao vapor quente, onde adquiriu uma cor amarronzada. Nos demais parâmetros testados como a temperatura, pH, solução ácida ( $C_6H_8O_7$ ) e básica (NaCl), o extrato se manteve mais estável.

Parâmetros	Propriedades	
Solubilidade	Solúvel em água com adição de solventes orgânicos	
Absorção (nm)	500	
Coloração	Vermelho escuro	
Parâmetros	Estável em	Estabilidade (%)
pH	2 - 14	98,8% ± 0,55
Temperatura	40 - 90°C	97,6% ± 2,45
Vapor quente	-	94,2% ± 0,04
Luz solar	-	66,3% ± 2,24
Cloreto de sódio	0,1 - 1%	97,7% ± 1,61
Ácido cítrico	0,1 - 1%	96,4% ± 1,05

Tabela 1. Propriedades do pigmento obtido de *Fusarium graminearum* e sua estabilidade a diferentes tratamentos.

Conforme os dados encontrados, o pigmento produzido por *F. graminearum* pode ser considerado estável, diferentemente do pigmento vermelho de *Isaria farinosa* que sofreu desnaturação em várias faixas de pH e temperatura, apesar de estabilidade ao vapor e à luz solar (VELMURUGAN et al., 2010b). Ainda, há pigmentos produzidos por fungos que se mantêm estáveis em faixas restritas e específicas de pH, como o pigmento produzido por *Thermomyces*, estável apenas em pH 5 - 8 (POORNIAMMAL & GUNASEKARAN, 2015) e *Penicillium aculeatum*, estável a pH neutro (MAPARI et al., 2009). Por outro lado, pigmentos produzidos por *Monascus*, um dos fungos mais estudados para a produção de pigmentos alimentícios, se mostrou estável numa ampla faixa de pH de 2-10 e estabilidade ao calor de autoclavagem (MAPARI, THRANE & MEYER, 2010).

Os pigmentos fúngicos têm sido relatados como sendo mais estáveis do que outros pigmentos naturais extraídos de fontes vegetais (AGUILAR et al., 2018). No entanto, ainda existem poucas cepas de fungos filamentosos no mercado como *Monascus*, e que precisam buscar soluções para a melhoria da capacidade tintorial para estarem aptos a competir com as demais fontes de pigmentos (GMOSER et al., 2017). Assim, os resultados obtidos neste estudo se demonstram satisfatórios, uma vez que o extrato produzido por *F. graminearum* apresentou grande estabilidade, uma característica

almejável, quando exposto a condições com diferentes faixas de temperatura, pH, solução ácida e básica, sem perda significativa de suas características.

### 3.3 Atividade antimicrobiana do pigmento

Novas abordagens para o controle da contaminação microbiana têm sido exploradas devido a riscos de transmissão de doenças por alimentos contaminados (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012). Os pigmentos de origem microbiana, além de fornecer uma fonte alternativa aos corantes sintéticos, apresentam vantagens sobre eles, uma vez que podem apresentar propriedades biológicas de interesse que podem aumentar seu valor agregado como, atividade anticancerígena, antioxidante e antimicrobiana (RAO et al., 2017). Desta forma, em nosso estudo foi realizado o ensaio de susceptibilidade *in vitro* no intuito de determinar se os pigmentos em questão, possuem potencial antibacteriano. A CIM foi considerada a menor concentração a qual não houve nenhum crescimento evidente de microrganismos, sendo observado uma CIM e CBM de 3,75 mg/mL e 7,5 mg/mL de extrato para *E. faecalis* 51299 e *S. aureus* 29213, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos é possível considerar que o extrato de pigmentos possui atividade antibacteriana satisfatória, uma vez que para *Rhodotorula glutinis*, foi necessário uma concentração mais elevada do extrato de pigmentos para alcançar a mesma eficiência sobre *E. faecalis* e *S. aureus*, ambos com CIM a 16 mg/mL (ROSTAMI et al., 2016). Por outro lado, o extrato acetato de etila de fungos endofíticos isolados de *Piper crocatum*, demonstrou atividade antibacteriana contra cepas de *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus* a 31,25; 125 e 250 µg/mL do extrato (ASTUTI et al., 2014).

O extrato de fungos e sua atividade como agente antimicrobiano já foi explorado por alguns autores (AVANISH et al., 2015; PHARAMAT et al., 2013). Assim, em nosso estudo, ficou comprovado que o extrato de *F. graminearum* possui potencial atividade microbicida, para ambos os isolados avaliados, mas em concentrações diferentes.

### 3.4 Ensaio de Citotoxicidade e mutagenicidade

Diversos casos de reações alérgicas associadas aos corantes sintéticos vêm sendo relatados. Corantes como amaranto, tartrazina e eritrocina, demonstraram em estudos *in vitro*, a capacidade de se ligar diretamente ao DNA, além disso já é bem conhecido o potencialmente carcinogênico, teratogênico e mutagênico de outros corantes (BABHITA, SOCCOL & PANDEY, 2007). Um número crescente de pigmentos fúngicos têm sido relatados na literatura, apesar disso, esses pigmentos devem cumprir com alguns critérios como toxicidade (MALIK, TOKKAS & GOYAL, 2012). Portanto, a avaliação desses pigmentos quanto aos seus possíveis efeitos é de extrema importância, e explorado neste estudo, através de métodos para avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade, determinando se o extrato em estudo pode ser considerado uma alternativa confiável.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular foram obtidos através do método colorimétrico utilizando o MTS. Ambas as células responderam de modo semelhante ao extrato, apresentando IC<sub>50%</sub> na concentração de 3,7 mg/mL do extrato etanólico.

Pode-se considerar que o extrato apresentou baixa toxicidade para linhagens celulares uma vez que precisou de concentração equivalente, necessária para matar todas as bactérias e atingir 50% de células HeLa e SiHa. Além disso, outros estudos têm observado doses baixíssimas para IC<sub>50</sub>, como Wu, et al (2014), que demonstrou o efeito inibitório do extrato de *Fomitopsis pinicola* em células cancerosas de fígado, pulmão, colorretal e mama, com IC<sub>50</sub> = 7,4 µg/mL. Em nosso estudo foi possível observar que o extrato inibe o crescimento da linhagem celular de forma dependente da dose, assim como observado para o extrato de fungos endofíticos contra linhagens celulares T47D e WiDr com IC<sub>50%</sub> de 37,43 µg/mL e 120,38 µg/mL, respectivamente (ASTUTI et al., 2014). Liu et al (2009) observaram que o extrato etanólico de dois fungos, *G. lucidum* e *G. sinense* apresentavam efeito de proliferação antitumoral através da via de apoptose e do efeito de parada do ciclo celular em linhagens de células tumorais.

A avaliação da atividade mutagênica foi realizada seguindo a metodologia de AMES, o teste consiste em avaliar a mutação reversa de *Salmonella* sorovar Typhimurium para detectar mutações induzidas por agentes físicos e químicos genotóxicos. A amostra é considerada com potencial mutagênico quando o índice de mutagenicidade (IM) for igual ou maior que dois em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houver uma relação de dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Após a contagem das colônias revertentes por placa foi observado que o composto não apresentou potencial mutagênico para a linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica, uma vez que o índice de mutagenicidade foi inferior a 2 e os resultados não sugeriram uma relação de dose resposta.

Tratamento (µg/placa)	TA100	
	S9-	S9+
0,0 <sup>a</sup>	197,8 ± 13	207,2 ± 19
275	172 ± 27 (0,86)	219,33 ± 11 (1,05)
850	159,67 ± 11 (0,80)	215 ± 25 (1,03)
2500	146 ± 19 (0,73)	212 ± 19 (1,02)
7500	151,33 ± 4 (0,76)	187 ± 26 (0,90)
22500	153,33 ± 17 (0,77)	150 ± 13 (0,72)
C+	865 ± 10	888 ± 12

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade (MI) do extrato de *F. graminearum* em cepas TA100 de *S. Typhimurium* na presença (+ S9) e ausência (S9) de ativação metabólica.

<sup>a</sup>Controle negativo: DMSO; Controle Positivo (C +): <sup>b</sup>azida sódica (2,5 µg/plate); <sup>c</sup>2-aminoantraceno (1,5 µg/plate).

Nossos resultados estão de acordo com o observado por outros autores, como Lopes (2015), que avaliaram a genotoxicidade e mutagenicidade de extratos brutos produzidos pelos fungos *P. stromaticum* e *Neofusicoccum* sp., e observaram que estes não ocasionaram danos genotóxicos, e não induziram mutagenicidade para células.

Outros estudos já relataram a capacidade de compostos antimicrobianos serem tóxicos para cânceres humanos (CUI, GUO & XIAO, 2011; SANTIAGO et al., 2012; ROSTAMI et al., 2016). Apesar disso, muitos pigmentos microbianos ainda são proibidos em muitos países. O melhor exemplo é o pigmento *Monascus* que tem sido usado na Ásia durante séculos como corante alimentar, mas proibido na Europa e nos Estados Unidos devido à presença de micotoxinas (DUFOSSE et al., 2005). Nesse contexto, o fato do extrato em estudo apresentar baixa toxicidade, e não possuir potencial mutagênico, é animador uma vez que testes toxicológicos apontam a confiabilidade dos pigmentos orgânicos extraídos, como uma fonte alternativa mais viável em substituição aos corantes sintéticos, já que uma das maiores preocupações em relação aos corantes sintéticos está ligada a toxicidade de alguns de seus compostos (NAGIA & EL-MOHAMEDY, 2007).

#### 4 | CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que a forma mais adequada para máxima obtenção de pigmentos por *F. graminearum* consiste na fermentação utilizando meio PDA semissólido, com pH 6, incubado a 27°C sob condições estacionárias e ausência de luz. O extrato obtido apresentou estabilidade aos parâmetros de produção avaliados: temperatura, pH, vapor e condições de tingimento. Não apresentou atividade mutagênica ou citotóxica significativas e demonstrou atividade antimicrobiana. Assim esses resultados são animadores uma vez que atestam a confiabilidade do extrato para uso industrial.

#### REFERÊNCIAS

AGUILAR D; MORALES-OYERVIDES L; CONTRERAS-ESQUIVEL J.C; MÉNDEZ-ZAVALA A; RASO J. MONTAÑEZ J. Effect of ozone processing conditions on stability of fungal pigments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 255-263, fev., 2018.

AKILANDESWARI P; PRADEEP B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1631–1643, 2016.

ANWER A. Status of biopesticides and biocontrol agents in agriculture: an overview. In; ANWER, A. (Eds.) **Biopesticides and Bioagents: Novel Tools for Pest Management**. Apple academic press, v. 1, p. 418, 2017.

ASTUTI P; WAHYONO; NABABAN O. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 592–596, 2014.

AVINASH K. S; ASHWINI S; RAMESH B. N; KRISHNAMURTHY Y. L. Antimicrobial Potential of Crude Extract of *Curvularia lunata*, an Endophytic Fungi Isolated from *Cymbopogon caesius*. **Journal of Mycology**, p. 4, nov., 2015.

BABHITA S; SOCCOL C. R; PANDEY A.: Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource technology**, v. 98, p. 1554-1560, 2007.

BERNSTEIN L; KALDOR J; MCCANN J; PIKE M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BEROVIC M; CIMERMAN A; STEINER W; KOLOINI T. Fermentation with submerged citric acid: rheological properties of the *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 34, p. 579 - 581, 1991.

BLUMENTHAL C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 39, p. 214–228, 2004.

CHOUDHARI S. M; ANANTHANARAYAN L; SINGHAL R. S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of  $\beta$ -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 3166-3173, 2008.

CUI J; GUO S; XIAO P. Antitumor e atividades antimicrobianas de fungos endofíticos de partes medicinais de *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang Science University B**, v. 12, n. 5, p. 385-392, 2011.

DUFOSSE L; GALAUP P; YARON A; ARAD S. M; BLANC P; MURTHY K. N. C; et al. Microorganisms and microalgae as source of pigments for use: a scientific oddity or an industrial reality?. **Trends. Food Sci. Technol**, v. 16, p. 389–406, 2005.

DUVAL J; PECHER V; POUJOL M; LESELLIER E. Research advances for the extration, analysis and uses of anthraquinones: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 812–833, 2016.

ESPINOZA-HERNÁNDEZ T. C; RODRÍGUEZ-HERRERA R; GONZÁLEZ C. N. A; LARA-VICTORIANO F; REYES-VALDÉS M. H; CASTILLO-REYES F. Characterization of three novel pigment-producing *Penicillium* strains isolated from the Mexican semidesert. **African journal of biotechnology**, v. 12, n. 22, p. 3405-3413, Mai., 2013.

FERREIRA J A; MAHBOUBI A; LENNARTSSON P. R; TAHERZADEH M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. **Bioresour Technol**, v. 215, p. 334–345, 2016.

GMOSER R; FERREIRA J. A; LENNARTSSON P. R; TAHERZADEH M. J. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biol Biotechnol**. v. 4, n. 4, 2017;

GUNASEKARAN S; POORNIAMMAL R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. Under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12 p. 1894-1898, Jun., 2008.

HERNÁNDEZ-ORTEGA M; ORTIZ-MORENO A; HERNÁNDEZ-NAVARRO M. D; CHAMORRO-CEVALLOS G; DORANTES-ALVAREZ L; NECOECHEA-MONDRAGÓN H. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L.). **J Biomed Biotechnol**, 2012.

KADO N. Y; LANGLEY D; EISENSTADT E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutat. Res.** v. 121, p. 25-32, 1983.

KUMAR A; DOBROVOLSKY V. N; DHAWAN A; SHANKER R. Mutagenicity: Assays and Applications, pp. 133-160, in: MANDAL P; RAI A; MISHRA S; TRIPATHI, A; DAS M. (Ed), **Mutagens in food**, v. 1. Academic Press, 2017.

LIU Y. W; GAO J. L; GUAN J; QIAN Z. M; FENG K; LI S. P. Evaluation of Antiproliferative Activities and Action Mechanisms of Extracts from Two Species of *Ganoderma* on Tumor Cell Lines. **J. Agric. Food Chem**, v. 57, n. 8 p. 3087–3093, 2009.

LOPES, P. S. **Avaliação dos efeitos antitumorais de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* em células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho. Araraquara, SP, 2015.

LV J; ZHANG B. B; LIU X. D; ZHANG C; CHEN L; XU G. R; CHEUNG P. C. K. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452-458, 2017.

MACHADO I; TEIXEIRA J. A; RODRÍGUEZ-COUTO S. Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. **journal of biotechnology**, v. 165, p. 195–200, 2013.

MALIK K; TOKKAS J; GOYAL S. Microbial pigments: A Review. **International Journal of Microb. Res. Technol.** p. 1361–365, 2012.

MAPARI S. A. S; NIELSEN K. F; LARSEN T. O; FRISVAD J. C; MEYER A. S; THRANE U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MAPARI S. A. S., THRANE U., MEYER A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?. **Trends Biotechnol**, v. 28, p. 300–307, 2010.

MÉNDEZ A; PÉREZ C; MONTAÑEZ J. C; MARTÍNEZ G; AGUILAR C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang Science University B**, v. 12, n. 12, p. 961–968, Dez., 2011.

MIRJALILI M; NAZARPOOR K; KARIMI L. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, p. 1045-1051, 2011.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29–60, 2000.

NAGIA F. A; EL-MOHAMEDY R. S. R; Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*, **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 550-555, 2007.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Document M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa., 2003.

PAGANO M. C; DHAR P. P. Fungal pigments: an overview. In: GUPTA V. K; MACH R. L; SREENIVASAPRASAD S. editors. **Fungal bio-molecules: sources, applications and recent developments**, London: Wiley, v. 1, p. 173–181, 2015.

Perumal K; Stalin V. K; Chandrasekarethiran S; Sumathi E; Saravanakumar A. Extraction and characterization of pigment from *Sclerotinia* sp. and its use in dyeing cotton. **Textile Research**

Journal, v. 79, p. 1178-1187, 2009.

PHARAMAT T; PALAGA T; PIAPUKIEW J; WHALLEY A. J. S; SIHANONTH P. Antimicrobial and anticancer activities of endophytic fungi from *Mitrajyna javanica* Koord and Val, **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 49, p. 5565–5572, 2013.

POORNIAMMAL R., GUNASEKARAN S. Physical and chemical stability analysis of Thermomyces Yellow Pigment for Food Application. **Intl. J. Food . Ferment. Technol.**, v. 5, n. 1, p. 47-52, Jun., 2015.

RANI B; VIVEK K; SINGH J; BISHT S; TEOTIA P; SHARMA S. AND KELA, R.: Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. **Brazilian journal of microbiology**, v.45, p. 1055 - 1063, 2014.

RAO M. P. N; XIAO M; LI W. J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Front Microbiol.** v. 8, p. 1113, 2017.

ROSTAMI H; HAMED H; YOLMEH M. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 29, n. 4, p. 684–695, dez., 2016.

SANCHEZ S, RUTZ B, RODRÍGUEZ-SANOJA R. Produção microbiana de carotenóides. Em: BRIAN M, DAVID A, IOANNIS G, LINDA H, editores. **Produção microbiana de ingredientes alimentares, enzimas e nutracêuticos**. Burlington: Elsevier Science, p. 194-223, 2013.

SANTIAGO C; FITCHETT C; MUNRO M. H. G; JALIL J; SANTHANAM J. Cytotoxic and Antifungal Activities of 5-Hydroxyramulosin, a Compound Produced by an Endophytic Fungus Isolated from *Cinnamomum mollisimum*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2012, p. 6, 2012.

SANTOS A. B; FÁVARO-TRINDADE C. S; GROSSO C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de pàprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322-326., 2005.

SHARID M; UL-ISLAM S; MOHAMMAD F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of cleaner production**, v. 53, p. 310-331, 2013.

SIVAKUMAR V; LAKSHMI A. J; VIJAYEESWAREE J; SWAMINATHAN, G. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, p. 782–789, 2009.

SUN R; GAO Y. X; SHE, K. Z; XU Y. B; WANG C. R; LIU H. Y; DONG J. Y.: Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry letters**, v. 4, p. 101-105, 2011.

SURYAVATHI V; SHARMA S; SHARMA S; SAXENA P; PANDEY S; GROVER R; KUMAR S; SHARMA K. P. Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice. **Reproductive Technol**, v. 19, p. 547-556, 2005.

TEIXEIRA T. P. F; AQUINO S. F; PEREIRA S. I; DIAS A. Use of Calcined Layered Double Hydroxides for the Removal of Color and Organic Matter from Textile Effluents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 19 - 26, 2014.

TORRES F. A. E; ZACCARIM B. R; NOVAES L. C. L; JOZALA A. F; DOS SANTOS C. A; TEIXEIRA M. F. S; SANTOS-EBINUMA V. C. Natural colorants from filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 100, p. 2511–2521, 2016.

VELMURUGAN P; KAMALA-KANNAN S; BALACHANDAR V; LAKSHMANAPERUMALSAMY P; CHAE J.-C; OH, B-T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications

and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 262-268, 2010a.

VELMURUGAN P; LEE Y. H; NANTHEKUMAR K; KAMALA-KANNAN S; DUFOSSÉ L; MAPARI S. A. S; OH, B-T. Water-soluble red pigments from *Isaria farinosa* and structural characterization of the main colored component. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 581–590, 2010b.

VINIEGRA-GONZALES, G. solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring, p 5-22. Em: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) **Advances in solidstate fermentation**. Dordecht: Kluwer academic publishers, 1997.

WU H. T; LU F. H; SU Y. C; OU H. Y; HUNG H. C; WU J. S; YANG Y. C; CHANG C. J. *In Vivo* and *In Vitro* Anti-Tumor Effects of Fungal Extracts. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2546-2556, 2014.

ZAGATTO, P.: Ecotoxicologia, p. 1-13, Em. ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. (Ed. 2) **Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações**. São Carlos, RiMa, 2008.

## O USO DE HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO NO BRASIL E NO MUNDO E SEUS IMPACTOS AO MEIO AMBIENTE E SAÚDE HUMANA

### **Yuri Dornelles Zebral**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil. yurizebral@gmail.com; adaltobianchini@furg.br

### **Adalto Bianchini**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil. yurizebral@gmail.com; adaltobianchini@furg.br

**RESUMO:** Os herbicidas à base de glifosato são formulações comerciais usadas no controle de ervas daninhas. No início, a utilização do glifosato era discreta. Em 1994 foram usados 43 milhões de quilos deste composto. Com a liberação mundial do uso de cultivares geneticamente alterados para tolerar estes herbicidas, seu uso cresceu exponencialmente até alcançar o patamar de pesticida mais usado no mundo. Em 2014, 826 milhões de quilos foram usados globalmente. Como resultado deste intenso uso, processos de contaminação ambiental são frequentes. O glifosato já foi encontrado em corpos d'água de diversos países, principalmente naqueles com forte tradição agrária. Além disso, este herbicida também foi encontrado em solos e até mesmo na água de chuva. Geralmente as concentrações destas contaminações se

aproximam dos valores máximos estipulados pela legislação Brasileira e em alguns casos, até a ultrapassa. Frente a isto, potenciais danos a organismos não alvo, como animais incluindo o ser humano, geram crescente preocupação. Esta toxicidade já foi bem estudada em uma série de animais, como peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e até mesmo microrganismos. Um destes efeitos está relacionado ao aumento de estresse oxidativo promovido pela inibição do sistema antioxidante celular. Como resultado, processos de dano oxidativo podem ocorrer. Além disto, o glifosato pode inibir a acetilcolinesterase e provocar uma série de prejuízos neuronais e musculares, incluindo morte em processos de contaminação intensos. Ainda, estes compostos podem desregular o sistema endócrino e causar alterações reprodutivas e embriológicas. Em termos mais específicos de saúde humana, os herbicidas à base de glifosato vêm sendo cada vez mais implicados com o aumento no surgimento de câncer. Inclusive, em 2015 a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracterizou este herbicida como “provavelmente carcinogênico para seres humanos”. Por fim, os herbicidas à base de glifosato podem prejudicar organismos chave e provocar alterações ao nível ecossistêmico, como por exemplo alterar os padrões de cobertura vegetal em regiões de campo, gerar processos de eutrofização e

promover o crescimento de microrganismos patogênicos para vegetais e animais, incluindo os seres humanos. Sendo assim, fica evidente que o grande aumento no uso de herbicidas à base de glifosato veio acompanhado de profundos prejuízos ao meio ambiente e saúde humana.

**ABSTRACT:** Glyphosate-based herbicides are commercial formulations used in agricultural and non-agricultural weed control. At the beginning, the use of these herbicides was discrete and about 43 million kg were globally used in 1994. Notwithstanding, the liberation of genetically engineered crops that were glyphosate-tolerant was a game-change and the use of these herbicides grown exponentially. Now, glyphosate formulations are the most worldwide used pesticides. In 2014, about 826 million kg were used globally. As a result of such intense use, environmental contamination became common. Glyphosate has already been found in water bodies of many countries, mainly in traditionally-agricultural ones. Moreover, these herbicides were shown to be present in soil and even in rain-water. Commonly, such contaminations are given in concentrations that are close to the maximum threshold stipulated in Brazilian legislation, and in many cases, surpasses it. As consequence, impacts to non-target species, such as animals including humans, had become focus of growing concern. Toxicity to non-target species has already been demonstrated in fish, amphibia, reptile, bird, mammal and even microorganisms. One of these toxic effects are related to augmented oxidative stress caused by inhibition of cellular antioxidant capacity. As a result, oxidative damage may be present. Beyond that, glyphosate-based herbicides may inhibit acetylcholinesterase activity and negatively affect neuronal and muscular functioning and lead to death in more intense contaminations. Moreover, these herbicides may act as endocrine disruptors and impact reproduction and embryonic development. Additionally, glyphosate formulations have been implicated with the growing number of cancer cases leading the World Health Organization (WHO) to characterized these herbicides as “probably carcinogenic to humans”, in 2015. Finally, glyphosate-based herbicides may harm key-organisms and induce ecosystem changes. For example, glyphosate formulations may alter the pattern of vegetative cover in fields, may induce eutrophication and promote growth of pathogenic microorganisms that harms vegetables and animals, including humans. Therefore, it is evident that the growing use of glyphosate-based herbicides is followed by profound impacts in the environment and human health.

## 1 | HISTÓRICO E USO DOS HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO

A primeira síntese do glifosato ocorreu em 1950, dentro dos laboratórios de uma empresa farmacêutica que não enxergou aplicações econômicas para a nova molécula. Como consequência, a empresa optou por abandonar as pesquisas relacionadas ao glifosato e vendeu sua fórmula (Dill et al, 2010). Desde então, o glifosato percorreu um longo caminho até se tornar o pesticida mais usado no mundo. O segundo passo

determinante nesta caminha só foi dado após 20 anos de pesquisa, quando em 1970 se descobriu a ação inibitória do glifosato sobre a 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase, uma enzima essencial para a rota do shikimate, e sua consequente ação herbicida (Duke e Powles, 2008). Já em 1974 o glifosato começou a ser distribuído comercialmente pela Monsanto, na formulação Roundup com o intuito de matar ervas daninhas que cresciam junto às lavouras (Duke e Powles, 2008). Até esse momento, o herbicida só poderia ser usado para limpar o campo no período que antecedia o plantio, ou então no período posterior à colheita, já que a ação herbicida da formulação era não seletiva (atuava tanto nas ervas-daninhas quanto no cultivar alvo).

Desde o início de sua comercialização, na década de 70, até o início da década de 90, o uso de glifosato foi modesto e cresceu pouco. Em 1994 o uso mundial do herbicida foi de aproximadamente 43 milhões de quilos. Apesar disso, com a liberação global do uso de cultivares transgênicos resistentes ao glifosato, em 1996, o uso do herbicida cresceu vertiginosamente (Benbrook, 2016). A partir desse momento, os produtores poderiam usar o glifosato em suas lavouras em qualquer período do processo de cultivo, bastava usar as sementes geneticamente modificadas vendidas pela Monsanto. O uso combinado do glifosato com cultivares resistentes foi um divisor de águas que proporcionou um aumento sem precedentes no uso desse herbicida. Em 2014, o uso global do glifosato já alcançava os 826 milhões de quilos (Benbrook, 2016).

Os três países que mais produziram soja transgênica resistente ao glifosato em 2014 foram os Estados Unidos (315,4 milhões de toneladas), o Brasil (94,5 milhões de toneladas) e a Argentina (56 milhões de toneladas) (Benbrook, 2016). Especificamente no Brasil, esse valor corresponde à 94% de toda a soja produzida no país (Pignati et al, 2017). Considerando que a soja corresponde à 42% de toda a área plantada do Brasil (Pignati et al, 2017), fica evidente o peso que o cultivar transgênico resistente ao glifosato, e por consequência o próprio herbicida, tem no país.

## 2 | DESTINO AMBIENTAL

A contaminação ambiental por glifosato se dá pelo processo de lixiviação das lavouras, causado principalmente pela água das chuvas, já que este herbicida é extremamente hidrossolúvel (10.000 – 15.700 mg/L, à 25°C) (Annet et al 2014). Desta forma, é esperado que o ambiente aquático que se encontra no entorno de lavouras seja o mais impactado (Annet et al 2014). De fato, vários trabalhos evidenciam a contaminação deste ambiente. Por exemplo, a concentração de 1,48 mg/L já foi encontrada em um córrego de Arapotí (Paraná, Brasil) (Tzaskos et al 2012). Ainda, este herbicida foi encontrado em águas Argentinas nas concentrações de 0.1 - 0.7 mg/L (Peruzzo et al 2008), 0.03 - 1.50 mg/L (Aparicio et al 2013) e 0.6 mg/L (Ronco et al 2016). É interessante observar que vários desses valores estão bem acima da concentração máxima permitida pela legislação brasileira em águas de tipo I (65

µg/L; resolução CONAMA 357) e ficam dentro das projeções de “pior cenário de contaminação” (1.7 - 5.2 mg/L) indicados em Annet et al (2014). Apesar disto, as concentrações determinadas do glifosato em corpos d’água de outros países como Estados Unidos, Canadá e França geralmente são menores, variando de 0.02 até 430 µg/L (Annet et al 2014).

O glifosato também já foi encontrado em outros ambientes além do aquático, como no solo (Peruzzo et al 2008) e surpreendentemente na água de chuva (Chang et al 2011; Alonso et al 2018). O aparecimento de glifosato na água atmosférica aumenta bastante o raio de contaminação por este herbicida, considerando que essas massas de vapor d’água possuem uma grande capacidade de dispersão. Sendo assim, a contaminação gerada por regiões agrícolas que fazem o uso dos herbicidas pode chegar a regiões urbanas distantes, ou até mesmo em áreas de cultivo agroecológicas que não fazem uso de agrotóxicos.

### 3 | TOXICIDADE PARA ORGANISMOS NÃO ALVO

As empresas que produzem herbicidas à base de glifosato conseguiram sustentar por alguns anos a ideia de que estes compostos não possuíam toxicidade para organismos não vegetais. Essa ideia era baseada na tese de que apenas vegetais possuem a 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase. Esse argumento já não pode mais ser considerado, pois hoje efeitos tóxicos destes herbicidas em espécies não vegetais já foram amplamente demonstrados. Evidentemente, tais mecanismos de toxicidade não envolvem a 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase.

As formulações comerciais de herbicidas à base de glifosato são várias e diversas (Benbrook, 2016). Isso adiciona complexidade ao processo de avaliação de seus possíveis efeitos tóxicos, considerando que cada formulação possui diferentes proporções de mistura do princípio ativo com adjuvantes, os quais também possuem toxicidade por si só (Annet et al 2014). Inclusive, os próprios adjuvantes usados podem variar. Esses compostos são adicionados às formulações comerciais afim de potencializar o efeito herbicida do glifosato, aumentando sua capacidade de penetrar no tecido dos organismos. As polioxietilenamidas (POEA) estão entre os adjuvantes mais utilizados (Annet et al 2014).

De forma geral, os efeitos tóxicos dos herbicidas à base de glifosato podem ser divididos em estresse oxidativo (Menezes et al, 2011), inibição da acetilcolinesterase (Sánchez et al, 2017) e desregulação endócrina (Soso et al, 2007). Apesar disso, outros efeitos são conhecidos, mas não tão bem estudados. Por exemplo, alguns trabalhos demonstraram ações sobre o desenvolvimento embrionário (Paganelli et al, 2010; Zebral et al, 2017). Além disso, efeitos carcinogênicos destas formulações também já foram demonstrados (Thongprakaisang et al, 2013; International Agency for Research on Cancer, 2015; Fortes et al, 2015). É interessante observar que esses efeitos são em

maior ou menor grau, compartilhados por diversas espécies animais. Nesse sentido, existe uma confluência entre danos provocados ao meio ambiente e à saúde pública. Esta ideia será melhor explorada nos tópicos abaixo.

### 3.1 Estresse oxidativo

O processo de estresse oxidativo se caracteriza pela incapacidade do sistema antioxidante celular em neutralizar compostos oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio e radicalares. Como resultado deste processo, prejuízos celulares são esperados, como danos no material genético, em proteínas e na membrana plasmática. Eventualmente, esses danos podem levar a alterações nas organelas e morte celular (Amado et al, 2009).

Os herbicidas à base de glifosato podem provocar aumento de estresse oxidativo pela inibição do sistema oxidante. Estas formulações podem diminuir a atividade das enzimas superóxido dismutase (Menezes et al, 2011), glutathione-S-transferase (Lushchak et al, 2009) e catalase (Menezes et al, 2011). Ainda, a exposição a estes herbicidas pode prejudicar o sistema antioxidante não enzimático pela diminuição na quantidade de glutathione (Modesto and Martinez, 2010).

Associado a este processo de redução do sistema antioxidante enzimático e não enzimático, é possível observar também aumento de dano oxidativo, geralmente caracterizado por aumento no grau de peroxidação de lipídeos (danos na membrana plasmática) (Gluszczak et al, 2011; Menezes et al, 2011), no grau de carbonilação de proteínas (dano nestas estruturas) (Gluszczak et al, 2011; Menezes et al, 2011) e genotoxicidade (danos no material genético) (Poletta et al, 2011). Ainda, este último grupo de danos pode também desencadear um processo mutagênico. Por fim, é interessante observar que esses efeitos foram demonstrados em uma grande diversidade de espécies, como poliquetos, peixes, anfíbios, répteis e ratos, em concentrações que variam de 0,05 mg/L até 20 mg/L.

### 3.2 inibição da acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é responsável pela quebra do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares. A diminuição de sua atividade leva ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e conseqüentemente, hiperestimulação da membrana pós-sináptica. Este processo leva ao mal funcionamento neuronal e/ou muscular e até mesmo à morte (Fulton e Key, 2001). Um grande número de trabalhos mostra que os herbicidas à base de glifosato podem inibir a atividade desta enzima, tanto no cérebro quanto no músculo, em exposição aguda e crônica (Cattaneo et al, 2011; Lajmanovich et al, 2011; Menendez-Helman et al, 2012; Modesto e Martinez, 2010; Salbego et al, 2010; Sánchez et al, 2017). Além disto, estes efeitos já foram descritos em várias espécies. É interessante observar que geralmente as mortes associadas à exposição aguda à organofosforados, como o glifosato, estão relacionadas

à inibição da acetilcolinesterase (Colovic et al, 2013). Vale ressaltar que este perfil de contaminação está relacionado à ingestão acidental de uma grande quantidade do produto e, em geral, acomete principalmente os próprios produtores e seus familiares (Colovic et al, 2013).

### 3.3 Desregulação endócrina

Um agente é caracterizado como desregulador endócrino quando altera a produção, transporte, degradação ou ação de algum hormônio, provocando prejuízos no sistema de regulação endócrina (Ankley et al, 2009). Um grupo de hormônios que os herbicidas à base de glifosato podem afetar são os esteroides. Já se sabe que estas formulações podem alterar a produção destes hormônios pela diminuição na expressão da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (Walsh et al, 2000). Desta forma, toda a produção de hormônios esteroides pode ser comprometida. Ainda, se sabe que estes herbicidas podem diminuir a atividade da aromatase, enzima que converte a testosterona em estradiol (Richard et al, 2005). Em conformidade a este dado, Soso et al (2007) mostram que o peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) exposto cronicamente à uma formulação comercial de glifosato apresentou níveis plasmáticos de estradiol diminuídos. Além disto, estes herbicidas podem apresentar atividade estrogênica pela interação agonista com receptores androgênicos (Thongprakaisang et al, 2013). Em conjunto, estes resultados demonstram que o glifosato e suas formulações possuem potencial para comprometer a reprodução de vertebrados. De fato, vários trabalhos mostram que estes herbicidas realmente podem comprometer este processo, tanto pela redução na qualidade espermática (Lopes et al, 2014; Sanchez et al, 2017), diminuição na produção de embriões (Uren Webster et al, 2014, Zebral et al, 2018) e diminuição na qualidade da prole (Soso et al, 2007).

Além do comprometimento reprodutivo, os herbicidas a base de glifosato podem alterar a atividade do ácido retinóico, hormônio importante durante o desenvolvimento embrionário (Paganelli et al, 2010). De fato, vários trabalhos mostram que após exposição a estes herbicidas, diversas espécies animais incluindo peixes (Paganelli et al, 2010; Zebral et al, 2017), ave (Paganelli et al, 2010), anfíbio (Paganelli et al, 2010) e crustáceo (Avigliano et al, 2014) apresentaram alterações embrionárias semelhantes ao fenótipo de desregulação do ácido retinóico, como alterações craniofaciais (Lohnes et al, 1994) e redução/ausência de olhos (Lopez e Carrasco, 1992). Além disto, é sabido que áreas rurais onde os herbicidas a base de glifosato são extensivamente utilizados vem sofrendo aumento no número de bebês nascidos com alterações embrionárias. Estas alterações também se assemelham com o fenótipo de disfunção retinóica e se apresentam como microcefalia, anencefalia, lábios leporinos (Benitez Leite et al., 2009; Campana et al., 2010) e ciclopia (Lopez et al., 2012; Saldarriaga, 2010).

### 3.4 Efeitos ecossistêmicos

Avaliações ecossistêmicas pretendem entender como se dá as relações entre as espécies, em termos populacionais e de comunidade, bem como a relação destas com fatores abióticos, como a radiação solar e a temperatura. Desta forma, qualquer tipo de fator que possa alterar estas relações estará provocando efeitos ecossistêmicos. Neste contexto, os efeitos tóxicos já apresentados dos herbicidas à base de glifosato que possam acarretar prejuízos no desempenho individual dos organismos, e por consequência impactar suas populações, já estão provocando efeitos ecossistêmicos em alguma instância. Os prejuízos descritos para a reprodução e desenvolvimento embrionário são bons exemplos disto.

Além disto, efeitos tóxicos sobre espécies chave também podem ser prejudiciais para o funcionamento ecossistêmico. Neste sentido, efeitos sobre microrganismos ganham destacada relevância. Por exemplo, herbicidas à base de glifosato prejudicam microrganismos importantes para o crescimento de plantas, como *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia spp.*, fungos associados ao rizoma e bactérias associadas à fixação de nitrogênio. Como consequência, os padrões de cobertura vegetal de zonas de campo foram alterados (Arango et al, 2014; Druille et al, 2015; Schafer et al, 2014; Zobiole et al, 2010). Este tipo de efeito pode impactar negativamente uma série de organismos que dependem de padrões específicos de cobertura vegetal para a manutenção de suas populações.

Estudos também demonstraram que a contaminação por formulações contendo glifosato alteraram a composição microbiológica tanto em água marinha (Stachowski-Haberkorn et al, 2008) quanto doce (Relyea, 2005), provocando inclusive aumento no processo de eutrofização pela elevação na disponibilização de fósforo (Perez et al, 2007; Vera et al, 2010). Eventos deste tipo levam a mortalidade em massa de organismos, principalmente peixes, e grande prejuízo ecossistêmico.

Por fim, a exposição a estes herbicidas pode incentivar o crescimento de microrganismos patogênicos ao invés de espécies benéficas. Já foi demonstrado que solo contaminado com formulações baseadas em glifosato favorece o patógeno *Fusarium spp.*, levando ao apodrecimento de raízes vegetais (Rosenbaum et al, 2014; Yamada et al, 2009). De forma semelhante, o patógeno *Staphylococcus aureus* que pode prejudicar humanos e outros animais também pode estar mais presente em solos contaminados com estes herbicidas (Funke et al, 2007; Priestman et al, 2005).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos dados apresentados aqui, fica evidente que a sociedade humana está usando os herbicidas à base de glifosato com cada vez mais intensidade. Galopando no mesmo passo, estão os processos de contaminação ambiental. Dentro deste contexto, as preocupações relacionadas aos prejuízos ambientais e para a saúde

humana causados por estas formulações são grandes.

Como apresentado, os efeitos tóxicos destes herbicidas para organismos não alvo são, em geral, compartilhados por várias espécies, incluindo o ser humano. Frente à processos de contaminação aguda à baixas concentrações, os efeitos tóxicos esperados estão relacionados ao aumento no processo de estresse oxidativo, que pode levar à danos teciduais e morte celular. No caso de contaminações agudas à altas concentrações, efeitos relacionados à inibição da acetilcolinesterase são mais frequentes. Neste caso, os prejuízos são mais drásticos, podendo inclusive ser fatais.

Em relação a exposições crônicas, são esperados efeitos mais intensos do processo de estresse oxidativo. Ainda, possíveis danos oxidativos de longo prazo ao material genético podem produzir efeitos mutagênicos e resultar no surgimento de câncer. Vale ressaltar que em 2015 o glifosato foi considerado pela Organização Mundial da Saúde como “provavelmente carcinogênico para seres humanos”. Além disto, recentemente a Monsanto foi sentenciada a pagar 1,1 bilhão de reais de multa a um jardineiro que usava a formulação produzida pela empresa e que acabou por desenvolver câncer (Jornal Folha, 2018). Ainda em exposição crônica, efeitos relacionados à desregulação endócrina são esperados, levando à prejuízos reprodutivos e também a alterações de desenvolvimento embrionário.

Por fim, a contaminação por formulações à base de glifosato pode causar efeitos ecossistêmicos como alteração no perfil de cobertura vegetal, eutrofização de corpos d’água, apodrecimento de raízes, alteração nos padrões de riqueza e abundância de microrganismos e fortalecimento de agentes patogênicos. Somados, todos esses efeitos podem prejudicar grandemente o meio ambiente e a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Etchegoyen, M. A., Marino, D. J. 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of The Total Environment*, 645, 89-96.

Amado, L., Garcia, L., Ramos, P., Freitas, R., Zafalon, B., Ferreira, R., Yunes, J., Monserrat, J., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total. Environ.* 407, 2115-2123.

Ankley, G. T., Bencic, D. C., Breen, M. S., Collette, T. W., Conolly, R. B., Denslow, N. D., Lazorchak, J. M. 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology*, 92, 168-178.

Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate- based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458-479.

Aparicio, V., Geronimoa, E., Marino, D., Primost, J., Carriquirborde, P., Costa, J., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 866-1873.

Arango, L., Buddrus-Schiemann, K., Opelt, K., Lueders, T., Haesler, F., Schmid, M., Ernst, D.,

- Hartmann, A., 2014. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *Eur. J. Soil Biol.* 63, 41–48.
- Avigliano, L., Alvarez, N., Loughlin, C.M., Rodriguez, E.M., 2014. Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching, and ovarian rematuration in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1879-1884.
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 3.
- Benitez Leite, S., Macchi, M.A., Acosta, M., 2009. Malformaciones congenitas asociadas a agrotoxicos. *Arch. Pediatría Urug.* 80, 237-247
- Campana, H., Pawluk, M.S., Lopez Camelo, J.S., 2010. Births prevalence of 27 selected congenital anomalies in 7 geographic regions of Argentina. *Arch. Argent. Pediatría* 108, 409-417.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., de Menezes, C.C, Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., de Avila, L.A., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 597–602.
- Chang, F.C., Simcik, M.F., Capel, P.D., 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 548–555.
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11, 315-335.
- Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D., Hauptfear, E.A., 2010. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. Chapter 1. In: Nandula VK (ed) *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*. Wiley, New York, pp 1–33. ISBN 978-0470410318.
- Druille, M., Cabello, M.N., García Parisi, P.A., Golluscio, R.A., Omacini, M., 2015. Glyphosate vulnerability explains changes in root-symbionts propagules viability in pampean grasslands. *Agric. Ecosyst. Environ.* 202, 48–55.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64, 319–325.
- Fortes, C., Mastroeni, S., Segatto, M.M., Hohmann, C., Miligi, L., Bakos, L., Bonamigo, R., 2016. Occupational exposure to pesticides with occupational sun exposure increases the risk for cutaneous melanoma. *J. Occup. Environ. Med.* 58, 370–375.
- Funke, T., Healy-Fried, M.L., Han, H., Alberg, D.G., Bartlett, P.A., Schönbrunn, E., 2007. Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. *Biochemist* 46, 13344–13351.
- Gluszczak, L., Loro, V.L., Pretto, A., Moraes, B.S., Raabe, A., Duarte, M.F., da Fonseca, M.B., de Menezes, C.C., Valladao, D.M.D., 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 624–630.
- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. 2015.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione s-transferase inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 681–689.

Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, M., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., Chambon, P., 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120, 2723-2748.

Lopes, F.M., Junior, A.S.V., Corcini, C.D., da Silva, A.C., Guazzelli, V.G., Tavares, G., da Rosa, C.E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 155, 322-326.

Lopez, S.L., Aiassa, D., Benitez Leite, S., Lajmanovich, R., Manas, F., Poletta, G., Sanchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco, A.E., 2012. Pesticides Used in South American GMO-based Agriculture: a Review of Their Effects on Humans and Animal Models. Elsevier.

Lopez, S.L., Carrasco, A.E., 1992. Retinoic acid induces changes in the localization of homeobox proteins in the antero-posterior axis of *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.* 36, 153-164.

Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932-937.

Menendez-Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., Afonso, M.D., Salibian, A., 2012. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6-9.

Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., Morsch, V.M., 2011. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 665-671.

Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781-787.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., Lopez, S.L., Carrasco, A.E., 2010. Glyphosate- based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1586-1595.

Perez, G.L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodriguez, P., Vera, M.S., Do Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study. *Ecol. Appl.* 17, 2310-2322.

Peruzzo, P., Porta, A., Ronco, A., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61-66.

Pignati, W.A., Lima, F.A.N.D.S., Lara, S.S.D., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.D.C., Pignatti, M.G., 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciencia & saude coletiva*, 22, 3281-3293.

Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A., Siroski, P.A., 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 852-859.

Priestman, M.A., Funke, T., Singh, I.M., Crupper, S.S., Schönbrunn, E., 2005. 5- Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett.* 579, 728-732.

Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618-627.

Resolução CONAMA Nº 357/2005 - “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.”. - Data da legislação: 17/03/2005 - Publicação DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G.E., 2005. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 113, 716-720.

Ronco, A., Marino, D., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C., 2016. Water quality of the main tributaries of the Parana Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.* 188, 458.

Rosenbaum, K.K., Miller, G.L., Kremer, R.J., Bradley, K.W., 2014. Interactions between glyphosate, Fusarium infection of common water hemp (*Amaranthus rudis*), and soil microbial abundance and diversity in soil collections from Missouri. *Weed Sci.* 62, 71–82.

Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745.

Saldarriaga, W., 2010. Epidemiological surveillance of cyclopia in the Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia 2004e2008. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 61, 12-17.

Sánchez, J.A.A., Junior, A.S.V., Corcini, C.D., da Silva, J.C., Primel, E.G., Caldas, S., Martins, C. D.M.G., 2017. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, 177, 200-210.

Schafer, J.R., Hallett, S.G., Johnson, W.G., 2014. Rhizospheremic microbial community dynamics in glyphosate-treated susceptible and resistant biotypes of giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Sci.* 62, 370–381.

Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquat. Toxicol.* 89, 232–241.

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol.* 59, 129–136.

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129-136.

Tzaskos, D., Marcovicz, C., Dias, N., Rosso, N., 2012. Development of sampling for quantification of glyphosate in natural waters. *Cienc. Agrotecnol.* 36, 399-405.

Uren Webster, T.M., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271-1279.

Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G.L., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., 2010. New evidences of Roundup® (a glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicol.* 19, 710–721.

Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C., Stocco, D.M., 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 108, 769-776.

Yamada, T., Kremer, R.J., de Camargo e Castro, P.R., Wood, B.W., 2009. Glyphosate interactions with

physiology, nutrition, and diseases of plants: threat to agricultural sustainability? *Eur. J. Agron.* 31, 111–113.

Zebal, Y.D., Lansini, L.R., Costa, P.G., Roza, M., Bianchini, A., Robaldo, R.B., 2018. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere*, 196, 260-269.

Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira Jr., R.S., Constantin, J., 2010. Glyphosate affects microorganisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *J. Appl. Microbiol.* 110, 118–127.

## AVALIAÇÃO DE LINGUIÇA TOSCANA ADICIONADA DE INULINA COMO SUBSTITUTO DA GORDURA E INGREDIENTE FUNCIONAL PREBIÓTICO

### **Fabiane Ferreira dos Santos**

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química, Departamento de Engenharia Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

### **Rosires Deliza**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Análise Sensorial e Instrumental, Guaratiba, RJ, Brasil.

### **Simone Pereira Mathias**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Seropédica, RJ, Brasil.

**RESUMO** – Atualmente a busca por alimentos de rápido e fácil preparo, contribui para que as indústrias e pesquisadores invistam no desenvolvimento de novos produtos que atendam a essa demanda e ofereçam benefícios à saúde do consumidor. Dentre os alimentos que não exigem muito tempo para o preparo, a linguiça merece destaque, em contrapartida por conter concentração elevada de gordura (30%), o consumo demasiado desse produto pode ser prejudicial à saúde humana. Estudos têm demonstrado a possibilidade de substituição da gordura, por ingredientes funcionais que possam contribuir para a saúde e o bem-estar dos consumidores. O presente trabalho teve como objetivo elaborar linguiças toscanas com diferentes percentuais de gordura, adicionadas

de inulina, em concentração capaz de garantir a funcionalidade do alimento. O produto foi submetido às análises da composição centesimal e estas demonstraram que houve diferença significativa entre as formulações quanto ao teor de umidade, lipídios e valor energético. As análises físicas comprovaram diferença entre os dados das análises de rendimento de cocção e porcentagem de encolhimento ratificando que a inulina contribuiu para uma maior retenção de água no produto. Assim, as linguiças desenvolvidas e analisadas neste experimento podem ser consideradas como alimentos funcionais e *light* contribuindo para uma dieta mais saudável.

**PALAVRAS-CHAVE:** embutido cárneo, produtos saudáveis, frutanos, consumidor, desempenho nutricional

**ABSTRACT** – Nowadays, the search for fast and easy-to-prepare foods helps industries and researchers to invest in the development of new products that meet this demand and offer benefits to consumers' health. Among the foods that do not require a lot of time to prepare, sausage is worth mentioning, in contrast with a high fat content (30%), excessive consumption of this product may be harmful to human health. Studies have shown the possibility of replacing fat with functional ingredients that may contribute to the health and well-being of consumers. The

present work had as objective to elaborate tuscan sausages with different percentages of fat, added of inulin, in concentration able to guarantee the functionality of the food. The product was submitted to analyzes of the centesimal composition and these showed that there was a significant difference between the formulations regarding the moisture content, lipids and energy value. The physical analyzes showed a difference between the data of the cooking yield analysis and percentage of shrinkage, confirming that inulin contributed to a higher retention of water in the product. Thus, the sausages developed and analyzed in this experiment can be considered as functional and light foods, contributing to a healthier diet.

**KEYWORDS:** flesh embedded, healthy products, fructans, consumer, nutritional performance

## 1 | INTRODUÇÃO

A carne é um dos produtos mais consumidos no mundo representando uma excelente fonte de proteína de importância para o homem na sua dieta alimentar, devido a grande variedade de técnicas de preparo a que, pode ser submetida e ao seu sabor inigualável (DIAS et al., 2006). Com a industrialização da carne, surgiu uma alternativa para o aproveitamento dos cortes menos nobres, aumentando o lucro dos abatedouros. A diversificação da oferta inclui um grande número de produtos, como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas e salames, entre outros. Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada aos alimentos com menor tempo de preparo, preço acessível, sabor agradável, boa qualidade e também com menor teor de gordura (COSTA, 2004).

O mercado de embutidos cárneos vem apresentando significativa expansão e alta competitividade, pois tais produtos fazem parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros. No Brasil, a linguiça é um dos embutidos cárneos mais produzidos, com baixo custo, provavelmente porque sua elaboração, além de não exigir tecnologia sofisticada, utiliza poucos equipamentos (DIAS et al., 2006).

Os embutidos mais consumidos pelos brasileiros são a linguiça e a salsicha, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o consumo da linguiça aumentou de 38,89% em 1999 para 50,9% em 2009, um aumento de quase 12% em 10 anos (IBGE, 2009).

A linguiça suína foi a grande campeã de vendas entre os embutidos derivados de carne suína em 2009, segundo relatório anual da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. O produto representou 24% das vendas de toda a aquisição domiciliar de carne suína. O resultado é inferior apenas ao da carne suína “in natura”, que ficou com 37% das vendas, a salsicha 12%, seguida da mortadela 8%, presunto 5%, toucinho e banha 4% cada e salame 2% (ABIPECS, 2010).

Contudo, os produtos cárneos têm elevados níveis de gordura, mas, oferecem grandes oportunidades para redução calórica por meio da elaboração de novas formulações, utilizando substitutos da mesma (KEETON, 1994).

A gordura é um elemento de grande importância na alimentação humana por suas propriedades nutricionais funcionais e sensoriais. É vital para o metabolismo, pois fornece ácidos graxos essenciais, transporte de vitaminas lipossolúveis, contribui para manutenção da temperatura corporal, reserva de energia e reprodução. Apesar de sua importância na saúde, estudos recentes têm demonstrado existir uma alta correlação entre o excesso de gordura na dieta e os riscos de doenças cardiovasculares, quando associados ao elevado teor de colesterol sanguíneo e à incidência de câncer, diabetes e diminuição da expectativa de vida. Esses fatores têm levado os consumidores a serem cada vez mais cuidadosos com sua saúde, modificando seus hábitos alimentares e reduzindo o consumo de gordura (VIANA et al., 2003).

O papel cada vez mais influente da indústria de alimentos sobre a dieta e estilo de vida da população vem acompanhado do desafio de atender a demanda dos consumidores por produtos que sejam saborosos, visualmente atrativos e que, ao mesmo tempo, visem à saúde e o bem-estar. Entre esses alimentos estão aqueles que podem ser denominados funcionais por resultarem em benefícios clínicos ou de saúde comprovada, além dos efeitos nutricionais conhecidos (SAAD et al., 2011).

Esta redução nos produtos cárneos, apesar de ser uma exigência do mundo moderno, apresenta dificuldades que se refletem na aparência, sabor e textura do produto. Os fabricantes têm introduzido diversas modificações buscando atenuar os efeitos indesejáveis consequentes da redução do nível de gordura. Estas modificações incluem, além da seleção dos ingredientes, o uso de ingredientes não cárneos que podem auxiliar na textura e principalmente aumentar a habilidade de ligar água. Nesta busca, a inulina tem sido utilizada com grande sucesso no aumento do rendimento, redução de custo da formulação, melhoria da textura além do benefício para a saúde do consumidor. A tendência nutricional das últimas décadas preconiza uma alimentação saudável, com muita fibra e baixa ingestão de gordura e colesterol (SHIMOKOMAKI, 2006; VAZ, 2005).

Frutanos tipo inulina são utilizados como ingredientes no desenvolvimento de novos produtos não apenas por suas propriedades nutricionais, mas também devido a razões tecnológicas (TÁRREGA & COSTELL, 2006). A inulina pode ser utilizada como substituto de gordura em alimentos, pois possui a capacidade de promover na boca uma sensação tátil oral semelhante à da gordura. Seu maior peso molecular quando comparado ao das oligofrutoses torna-a menos solúvel e com habilidade de formar microcristais quando misturada à água. Esses microcristais não são percebidos na boca, mas interagem para formar uma textura finamente cremosa (FRANCK, 2002).

A redução do teor de gordura e a adição de ingredientes funcionais em embutidos cárneos que são largamente consumidos apresentam-se como tendência no desenvolvimento de produtos mais saudáveis para a indústria de alimentos. Deste

modo, o presente trabalho teve como finalidade a elaboração, avaliação físico-química e física de lingüiça Toscana adicionada de inulina como ingrediente funcional prebiótico e substituto de gordura nas formulações tradicionais do produto.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foi utilizada como matéria prima a carne suína proveniente de machos adultos da raça Landrace, com peso médio de 90 kg, abatidos no Matadouro de pequenos e médios animais e doados pelo Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Elaboração da lingüiça

Foram elaborados seis tratamentos e a formulação utilizada no processamento da lingüiça Toscana com e sem adição de inulina, encontram-se descritas na Tabela 1. As lingüiças foram processadas na Planta Piloto de Processamento de Carnes da UFRRJ. Os aditivos foram fornecidos pela empresa Ibrac® e a inulina Orafti® GR, fornecida pela Beneo®.

Formulação	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Água	3	3	3	3	3	3
Sal	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Condimento lingüiça Toscana Ibrac®	2	2	2	2	2	2
Corante carmim	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cura Ibrac®	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Polifosfato de sódio	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Realcibrac®	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Eritorbato de sódio	1	1	1	1	1	1
Inulina Beneo Orafti®	--	3	3	3	3	--
Gordura	30	22,5	15	7,5	--	--
Carne suína magra	61,09	65,59	73,09	80,59	88,09	91,09
Total	100	100	100	100	100	100

Tabela 01. Tratamentos realizados e suas respectivas formulações (quantidades em percentual).

<sup>(1)</sup> **T1** controle com 100% de gordura (30% permitido pela legislação), **T2** com 25% de redução de gordura, **T3** com 50% de redução, **T4** com 75% de redução, **T5** 100% de redução (produto sem gordura e com inulina) **T6** (lingüiça sem gordura e sem inulina).

Neste trabalho, seis amostras de lingüiça suína foram formuladas e as variáveis referidas foram a redução de gordura e adição de inulina. O primeiro tratamento T1 representa a formulação padrão, com gordura suína (30%) e sem adição de inulina, o T2 foi formulado com 22,5% de toucinho suíno, o T3 com 15%, o T4 com 7,5% e o T5 com 0% de gordura, todos esses tratamentos receberam 3g de inulina para cada 100g

de produto, caracterizando-o como produto funcional e o sexto tratamento não teve adição de gordura nem de inulina.

Os ingredientes foram adequadamente pesados em balança analítica para a obtenção de cada formulação. A carne suína e o toucinho foram previamente moídos e separados em seis porções de acordo com cada tratamento. Posteriormente os condimentos foram adicionados e misturados à massa cárnea que em seguida passou pelo processo de cura por 6 horas, em temperatura controlada na câmara fria. Em seguida, fez-se o embutimento em tripa natural suína e o produto foi embalado a vácuo e estocado em câmara fria com temperatura controlada de 5°C.

## **3 | ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS**

### **3.1 Composição centesimal**

As avaliações físico-químicas de teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos foram realizadas em triplicatas, seguindo a metodologia da AOAC (2005). O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, com secagem em estufa a 105°C, utilizando 10g de amostra. As cinzas foram determinadas pelo método gravimétrico, após a incineração da matéria orgânica e inorgânica volátil através da incineração da amostra em forno mufla a 550°C. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Kjeldahl, que se baseia na determinação do nitrogênio total e utilizando fator de 6,25 para conversão em proteínas. Já determinação de lipídios foi realizada pelo método de extração Soxhlet, a metodologia foi baseada na solubilidade dos lipídios, que foram extraídos em solvente apropriado (éter de petróleo), utilizando 3g de amostra seca.

### **3.2 Análises físicas**

#### *3.2.1 Rendimento de cocção*

A avaliação do percentual de rendimento de cocção nas linguiças foi calculada pela diferença entre o peso da amostra cozida e o peso da amostra crua, de acordo com Berry (1997).

#### *3.2.2 Porcentagem de encolhimento*

A porcentagem de encolhimento foi determinada segundo Berry (1997), através da diferença na medição do diâmetro da amostra crua e da amostra cozida.

### **3.3 Análises microbiológicas**

Para garantir a segurança microbiológica das amostras, foi realizada a contagem de Coliformes à 45°C, estafilococos coagulase positiva, clostrídios sulfito redutores a

46°C e pesquisa de *Salmonella* spp., conforme metodologia proposta pela American Public Health Association (APHA, 2001). As análises microbiológicas foram realizadas tendo como orientação a resolução RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e determina a pesquisa dos microrganismos acima citados em produtos cárneos (BRASIL, 2001).

### 3.4 Análise sensorial

A análise sensorial pode ser definida como uma técnica científica utilizada para evocar, medir e analisar as características dos alimentos como são percebidas pelos órgãos dos sentidos (ABNT, 1993). Para a obtenção de informações importantes, que refletem o quanto os consumidores gostaram ou não de um determinado produto é realizado o teste de aceitação, que é muito utilizado no desenvolvimento de novos produtos, no controle de qualidade e para comparar produtos concorrentes. Entre os métodos sensoriais existentes para medir a aceitação e preferência de um grupo de consumidores o que utiliza escala hedônica de nove pontos é o mais aplicado, devido à simplicidade, confiabilidade e validade de seus resultados (STONE; SIDEL, 2004).

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para a realização do teste foram recrutados 94 consumidores de produtos cárneos, sem restrições quanto à idade, gênero e renda, os quais avaliaram as formulações de linguiça com baixo teor de gordura e a controle. O teste foi realizado em cabines individuais iluminadas com lâmpadas fluorescentes. As linguiças foram fervidas em água por 10 minutos e em seguida assadas em forno convencional à 235°C ± 5°C por 5 minutos (cada lado). As linguiças foram fatiadas, aquecidas em forno de microondas por 10 segundos e servidas monadicamente aos participantes em pratos plásticos brancos descartáveis codificados com números de três dígitos e seguindo ordem de apresentação aleatória. Foi oferecida água mineral à temperatura ambiente e biscoito tipo água e sal visando limpar a boca entre a avaliação das amostras. Os consumidores foram convidados a avaliar as amostras usando escala hedônica de nove pontos variando desde 1: desgostei extremamente, 5: nem gostei /nem desgostei até 9: gostei extremamente (MEILGAARD et al., 1999).

### 3.5 Análise estatística

As análises foram feitas em triplicata e os dados expressos como média ± desvio padrão (DP). A análise estatística dos dados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey ao nível de significância de 5 % ( $p \leq 0,05$ ) para a comparação das médias. Os resultados foram processados utilizando o software XLSTAT (2014).

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação físico-química

Os resultados obtidos através análise de variância (anova) para a composição centesimal das amostras de linguiça Toscana adicionadas de inulina são demonstrados na Tabela 2.

Composição Centesimal	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Umidade	57,64a ± 0,04	58,38b ± 0,03	60,88c ± 0,26	68,24d ± 0,28	70,08e ± 0,03	70,06e ± 0,03
Cinzas	3,92a ± 0,45	3,48a ± 0,10	3,76a ± 0,04	3,43a ± 0,04	3,63a ± 0,01	3,43a ± 0,06
Proteína	16,43a ± 1,44	16,61a ± 0,63	16,14a ± 0,43	15,07a ± 0,06	16,59a ± 0,93	17,07a ± 0,63
Lipídeos	8,44a ± 0,42	6,44b ± 0,41	4,54c ± 0,14	3,19d ± 0,26	2,73d ± 0,22	2,73d ± 0,12
Carboidratos	13,58a ± 1,37	15,09a ± 0,65	14,67a ± 0,06	9,07b ± 0,55	6,96b ± 0,93	6,70b ± 0,78
Valor Energético	196,02a ± 4,06	184,79b ± 2,54	164,12c ± 0,50	125,51d ± 0,43	118,80e ± 1,13	119,67e ± 0,60

**Tabela 02.** Avaliação da composição centesimal das amostras de linguiça Toscana adicionada de inulina.

<sup>(1)</sup> **T1** controle com 100% de gordura (30% permitido pela legislação), **T2** com 25% de redução de gordura, **T3** com 50% de redução, **T4** com 75% de redução, **T5** 100% de redução (produto sem gordura e com inulina) **T6** (linguiça sem gordura e sem inulina). <sup>(2)</sup> Resultados expressos como média ± desvio-padrão. <sup>(3)</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Tabela 02, os valores de umidade apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao tratamento controle. As outras cinco formulações apresentaram maiores valores de umidade, fato provavelmente conferido a capacidade da inulina em reter uma maior concentração de água. Ainda assim, os resultados apresentados em todas as formulações estavam dentro dos padrões físico-químicos estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiças, que estabelece um máximo de 70% de umidade para linguiças frescas (BRASIL, 2000).

Os valores encontrados para todos os tratamentos em relação ao resíduo mineral fixo foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ). Zanardi et al., (2002) encontraram valores de cinzas de 3,7% em embutidos frescos suínos. Estes valores se aproximam do encontrado nas seis formulações do presente trabalho. Estes resultados também foram próximos aos encontrados por Aleson-Carbonell et al., (2004) que estudaram os efeitos funcionais e sensoriais em embutido fresco enriquecido com fibra de laranja. Ao contrário dos resultados encontrados por Silva (2010), em embutidos de peito de

peru adicionados de diferentes concentrações de inulina, os teores de cinzas foram estatisticamente maiores para as amostras B – 1,5% de inulina (3,65) e C - 3% de inulina (3,88) quando comparadas as amostras A – 0,5% inulina (3,22) e amostra controle (3,02), porém essa diferença não foi atribuída à incorporação de inulina nas formulações, e sim a uma possível fixação de minerais voláteis.

Em relação aos teores de proteína pode-se observar que não houve variação significativa entre os tratamentos com redução de gordura e o controle. Os resultados encontrados neste trabalho atendem ao padrão de identidade e qualidade de linguiças, que estabelece um mínimo de 12% de proteínas para linguiças frescas (BRASIL, 2000). Esses resultados se assemelham aos encontrados por Silva (2010) em embutidos de peito de peru, onde as concentrações de inulina (A - 0,5%; B - 1,5% e C - 3%) adicionadas à massa cárnea, não modificaram os teores de proteína que se mantiveram em torno de 20% para todos os tratamentos.

Em relação à porcentagem média de lipídeos, foi observado que o tratamento controle, elaborado com 30% de gordura, apresentou diferença significativa em relação aos demais produzidos, visto que intencionalmente houve a substituição da gordura suína pela inulina. Contudo todos os tratamentos atendem ao padrão de identidade e qualidade de linguiças frescas, que estabelece teor máximo de 30% de gordura para estas (BRASIL, 2000). Resultado semelhante foi encontrado por Filho et al., (2012) na produção de hambúrguer bovino adicionado de inulina como substituto de gordura, estes produtos apresentaram valores para o tratamento controle (sem inulina) de 5,07% enquanto que para os tratamentos com 50% de redução 2,41% e 100% de redução 1,54%. No trabalho feito por Silva (2010), não houve variação no teor de gordura adicionado ao produto, somente as concentrações de inulina foram variadas de acordo com cada tratamento, portanto, os teores de lipídeos não diferiram significativamente do controle. Reiterando os resultados encontrados acima no estudo realizado por Oliveira et al (2011), com adição de oligossacarídeos em mortadelas os níveis de gordura obtidos nos produtos finais foram de 14,15% para o controle (C), e 14,79% para a mortadela comercial não sendo encontrada diferença significativa para estes resultados e 9,04% para o tratamento com redução de gordura (C1) e 9,39% para o tratamento com redução de gordura e adição de inulina (T2) também não apresentando diferença estatística significativa quando comparado ao C1. Porém só houve diferença significativa do tratamento com redução de gordura e adição de inulina quando comparado ao tratamento C sem redução de gordura e a mortadela comercial.

O valor calórico de todos os tratamentos que tiveram seus índices de gordura reduzido diferiu significativamente da amostra controle, com maior porcentagem (30%). Esse resultado se deve principalmente aos valores encontrados para os teores de lipídeos, pois nestas análises os seis tratamentos também diferiram entre si ( $P < 0,05$ ). A porcentagem de gordura é o que mais influencia os valores calóricos, estando de acordo com o esperado, embora a proteína também exerça influência no referido

valor. O cálculo do valor calórico nesses tratamentos baseou-se principalmente na quantidade de gordura e de proteína existente nos produtos. De acordo com Selgas et al., (2005) na produção de mortadela adicionada de inulina como ingrediente funcional houve redução do valor calórico à medida que o nível de gordura diminuiu, resultando em 25% menos caloria do que nas mortadelas comerciais. Neste experimento, os valores calóricos das linguiças do tratamento três apresentaram uma redução de 50% e uma diferença maior que 30 kcal por 100g em relação ao controle.

#### 4.2 Avaliação das propriedades físicas

De acordo com a Tabela 03, pode-se observar que a formulação T1, sem adição de inulina, apresentou o menor rendimento (57,81%). Já as formulações adicionadas de inulina apresentaram rendimentos maiores, não diferindo estatisticamente entre si. A sexta formulação apresentou rendimento menor do que os tratamentos adicionados de inulina, porém maior rendimento quando comparado ao controle, provavelmente pelo fato da formulação T1 conter 30% de gordura e o processo de cocção contribuir para a perda da mesma. Portanto comprova que a inulina contribuiu para uma maior retenção de água. Isto se dá devido a estrutura química hidroxilada da fibra inulina.

Tratamentos	Rendimento de Cocção (%)	Encolhimento (%)
T1	57,81a ± 0,93	21,62a ± 1,56
T2	59,73a ± 0,87	13,14b ± 2,01
T3	61,21a ± 1,21	12,60b ± 0,84
T4	61,27a ± 1,38	9,34c ± 1,63
T5	61,43a ± 1,36	8,63c ± 1,79
T6	58,74a ± 0,84	8,64c ± 1,80

Tabela 03. Resultado da avaliação das propriedades físicas nas diferentes formulações de linguiça Toscana

<sup>(1)</sup> Resultados expressos como média ± desvio-padrão. <sup>(2)</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

De acordo com experimento realizado em salsichas por Derek et al., (2014) a perda de água durante o cozimento foi significativamente maior nas salsichas com maiores índices de gordura na formulação quando comparadas às que tiveram gordura substituída por inulina. Uma avaliação de superfície de resposta demonstrou que a perda durante o processo de cocção pôde ser reduzida à metade com pequenas substituições de gordura pela inulina (redução de 18,7 para 16,3%). Reforçando a capacidade desta de formar redes de interação com microcristais que contribuem para reter quantidade substancial de água (BOT et al., 2004).

Foram observados menores valores de encolhimento na cocção ( $p < 0,05$ ) nas formulações adicionadas de inulina (T2, T3, T4 e T5), demonstrando que a substituição de gordura pela inulina nas formulações, diminuiu o percentual de retração do produto contribuindo para um maior rendimento. O sexto tratamento apresentou resultado

satisfatório já que foi semelhante à porcentagem de encolhimento dos tratamentos adicionados de inulina.

### 4.3 Avaliação microbiológica

Conforme podemos observar na Tabela 04 todas as amostras avaliadas alcançaram os padrões de qualidade microbiológica para produtos cárneos, apresentando-se com contagem dentro dos parâmetros legais vigentes, de acordo com a RDC n.º 12 (BRASIL, 2001), estando assim adequadas para consumo humano.

Amostras	Coliformes a 45° C	Estafilococos coagulase Positiva (g)	Clostrídios sulfito redutores 46°C (g)	Presença de <i>Salmonella</i>
T1	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
T2	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
T3	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
T4	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
T5	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
T6	<3,0 est.	<1,0x10 <sup>2</sup> est.	<10 est.	Ausente
Parâmetros da Legislação	5x10 <sup>3</sup> NMP/g	5x10 <sup>3</sup> UFC/g	5x10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência em 25g

Tabela 04. Avaliação microbiológica das amostras de linguiça Toscana controle e adicionadas de inulina.

(<sup>1</sup>) **T1** controle com 100% de gordura (30% permitido pela legislação), **T2** com 25% de redução de gordura, **T3** com 50% de redução, **T4** com 75% de redução, **T5** 100% de redução (produto sem gordura e com inulina) **T6** (linguiça sem gordura e sem inulina). (<sup>2</sup>) est. – resultados estimados. (<sup>3</sup>) UFC - Unidades Formadoras de Colônias; NMP -Número Mais Provável.

### 4.4 Avaliação sensorial

As médias de aceitação são mostradas na Tabela 05, apesar dos valores para média serem próximos houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os consumidores preferiram as formulações T2, T3 e T4, que não diferiram entre si. A formulação T1, T5 e T6 foram menos preferidas pelos participantes.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Aceitação</b>	6,3 <sup>c</sup> ± 1,77	7,1 <sup>a</sup> ± 1,30	6,8 <sup>ab</sup> ± 1,49	6,6 <sup>abc</sup> ± 1,58	6,3 <sup>c</sup> ± 1,38	6,4 <sup>bc</sup> ± 1,45

Tabela 05. Média e desvio padrão da aceitação<sup>§</sup> dos consumidores (n=94) para os produtos avaliados.

(<sup>1</sup>) § avaliada em escala hedônica estruturada variando de 1 = desgostei extremamente até 9 = gostei extremamente. (<sup>2</sup>) **T1** controle (30% de gordura), **T2: 22,5% de gordura** (25% de redução de gordura), **T3:** 15% de gordura (50% de redução), **T4:** 7,5% de gordura (75% de redução), **T5:** 100% de redução (produto sem gordura e com inulina), **T6:** linguiça sem gordura e sem inulina. (<sup>3</sup>) Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Apresença da gordura nos alimentos é responsável por aumentar a cremosidade e suavidade, facilitar a mastigação, melhorar o sabor e a textura, interferindo na aceitação do produto. As formulações T5 e T6 tiveram 100% de redução de gordura e, apesar das características atribuídas à inulina, a adição ao quinto tratamento não contribuiu para que este fosse bem aceito, comprovando que para a fabricação de linguiça toscana a redução completa de gordura não é indicada ainda que adicionada de inulina. As linguiças do primeiro tratamento (T1) não sofreram redução de gordura e não foram adicionadas de inulina, foram formuladas de forma padrão como as comumente comercializadas no mercado, porém também não foram aceitas pelos provadores, foram atribuídas a este tratamento características como aroma de ranço, gordurosa e salgada demonstrando uma preferência dos consumidores por produtos mais saudáveis e explicando a baixa aceitabilidade já que foram conferidos a este tratamento, as menores médias para os parâmetros analisados. Os resultados do teste de preferência revelam a tendência dos provadores a preferirem formulações contendo menor percentual de gordura, já que a formulação do segundo tratamento que continha redução de 25% de gordura na sua composição foi a que melhor atendeu as propriedades sensoriais desejadas.

## 5 | CONCLUSÕES

As linguiças formuladas com adição de inulina e redução de gordura atenderam às necessidades nutricionais do produto e podem ser classificadas como alimentos de baixo teor de gordura de acordo com a legislação vigente. Na análise física comprovou-se que a adição de inulina melhorou a retenção de água nas linguiças, proporcionando um maior rendimento e menor porcentagem de encolhimento, quando comparadas com uma linguiça de formulação padrão. A linguiça controle que possui formulação semelhante às vendidas comercialmente não foi bem aceita pelos consumidores, assim como os tratamentos onde houve redução total da gordura, o produto que teve a maior aceitabilidade foi o tratamento com redução de 25% de gordura e adição de inulina na sua composição, podendo ser caracterizado como um produto *light* e funcional. Portanto, a adição de inulina foi eficaz, sendo uma alternativa para a redução de gordura em linguiça suína frescal, sem prejudicar suas características físico-químicas e físicas, além de fornecer um produto que pode proporcionar benefícios para saúde do consumidor.

## 6 | AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa e ao Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas (LAAB-UFRRJ) pelo auxílio com a infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Carne suína brasileira reconhecidamente a mais saborosa**: relatório do ano de 2009. São Paulo: Abipecs, 2010. 9p. Disponível em <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 10 setembros 2013.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas – NBR 12806. Rio de Janeiro: ABNT, p.8, 1993.

ALESON-CARBONELL, L.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J.A.; KURI, V. **Functional and sensory effects of fibre-rich ingredients on breakfast fresh sausages manufacture**. Food Science and Technology International, v.11, n. 2, p. 89-97, 2005.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18th.Edition. Maryland, USA, 2005.

APHA – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Edited by: Frances Pouch, 4<sup>a</sup> edition, 2001.

BERRY, B.W. **Low fat level effects on sensory, shear, cooking and chemical properties of ground beef patties**. Journal of Food Science, v.57, n.3, p.537-540, 1997.

BOT, A.; ERLE, U.; VREEKER, R.; AGTEROF, W.G.M. **Influence of crystallisation conditions on the large deformation rheology of inulin gels**. Food Hydrocolloids, v.18, n.4, p.547–556, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 4, de 31 de Março de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- **RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

DIAS, R.P.; DUARTE, T.F.; GARRUTI, D.S.; ZAPATA, J.E.F.; SANTOS, C.F. **Aproveitamento da carne caprina de animais velhos, de descarte, na produção de linguiça frescal sem adição de gordura suína**. Circular técnica 33. Embrapa Caprinos. Sobral – CE, 2006.

FILHO, R.B.; OLIVEIRA, C.P.; GOMES, Q.O. **Elaboração de hambúrguer bovino adicionado de inulina como ingrediente funcional prebiótico e substituto de gordura**. Revista Verde, v. 7, n. 4, p. 33-37, 2012.

FRANCK, A. **Technological functionality of inulin and oligofructose**. British Journal of Nutrition, London, v. 87, n. 2, p. 287-291, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares**: relatório do ano de 2008-2009. Rio de Janeiro: IBGE 2010. 222p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 de agosto de 2013.

KEENAN, D.F.; RESCONI, V.C.; KERRY, J.P.; HAMIL, R.M. **Modelling the influence of inulin as a fat substitute in comminuted meat products on their physico-chemical characteristics and eating quality using a mixture design approach**. Meat Science, v. 96, n.3, p. 1384–1394, 2014.

KEETON, J.T. **Low-fat meat products – Technological problems with processing**. Meat Science, Oxford, v.36, p.261-276, 1994.

OLIVEIRA, T.L.C.; SANTOS, B.A.; CRUZ, A.G.; MESSIAS, V.C.; FARIA, J.A.; POLLONIO, M.A.R. **Efeito da adição de oligossacarídeos não digeríveis em mortadela: avaliação de cor e perfil de textura**. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, Sessão 12-Processamento de

Carnes e Produtos Cárneos, 2011.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Editora Varela, Cap.1, p.23-451, 2011.

SELGAS, M.D.; CÁCERES, E.; GARCIA, M.L. **Long-chain soluble dietary fibre as functional ingredient in cooked meat sausages**. Food Science and Technology International, v.11, n.1, p.41-47, 2005.

SILVA, F. B. **Efeitos da inulina nas propriedades físico-químicas, sensoriais e de textura de embutido de peito de peru defumado**. 2010. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

STONE, H., SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. Londres: Academic Press. p.311, 2004.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. **Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts**. International Dairy Journal, Edmonton, v. 16, n. 9, p. 1104-1112, 2006.

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. **Lipid and colour stability of Mylano-type sausages: effect of packing conditions**. Meat Science, v. 61, p. 7-14, 2002.

## QUALIDADE DA DIETA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

### **Olívia Farias dos Santos**

Graduanda do curso de Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

### **Cecília Fischer Fernandes**

Graduanda do curso de Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

### **Cristielle Aguzzi Cougo de Leon**

Mestre em Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

### **Fernanda Vighi Dobke**

Mestranda em Nutrição pela Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

### **Sandra Costa Valle**

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

### **Renata Torres Abib Bertacco**

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade da dieta de crianças e adolescentes com o Transtorno do Espectro Autista (TEA) e relaciona-la com estado nutricional, sexo e acompanhamento nutricional. O estudo foi realizado com crianças e adolescentes alunos de um centro de atendimento especializado. Para a análise, foi utilizado o Índice de Qualidade

da Dieta-Revisado para a população brasileira (IQD-R), baseado em três recordatórios 24 horas. Os dados antropométricos foram obtidos por meio de anamnese nutricional. Foram analisados 81 indivíduos com TEA. A média do IQD-R foi de  $50,62 \pm 10,43$  pontos para crianças e  $53,28 \pm 7,41$  pontos para os adolescentes, sem diferença estatística significativa ( $P=0,1913$ ). Houve uma tendência estatística quando correlacionado adolescentes que realizam acompanhamento nutricional ( $P=0,0580$ ). Em relação ao consumo de grupos de alimentos, 93% das crianças e 80% dos adolescentes não consomem cereais integrais. Aproximadamente um quarto da amostra não consome frutas e vegetais. Quanto ao grupo dos leites e derivados, 26,83% e 2,5% das crianças e adolescentes, respectivamente, consumiram este grupo. No que se refere ao item das gorduras sólidas e açúcar de adição, apenas uma criança consumiu dentro do recomendado. Crianças e adolescentes com TEA, neste estudo, apresentaram baixa qualidade da dieta, baixo consumo de cereais integrais, frutas, vegetais e leite e derivados e alto consumo de gorduras e açúcares de adição. Além disso, o IQD-R não se correlacionou com estado nutricional nem sexo. Em adolescentes, houve uma tendência de melhor qualidade da dieta naqueles que relataram acompanhamento nutricional.

**PALAVRAS- CHAVE:** Autismo; Qualidade da

dieta; Criança; Adolescente.

**ABSTRACT:** The aim of this study was to analyze the quality of the diet of children and adolescents with Autism Spectrum Disorder (ASD) and to associate to nutritional status, sex and nutritional monitoring. It was enrolled with ASD children and adolescents students from a specialized educational center. The revised version of the Healthy Eating Index for the Brazilian population (HEI) was used, based on three-day food records. Sociodemographic and anthropometric data were obtained through nutritional anamnesis. A total of 81 ASD individuals were analyzed. The mean HEI was  $50.62 \pm 10.43$  points for children and  $53.28 \pm 7.41$  points for adolescents, with no statistically significant difference ( $P = 0.1913$ ). There was a statistical trend between The Revised Brazilian Healthy Eating Index and nutritional monitoring in adolescents ( $P = 0.0580$ ). The most children (93%) and adolescents (80%) of did not consume whole grains and approximately a quarter of the sample does not consume fruits and vegetables. Only 26.83% and 2.5% of children and adolescents, respectively, consumed dairy group. As for the item of solid fats and added sugar, only one child consumed within the recommended. In this study, ASD individuals present low quality of diet, low intakes of whole grains, fruits, vegetables and dairy products and high consumption of fats and added sugars. In addition, The Revised Brazilian Healthy Eating Index did not correlate with nutritional status or sex. In adolescents, there was a trend of better diet quality in those who had nutritional monitoring.

**KEY WORDS:** Autistic Disorder; Diet; Child; Adolescent.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracteriza-se pelo déficit na comunicação e na interação social e pela presença de padrões comportamentais restritos e repetitivos (DSM-V). As causas do TEA ainda não são totalmente conhecidas e o diagnóstico é realizado conforme quadro clínico, uma vez que não possui um marcador biológico (Mello, 2016). A prevalência estimada desse transtorno é de um a cada 68 crianças (CDC, 2010). Essas crianças apresentam uma sensibilidade sensorial muito apurada em relação aos alimentos e, por isso, algumas características sensoriais, tais como a textura e a temperatura, podem influenciar na escolha do alimento, muitas vezes levando à seletividade alimentar, prejudicando assim a qualidade da dieta (Herndon *et al*, 2008; Cermak *et al*, 2010). Além da seletividade, esse grupo pode ter uma maior predisposição à desnutrição e obesidade em função da absorção inadequada de nutrientes e do consumo elevado em energia (Kawicka, 2013). Com isso, torna-se necessário o acompanhamento nutricional, com avaliação do estado nutricional e da qualidade do consumo alimentar desses indivíduos. O Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R), baseado no Guia Alimentar para a População Brasileira de 2006, foi adaptado do Healthy Eating Index (HEI) e é obtido através da média de consumo, e pode ser aplicado em indivíduos de todas as idades. Essa ferramenta

avalia a qualidade da dieta, sem priorizar a quantidade e assim é possível identificar a adequação do consumo de um indivíduo de acordo com as recomendações brasileiras (Previdelli *et al*, 2011). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade da dieta de crianças e adolescentes com o Transtorno do Espectro Autista e analisar sua relação com o estado nutricional, sexo e acompanhamento nutricional.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal descritivo analítico, realizado com crianças e adolescentes de 2 a 19 anos, alunos do Centro de Atendimento ao Autista, Dr. Danilo Rolim de Moura, localizado na cidade de Pelotas, RS. Foram utilizados dados secundários da pesquisa “Avaliação do estado nutricional de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista”, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl) (Nº 22 1.130.227), referente aos alunos assistidos entre março de 2015 a novembro de 2017. Os critérios de inclusão foram dados de indivíduos até 19 anos, cuja anamnese nutricional estivesse completa e possuísse três recordatórios alimentares. A amostra foi dividida em dois grupos: crianças (2 a 9 anos) e adolescentes (10 a 19 anos)<sup>8</sup>. Foram analisadas as seguintes variáveis categóricas: estado nutricional (baixo peso, eutrofia, risco de sobrepeso, sobrepeso e obesidade), segundo o SISVAN, sexo (feminino e masculino) e acompanhamento nutricional (sim e não), obtidas de forma secundária de anamneses nutricionais. Para a obtenção do Índice de Qualidade da Dieta – Revisado (IQD-R) foi analisado o consumo alimentar de cada indivíduo, por meio de três recordatórios alimentares. Desses três, dois eram referentes à alimentação da semana e o terceiro de um dia do final de semana. O IQD-R foi calculado como previamente descrito na literatura (Previdelli *et al*, 2011). Este índice leva em consideração doze itens: nove grupos alimentares (frutas totais; frutas integrais; vegetais totais e leguminosas; vegetais verdes-escuros, alaranjados e leguminosas; cereais totais; cereais integrais; leite e derivados; carnes, ovos e leguminosas; óleos), dois nutrientes (gordura saturada; sódio) e um que contempla a ingestão de gordura sólida, álcool e açúcar de adição. Cada item possui uma pontuação máxima, que varia de acordo com o consumo do indivíduo. Os grupos: frutas totais; frutas integrais; vegetais totais e leguminosas; vegetais verdes-escuros, alaranjados e leguminosas; cereais totais e cereais integrais, podem atingir o máximo de cinco pontos cada um. Os grupos leite e derivados; carnes, ovos e leguminosas; óleos; gordura saturada e sódio podem chegar a 10 pontos cada. Já, a pontuação do item que engloba gordura sólida, álcool e açúcar de adição pode chegar a 20 pontos. Nos itens gordura saturada, sódio e gorduras sólidas, álcool e açúcar de adição, a pontuação é inversamente proporcional ao consumo. Ou seja, se o consumo é ultrapassa o limite determinado pelo índice, a pontuação será zerada nestes itens. A pontuação máxima pode ser de 100 pontos, considerada como uma dieta de alta qualidade (Previdelli *et al*, 2011). Alguns dos grupos deste instrumento foram descritos

mais detalhadamente em função de apresentarem pontuações extremas, tais como frutas integrais; 23 vegetais (vegetais totais e leguminosas + vegetais verdes-escuros, alaranjados e leguminosas); cereais integrais; leite e derivados; gordura sólida, álcool e açúcar de adição). As variáveis categóricas foram descritas como percentuais. O IQDR foi apresentado como média e desvio-padrão. Para correlacionar as variáveis foi utilizada a correlação de Pearson e para a comparação de médias entre grupos, foi utilizado o teste t de student, sendo considerado como nível de significância menor de 5%. Os dados foram analisados num sistema computadorizado, NutriQuanti® (Galante, 2007) e o cálculo do IQD-R foi realizado no software Excel®. As correlações foram feitas no software GraphPadPrism 6.

### 3 | RESULTADOS

Dos 300 alunos avaliados, 105 alunos possuíam três recordatórios 24 horas. Destes, 24 não preencheram os critérios de inclusão, pois três tinham mais que 19 anos e 21 deles estavam com anamnese incompleta. Desta forma, foram incluídos 81 indivíduos com TEA. A caracterização das variáveis deste estudo está na tabela 1. Quanto ao IQD-R, os indivíduos foram analisados conforme faixa etária, divididos em crianças e adolescentes. A média do IQD-R foi de  $50,62 \pm 10,43$  pontos para crianças e  $53,28 \pm 7,41$  pontos para os adolescentes, não havendo uma diferença estatística significativa ( $P=0,1913$ ). As correlações entre as variáveis estão descritas na tabela 2. Foram também analisados quatro grupos alimentares separadamente (frutas integrais; vegetais; cereais integrais e leite e derivados), além do item gordura sólida, álcool e açúcar de adição. Quanto aos grupos alimentares, 93% das crianças e 80% dos adolescentes obtiveram a pontuação mínima (zero pontos) para o grupo dos cereais integrais, o que significa ausência de consumo. Em relação ao consumo de frutas, 26,83% das crianças e 27,5% dos adolescentes também atingiram a pontuação mínima. Já no grupo dos vegetais, 24 esse número foi maior para as crianças, sendo que 31,71% não consumiram esses alimentos. Em relação aos leites e derivados, a situação é contrária, pois 26,83% das crianças consumiram o recomendado deste grupo, atingindo a pontuação máxima. Já os adolescentes consumiram menos leite e derivados, sendo que apenas 2,5% atingiu a pontuação máxima. No item que engloba gordura sólida, álcool e açúcar de adição, apenas uma criança, em toda a amostra, consumiu dentro do recomendado (Tabela 3).

### 4 | DISCUSSÃO

São escassos os estudos que analisaram a qualidade da dieta de indivíduos com TEA. A maior parte dos artigos existentes sobre essa temática utilizou o “Healthy Eating Index (HEI)”, índice utilizado fora do Brasil. Este índice utiliza a mesma pontuação do IQD-R, porém a medida das porções é diferente da utilizada no Brasil (Guenther *et al*,

2013). Os dados referentes à qualidade da dieta realizados no Brasil que utilizaram o mesmo índice deste estudo foram realizados em crianças e adolescentes com desenvolvimento típico. Segundo a POF (2008/2009), um número elevado de crianças e adolescentes estão acima do peso. No ano da pesquisa, 34,8% e 32% de meninos e meninas, respectivamente, de cinco a nove anos, apresentaram excesso de peso. Os adolescentes de 10 a 19 anos apresentaram 21,7% de excesso de peso em meninos e 19,4% em meninas. Na amostra estudada, observou-se uma prevalência maior de excesso de peso em crianças (65,86%) e em adolescentes (80%), o que corrobora com outros estudos, que mostram maior prevalência de sobrepeso e obesidade de indivíduos com TEA comparado com indivíduos de desenvolvimento típico (Castro *et al*, 2017; Criado *et al*, 2017). Esta característica pode ser reflexo da pior qualidade da dieta ingerida e também pelo menor envolvimento destes indivíduos com atividades físicas (Jones *et al*, 2017). O IQD-R médio encontrado no grupo das crianças foi de  $50,62 \pm 10,43$  pontos. Em um estudo realizado na cidade de Pelotas com crianças de até cinco anos com desenvolvimento típico apresentou uma pontuação de 74,4 pontos, sendo considerada pelos autores como uma dieta que necessita ser 25 melhorada (Leal *et al*, 2015). É necessário ressaltar que este estudo utilizou o Índice de Alimentação Saudável (IAS), índice que provém também do HEI. Um estudo realizado na Espanha (Marí-Bauset *et al*, 2017) com crianças com TEA de seis a nove anos, utilizou o HEI, obtendo uma pontuação média de 65,32 pontos. O mesmo ocorreu em um estudo realizado nos EUA (Graf-Myles *et al*, 2013) no qual a média do HEI foi de 61,91 pontos. Em ambos os estudos, foi observado um consumo de leite abaixo do recomendado. No grupo dos adolescentes, a média do IQD-R foi de  $53,28 \pm 7,41$  pontos. Em um estudo realizado em Campinas (Assumpção *et al*, 2012) com 409 adolescentes de 12 a 19 anos, foi encontrado um IQD (Fisberg *et al*, 2004) de 59,7 pontos. Foi analisado cada componente separadamente e encontrando assim pontuações mais baixas no de fruta, verduras e legumes e leite e derivados semelhante ao encontrado neste estudo. O IQD-R teve uma mudança significativa quanto às recomendações dietéticas que sofreram modificações ao longo dos anos, comparado ao IQD. Antes da revisão o grupo de gorduras, álcool e açúcares não era calculado, porém este índice leva em conta colesterol e a variedade da dieta (Volp *et al*, 2010). Em relação ao consumo de verduras, o estudo realizado em Pelotas15 apresenta que 45,7% da população estudada consumiu a quantidade ideal. Valor superior ao encontrado no presente estudo, no qual apenas 7,32% consumiu o recomendado. No estudo realizado na Espanha (Marí-Bauset *et al*, 2017), os autores afirmam como o ambiente e a cultura podem influenciar o padrão alimentar e as características relativas ao peso do indivíduo com o TEA. Por isso a importância da avaliação destes dados, que mostraram uma elevada prevalência de sobrepeso e um índice de qualidade da dieta baixo neste grupo. A partir do conhecimento das características alimentares e nutricionais dos indivíduos com TEA, intervenções nutricionais podem ser realizadas para melhorar e contribuir com a melhor qualidade da dieta destes. O fato do IQD-R não possuir um ponto de corte,

torna-se uma limitação deste estudo, uma vez que foi preciso comparar com as médias de outros estudos, com populações distintas. Além disso, existe um déficit no número de 26 estudos que utilizam a mesma metodologia, dificultando a comparação dos resultados. Por outro lado, este estudo traz um resultado inédito para esta população. Desta forma conclui-se que as crianças e adolescentes com TEA, neste estudo, apresentaram baixa qualidade da dieta, baixo consumo de cereais integrais, frutas e vegetais e alto consumo de gorduras e açúcares de adição. Além disso, o IQD-R não correlacionou-se com estado nutricional, nem sexo. Em adolescentes, houve uma tendência de melhor qualidade da dieta naqueles que fazem acompanhamento nutricional. Mais estudos que analisem a qualidade nutricional da dieta de indivíduos com TEA, bem como pesquisas sobre o gasto energético e absorção de nutrientes nesse grupo devem ser fomentados.

## REFERÊNCIAS

- Assumpção D, Barros MB, Fisberg RM, Carandina L, Goldbaun M, Cesar CL. Qualidade da dieta de adolescentes: estudo de base populacional em Campinas, SP. *Rev Bras Epidemiol.* 2012;15(3):605-16.
- Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Diretoria de Pesquisas Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão; 2010.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Básica. **Vigilância alimentar e nutricional - SISVAN: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2004. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Castro K, Faccioli LS, Baronio D, Gottfried C, Perry IS, Riesgo R. **Body composition of patients with autism spectrum disorder through bioelectrical impedance.** *Nutr Hosp.* 2017; 34(4):875-879.
- Cermak SA, Curtin C, Bandini LG. **Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders.** *J Am Diet Assoc.* 2010 Feb;110(2):238-46.
- Criado KK, Sharp WG, McCracken CE, De Vinck-Baroody O, Dong L, Aman MG. Overweight and obese status in children with autism spectrum disorder and disruptive behavior. *Autism.* 2017 Mar 1. [Epub ahead of print]
- Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years** — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ.* 2014 Mar 28;63(2):1-21.
- Fisberg RM, Slater B, Barros RR, De Lima FD, Cesar CL, Carandina L. Healthy Eating Index: evaluation of adapted version and its applicability. *Rev. Nutr.* 2004; 17(3).
- Galante, AP. **Desenvolvimento e validação de um método computadorizado para avaliação do consumo alimentar, preenchido por indivíduos adultos utilizando a Web. 2007.** Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada)- Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

Graf-Myles J, Farmer C, Thurm A, Rayster C, Kahn P, Soskey L, *et al.* **Dietary Adequacy of Children with Autism Compared to Controls and the Impact of Restricted Diet.** J Dev Behav Pediatr. 2013;34(7):449-59.

Guenther PM, Casayale KO, Kirkpatrick SI, Reedy J, Hiza HA, Kuczynski KJ. **Update of the Healthy Eating Index: HEI-2010.** J Acad Nutr Diet. 2013 Apr; 113(4).

Herdon, AC, DiGuseppi C, Johnson SL, Leiferman J, Reynolds A. **Does Nutritional Intake Differ Between Children with Autism Spectrum Disorders and Children with Typical Development?.** J Autism Dev Disord. 2009, 39: 212–222.

Jones RA, Downing K, Rinehart NJ, Barnett LM, May T, McGillivray JA, *et al.* Physical activity, sedentary behavior and their correlates in children with Autism Spectrum Disorder: A systematic review. PLoS One. 2017 Feb 28. [Epub ahead of print]

Kawicka A, Regulska-Ilow B. **How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism.** A review. Rocznik Panstw Zakl Hig. 2013;64(1):1-12.

Leal KK, Schneider BC, França GV, Gigante DP, Santos I, Assunção MC. Diet quality of preschool children aged 2 to 5 years living in the urban area of Pelotas, Brazil. Rev Paul de Pediatr. 2015; 33(3):310-317.

**Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 5.** Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 50-58.

Marí-Bauset S, Llopis-González A, Zazpe I, Marí-Sanchis A, Suárez-Varela MM. Autism. **Comparison of nutritional status between children with autism spectrum disorder and typically developing children in the Mediterranean Region (Valencia, Spain).** Autism. 2017;21(3):310-322.

Mello, AM. **Autismo: guia prático.** 8º ed. São Paulo: AMA; Brasília: CORDE; 2016. p. 110.

Previdelli AN, Andrade SC, Pires MM, Ferreira SR, Fisberg RM, Marchioni DM. **A revised version of the Healthy Eating Index for the Brazilian population.** Rev Saude Publica. 2011 Aug;45(4):794-8.

Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. **Dietetic indices for assessment of diet quality.** Rev. Nut. 2010; 23(2).

	Crianças		Adolescentes	
	N	%	N	%
	41	50,62	40	49,38
Sexo				
Feminino	10	24,39	2	5,00
Masculino	31	75,61	38	95,00
Estado nutricional				
Magreza acentuada/magreza	0	0,00	2	5,00
Eutrofico	14	34,15	10	25,00
Risco de sobrepeso/sobrepeso	15	36,59	8	20,00
Obesidade/obesidade grave	12	29,27	20	50,00
Acompanhamento nutricional				
Sim	2	4,88	4	10,00
Não	39	95,12	36	90,00

Tabela 1: Caracterização de crianças e adolescentes com o transtorno do espectro autista. N=81. Pelotas (2017)

	Crianças		p*	Adolescentes		p*
	IQD-R <sup>1</sup>	DP		IQD-R <sup>1</sup>	DP	
Estado nutricional <sup>2</sup>			0,3688			0,5853
Baixo peso	-	-		58,13	7,21	
Eutrófico	49,79	11,85		55,14	6,88	
Excesso	51,06	10,95		52,27	7,22	
Sexo <sup>3</sup>			0,8732			0,5675
Feminino	51,09	3,15		56,26	5,3	
Masculino	50,47	1,92		53,13	1,21	
Acompanhamento <sup>3</sup>			0,6336			0,0580
Sim	54,12	6,68		59,9	2,64	
Não	50,45	1,69		52,55	1,21	

Tabela 2: Associação do IQD-R com estado nutricional, sexo e acompanhamento nutricional de crianças e adolescentes com o Transtorno do Espectro Autista. N=81. Pelotas (2017)

<sup>1</sup>Índice da Qualidade da Dieta-Revisado

<sup>2</sup>Correlação de Pearson

<sup>3</sup>Teste t de student

	Crianças		Adolescentes	
	N	%	N	%
<b>Frutas integrais</b>				
Pont. Mínima	11	26,83	11	27,50
Pont. Máxima	7	17,07	6	15,00
<b>Vegetais</b>				
Pont. Mínima	13	31,71	4	10,00
Pont. Máxima	3	7,32	4	10,00
<b>Cereais integrais</b>				
Pont. Mínima	38	92,68	32	80,00
Pont. Máxima	0	0,00	0	0,00
<b>Leite e derivados</b>				
Pont. Mínima	6	14,63	7	17,50
Pont. Máxima	11	26,83	1	2,50
<b>Gord_AA</b>				
Pont. Mínima	2	4,88	2	5,00
Pont. Máxima	1	2,44	0	0,00

Tabela 3: Pontuações mínimas e máximas obtidas através do Índice de Qualidade da Dieta-Revisado em crianças e adolescentes com o Transtorno do Espectro Autista. N=81. Pelotas-RS (2017).

## CONSTRUINDO RELAÇÕES DE CUIDADO POR MEIO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE: O PAPEL DO FISIOTERAPEUTA NA ESCOLA REGULAR

**Maria Bethânia Tomaschewski Bueno**

Faculdade Anhanguera Pelotas, RS, Brasil.

**Tatiane Barcellos Corrêa**

Faculdade Anhanguera Pelotas, RS, Brasil.

**RESUMO:** A escola contribui para a construção dos indivíduos como cidadãos, possibilitando aos mesmos a apropriação de conhecimentos assim, para o convívio social. O objetivo desta pesquisa foi realizar uma revisão sistemática sobre a atuação do fisioterapeuta na escola regular. A reflexão perante a escola regular deu-se especificamente pelo fato de abranger um público maior do que as escolas especiais, bem como refletir no papel da contribuição da inserção do profissional no meio. Como procedimento metodológico para esta pesquisa, foi utilizada a revisão sistemática de artigos no idioma português, entre os anos de 2007 a 2017, no portal de periódicos da CAPES. A busca avançada foi realizada por pares, com os descritores: “Fisioterapia” e “Saúde escolares”. O total de artigos encontrados foi de 97, mas apenas nove desses estavam de acordo com o objetivo da pesquisa. Os resultados demonstraram uma concentração de estudos com o cuidado biomecânico dos escolares, isto é, programas para a educação de utilização de mochilas, posturas ao abaixar-se, pegar algum objeto e maximizar a qualidade ao dormir, obtiveram predominância. A atuação do fisioterapeuta na escola de modo que (re) signifique a cultura popular de somente o profissional ser reabilitador é um dos fatores também evidenciados nos artigos resultantes.

**PALAVRA-CHAVE:** Fisioterapeutas; Fisioterapia (especialidades); Saúde na escola; Atenção à saúde.

**ABSTRAT:** The school contributes to the construction of individuals as citizens, making it possible for them to appropriate knowledge for social interaction. The objective of this research was to perform a systematic review on the physiotherapist’s performance in the regular school. The reflection before the regular school was given specifically by the fact that it encompasses a larger public than the special schools, as well as to reflect in the role of the contribution of the insertion of the professional in the environment. As a methodological procedure for this research, the systematic review of articles in the Portuguese language, between 2007 and 2017, was used in the CAPES periodicals portal. The advanced search was performed in pairs, with the descriptors: “Physiotherapy” and “School

health”. The total of articles found was 97, but only nine of these were in agreement with the objective of the research. The results showed a concentration of studies with the biomechanical care of schoolchildren, that is, programs for the education of backpacks, postures when lowering oneself, picking up some object and maximizing quality when sleeping, obtained predominance. The performance of the physiotherapist in school so that (re) means the popular culture of only the professional being rehabilitator is one of the factors also evidenced in the resulting articles.

**KEYWORDS:** Physical Therapists; Physical Therapy Specialty; Health at School; Health Care.

## 1 | INTRODUÇÃO

A fisioterapia tem como suas habilidades a prevenção, promoção e reabilitação da saúde humana, com ações pautadas nos distúrbios cinéticos funcionais dentro da atenção primária, secundária e terciária (COFFITO, 2017). Entretanto, em determinadas conjunturas, geralmente o profissional da área é percebido como especializado apenas na área da reabilitação, no entanto, essas percepções podem modificar-se por meio de estudos e práticas, fomentando novas possibilidades aos acadêmicos e profissionais, obtendo-se assim benefícios à sociedade como um todo.

A escola contribui para a construção dos indivíduos como cidadãos, possibilitando aos mesmos a apropriação de conhecimentos assim, para o convívio social. A escola desenvolve as percepções de cada ser, como do ser diante do mundo e vice-versa, a mesma enfatiza o desenvolvimento psíquico, cognitivo, ético, social e econômico (SFORNI, 2004; OLIVEIRA, 2013).

Diante disso, a escola, um ambiente de atenção primária e empoderadora, possibilita ao fisioterapeuta contribuir e desenvolver temas educacionais referentes à saúde. Profissionais e acadêmicos de fisioterapia tem a possibilidade de, a partir da inserção na escola regular, construir relações com alunos, professores, funcionários e comunidade local, no qual oportunize troca de conhecimentos.

Manhães *et al.* (2011), abordou em seu estudo os riscos da gravidez precoce aos escolares, salientando a importância do fisioterapeuta no ambiente escolar. O estudo foi realizado com 31 adolescentes no Rio de Janeiro e os resultados foram positivos, isto é, houve aumento no índice de conhecimentos após o trabalho de informação realizado na pesquisa (MALHÃES *et al.*, 2011).

A orientação e esclarecimentos sobre saúde, seja de forma geral ou específica, está agregada ao trabalho do fisioterapeuta, no caso do ambiente escolar não é um ambiente comumente explorado pelo profissional, mesmo sendo de grande potencial.

O processo de educação em saúde apresenta-se como ferramenta eficaz no que diz respeito ao controle de doenças e de graves problemas de saúde pública, como, por exemplo, os altos índices de prematuridade decorrentes de uma gravidez precoce.

O fisioterapeuta, como os demais profissionais de saúde, tem sólida formação acadêmica para atuar no desenvolvimento de programas de promoção a saúde. Porém, frequentemente tem suas atividades profissionais reconhecidas na reabilitação e na recuperação de pessoas fisicamente lesadas com atuação, portanto em níveis de atenção secundária e terciária da saúde (MANHÃES *et al.*, 2011, p.28).

David *et al.* (2013, p. 122) escreveu “Através da apropriação do conhecimento, a criança e a família ganham autonomia no manejo da doença e na manutenção da saúde”, não somente em questões já instaladas, o profissional, como demonstra na literatura, tem capacidade para interagir com a sociedade de modo que possa elucidar e prevenir sobre diversos fatores.

Apesar de, a fisioterapia na saúde de escolares não se encontra nas especialidades do profissional, pode ser compreendida como saúde coletiva (COFFITO, 2017). Nesse sentido, as intervenções educacionais e clínicas encontram-se como estratégias para esse profissional, nesse ambiente.

O objetivo desta pesquisa foi realizar uma revisão sistemática sobre a atuação do fisioterapeuta na escola regular. A reflexão perante a escola regular deu-se especificamente pelo fato de abranger um público maior do que as escolas especiais, bem como refletir no papel da contribuição da inserção do profissional no meio.

## 2 | METODOLOGIA

Como procedimento metodológico para esta pesquisa, foi utilizada a revisão sistemática de artigos no idioma português, entre os anos de 2007 a 2017, no portal de periódicos da CAPES. A busca avançada foi realizada em pares, com os descritores: “Fisioterapia” e “Saúde escolares”.

O total de artigos encontrados foi de 97, mas apenas nove desses estavam de acordo com o objetivo da pesquisa. A mesma foi realizada nos meses de agosto e setembro de 2017. Os critérios de inclusão foram artigos no idioma português, entre o período de 2007 a 2017, disponíveis na íntegra na base de dados selecionada, no qual abordassem a atuação do fisioterapeuta na escola regular.

Foram excluídos aqueles documentos que não se configuravam como artigos, não se encontravam no idioma português, não estavam disponíveis na íntegra no período da pesquisa e não informavam evidentemente o papel do fisioterapeuta no ambiente escolar, bem como não demonstravam a atuação do profissional nesse ambiente.

## 3 | RESULTADOS

O objetivo da pesquisa foi verificar a atuação do fisioterapeuta na escola regular, assim possibilitando reflexões para a sua atuação em um ambiente empoderador, de atenção básica, como a escola. Os nove artigos resultantes da revisão sistemática

encontram-se descritos na Tabela 1.

Autores	Título	Publicação	Ano
Mansour e Roveda	Presença da fisioterapia preventiva no contexto escolar: educação e prevenção em saúde.	Cinergis	2016
Badaró <i>et al.</i>	Apresentação de um programa de fisioterapia no cuidado corporal de escolares: relato de experiência.	Revista Eletrônica Gestão e Saúde	2013
Santos, Lara e Folmer	Inclusão escolar: possíveis contribuições da fisioterapia sob a óptica de professoras.	Revista Especial Educação	2015
Rocha, Tatmatsu e Vilela	Associação entre uso de mochilas escolares e escoliose em adolescentes de escolas públicas e privadas.	Motricidade	2012
Neto <i>et al.</i>	Saúde na escola: reflexões a partir das vivências dos estudantes de Fisioterapia.	Tempus de Saúde Coletiva	Actas 2016
Fernandes, Casarotto e João	Efeitos de sessões educativas no uso das mochilas escolares em estudantes do ensino fundamental.	Brazilian Journal of Physical Therapy	2008
Benini e Karolczak	Benefícios de um programa de educação postural para alunos de uma escola municipal de Garibaldi, RS.	Fisioterapia e Pesquisa	2010
Rebolho, Casarotto e João	Estratégias para ensino de hábitos posturais em crianças: história em quadrinhos versus experiência prática.	Fisioterapia e Pesquisa	2009
Felcar <i>et al.</i>	Prevalência de respiradores bucais em crianças de idade escolar.	Ciência & Saúde Coletiva	2010

Tabela 1 – Artigos selecionados na revisão.

Fonte: Elaborado pelos autores (2017).

Os resultados desta pesquisa demonstraram que há uma concentração de estudos com o cuidado biomecânico dos escolares, isto é, programas para a educação de utilização de mochilas, posturas ao abaixar-se, pegar algum objeto e maximizar a qualidade ao dormir, foram prevalência nesse estudo. Outro fator foi de que todos os estudos selecionados são focados em sujeitos no período do ensino fundamental.

A atuação do fisioterapeuta na escola de modo que (re) signifique a cultura popular de somente o profissional ser reabilitador é um dos fatores também evidenciados nos artigos resultantes. Os resultantes referiram como escassos o número de pesquisas relacionando a inserção do profissional nesse ambiente, logo, também evidenciado nesta.

O estudo de Mansour e Roveda (2016) foi descritivo, com 206 crianças do ensino fundamental de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. A abordagem foi a educação postural no ambiente escolar e nas atividades de vida diárias desses estudantes (MANSOUR e ROVEDA, 2016).

As ações descritas no estudo foram palestras, uso de jogos, elaboração de cartazes, distribuição de folders, cruzadinhas e jogos de tabuleiro, avaliação postural estática, do estudante no mobiliário da sala de aula, análise observacional individual

dos mesmos. Foi realizado também, pesagem dos alunos, das mochilas e como utilizá-las corretamente e aplicação de questionário biopsicossocial (MANSOUR e ROVEDA, 2016).

Os autores descreveram que durante o estudo foi evidenciado problemas no ambiente escolar, como por exemplo, de 206 mochilas pesadas, 148 delas estavam acima dos 10% recomendados, no entanto, a atuação fisioterapêutica obteve receptividade positiva nas atividades, no ambiente pesquisado. Foi ressaltado pelos autores a importância da fisioterapia preventiva, principalmente no ambiente escolar com uma abordagem lúdica adequada a cada faixa etária dos mesmos (MANSOUR e ROVEDA, 2016).

A abordagem lúdica como estratégia também foi mencionada no estudo de Rebolho, Casarotto e Joao, (2009), no qual teve o objetivo de verificar a retenção de informações sobre hábitos posturais em alunos do ensino fundamental com base em duas estratégias educacionais, a de uso de história em quadrinhos e a de experiência prática. O estudo foi experimental, com cinco encontros, com 80 crianças do ensino fundamental, de uma escola no município de São Paulo, SP, Brasil (REBOLHO, CASAROTTO e JOAO, 2009).

A pesquisa demonstrou que para os meninos foi necessário realizar mais repetições sobre o conteúdo do que para o grupo das meninas, no entanto, não houve diferenças em relação as estratégias de entendimento e fixação das informações em relação aos hábitos posturais. A abordagem lúdica na educação em saúde proporciona uma relação de cuidado e confiança, bem como uma conduta humanizada (REBOLHO, CASAROTTO e JOAO, 2009).

Benini e Karolczak (2010), analisaram em seu estudo os efeitos de um programa de educação postural em 48 estudantes do ensino fundamental do município de Garibaldi, RS, Brasil. O estudo foi caracterizado como experimental longitudinal e primeiramente foi aplicado questionário aos alunos, sobre os hábitos posturais na escola e em suas atividades de vida diária e questionário aos pais dos mesmos sobre a percepção desses hábitos em seus filhos (BENINI e KAROLCZAK, 2010).

Após verificado estatura e pesagem dos alunos, bem como das mochilas, o modelo e como elas eram utilizadas foi realizado uma aula educativa sobre os temas abordados. Foram reavaliadas quatro semanas depois e os resultados demonstrados foram a aceitação perante as informações e atividades propostas pelas profissionais, como conhecimento das informações dispostas sobre os hábitos posturais (BENINI e KAROLCZAK, 2010).

Apesar do entendimento sobre os hábitos posturais, em determinados casos, como por exemplo, a maneira correta de sentar-se no mobiliário na sala de aula, não é praticado. Outros hábitos, como ler na cama e assistir à televisão no sofá, foi modificado conforme as informações corretas dispostas pelo fisioterapeuta. Os autores informaram que é necessário um trabalho contínuo do fisioterapeuta no ambiente escolar, para que essas ações preventivas sejam praticadas de modo natural pela

comunidade (BENINI e KAROLCZAK, 2010).

Nesse sentido, o estudo de Fernandes, Casarotto e João (2008) teve como objetivo avaliar o efeito das sessões educativas sobre hábitos posturais em alunos de ensino fundamental de escola particular, no município de São Paulo, SP, Brasil. Foram analisados 107 alunos, de ambos os sexos e o estudo consistiu de palestras para os pais e professores, com conceitos sobre a coluna vertebral e instruções sobre como os alunos devem utilizar as mochilas, em relação a posição, peso e modelo. Para os alunos consistiu em palestras e orientação prática postural correta com e sem as mochilas (FERNANDES, CASAROTTO e JOAO, 2008).

Nesse estudo houve reforço por três meses, com palestras de 60 minutos de duração em sala de aula e exposição de cartazes na escola, após quatro meses da avaliação inicial e intervenção, os alunos foram reavaliados. Os resultados demonstrados pelos autores foram de que as mudanças em relação ao modo de uso e peso das mochilas se modificaram significativamente. Essa construção de conhecimentos e aceitação do fisioterapeuta no ambiente escolar dá-se devido à educação, não somente aos alunos, mas propaga-se aos pais e professores (FERNANDES, CASAROTTO e JOAO, 2008).

O estudo de Badaró *et al.* (2013), foi um relato de experiência de docentes e estudantes de fisioterapia, inseridos em um programa denominado de Programa de Fisioterapia no Cuidado Corporal de Escolares, realizado entre uma instituição filantrópica com escolas de ensino fundamental do município de Santa Maria, RS, Brasil. Além de palestras para alunos, professores e funcionários na escola, há no programa a avaliação de peso e estatura, flexibilidade, avaliação postural subjetiva, com posturógrafo e com biofotogrametria, da impressão plantar, desenvolvimento motor e avaliação de queixas de dor (BADARÓ *et al.*, 2013).

Os autores evidenciaram a importância das vivências no eixo ensino-assistência, unindo a universidade e a comunidade local, bem como do profissional de fisioterapia na equipe multidisciplinar dessas ações. Além de ampliar a atuação do mesmo, essas vivências proporcionando o entendimento da comunidade perante o trabalho do profissional (BADARÓ *et al.*, 2013).

Neto *et al.* (2016), foi um estudo sobre as vivências de alunos de fisioterapia, durante dois meses, com 30 alunos do sexto ano do ensino fundamental, em uma escola no município de João Pessoa, PB, Brasil. Os autores formularam o estudo por meio de registros fotográficos e discursos sobre as experiências vividas na escola e a temática utilizada foi denominada de Inclusão Social das pessoas com Deficiência. Foram realizadas com os alunos atividades teóricas e reflexivas, filmes, práticas e dinâmicas de aplicabilidade sobre a inclusão social da pessoa com deficiência (NETO *et al.*, 2016).

Os autores descreveram como de fundamental importância os profissionais e acadêmicos da fisioterapia inseridos no ambiente escolar, no qual possibilita exercer a educação e construir uma atenção básica que se aproprie das trocas de conhecimento, beneficiando a todos do âmbito. Foi evidenciado pelos mesmos, a necessidade de

promover os temas sobre deficiências e inclusão, bem como desenvolvê-los entre a escola e a fisioterapia (NETO *et al.*, 2016).

No estudo de Santos, Lara e Folmer (2015) o objetivo foi verificar suas concepções em relação às contribuições da fisioterapia na inclusão de escolares e inteirar-se sobre as dificuldades vivenciadas pelos profissionais que atuam nas salas de recursos. O estudo foi qualitativo, descritivo, com oito professoras entrevistadas do município de Uruguaiana, RS, Brasil (SANTOS, LARA e FOLMER, 2015).

As professoras demonstraram posicionamentos positivos perante a atuação do profissional de fisioterapia, sua importância na inserção dentro do ambiente escolar, como por exemplo, suporte ao aluno, ao professor em relação a orientações de patologias, funcionalidades, posturas e tecnologias assistidas. No entanto, houve dificuldades das mesmas em exemplificar as práticas do profissional nesse ambiente (SANTOS, LARA e FOLMER, 2015).

Rocha, Matmatsudo e Vilela (2012), em seu estudo observacional, de corte transversal, analisou o uso e o peso de mochilas relacionando com a presença de escoliose em 228 alunos, de ambos os sexos, do ensino fundamental. Dos 228 alunos, 27,63% de escola particular e 72,37 % de escola pública, do município de Quixadá, CE, Brasil (ROCHA, TATMATSU e VILELA, 2012).

O estudo apresentou uma maior alteração da biomecânica nos alunos das escolas públicas, no qual se utilizavam de forma errônea de mochilas com rodas. Assim como, a pesquisa demonstrou que a população feminina estudada obteve maior número de casos de gibosidade na coluna, com 65.46% dos 110 púberes com a alteração (ROCHA, TATMATSU e VILELA, 2012).

No estudo de Felcar *et al.* (2010), objetivo foi o identificar a prevalência de respiradores bucais em crianças de uma escola do ensino fundamental do município de Londrina, PR, Brasil. Foi um estudo transversal, com aplicação de 496 questionários aos pais ou responsáveis dos alunos (FELCAR *et al.*, 2010).

O questionário abordou sobre hábitos como aleitamento, se a criança chupa dedo ou fez uso de chupeta, o posicionamento ao dormir, ronco, sialorreia, qualidade do sono, concentração, atividade física, em relação a alimentação, como velocidade, quantidade, local, ingestão de líquidos durante as refeições, tempo e preferência alimentar. O questionário também abordou os cuidados pessoais, se a criança rói as unhas, utiliza óculos, ingere alguma medicação, se realizou alguma cirurgia e/ou algum tratamento, como fisioterapia, fonoaudiologia, otorrino e ortodôntico (FELCAR *et al.*, 2010).

Além disso, o estudo investigou sobre a respiração dos alunos, se essa era realizada pelo nariz, boca ou mista, intensidade de gripes, alergias e ruídos na mesma. A pesquisa evidenciou um discreto predomínio para o sexo feminino de respiração bucal, mas sem índices relevantes, entretanto ressaltou que esse quesito necessita de diagnóstico, prevenção e tratamento multidisciplinar, pois pode predispor a distúrbios que impactam em alterações funcionais e morfológicas desses indivíduos (FELCAR

*et al.*, 2010).

## 4 | DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática demonstrou que os resultados, sobre o papel do fisioterapeuta no ambiente escolar, concentraram-se em estudos com o cuidado biomecânico dos escolares. Contudo, na literatura há o predomínio de estudos abordando a atuação do fisioterapeuta no ambiente escolar com a inclusão.

Landmann, Ruzza e Chesani (2009), abordaram a atuação do fisioterapeuta na escola infantil. Os mesmos, enfatizaram a importância da presença do profissional nas questões de transmitir os conhecimentos, principalmente de desenvolvimento neuropsicomotor, para os professores e funcionários nesses locais (LANDMANN, RUZZA e CHESANI, 2009).

O estudo demonstrou que os profissionais que atuam no ambiente escolar têm incertezas em relação a distinguir alguma alteração no desenvolvimento das crianças, muitas percepções, algumas vezes, são realizadas pelos conhecimentos cotidianos e em vivências (LANDMANN, RUZZA e CHESANI, 2009). Da mesma forma, Neto e Assis (2009) destacaram a importância da inserção do fisioterapeuta na escola, diretamente ligado a inclusão escolar.

O estudo discutiu sobre como o fisioterapeuta se faz importante na equipe multidisciplinar nesse ambiente, como suporte aos demais nos planejamentos de atividades apropriadas e seguras as necessidades de alunos com deficiências físicas, por exemplo (NETO e ASSIS, 2009). O profissional possui competência para adequar e adaptar os espaços físicos, bem como instruir brincadeiras que socializam e fomentam a inclusão de todos os alunos (NETO e ASSIS, 2009).

Nesse sentido, Gallo, Orso e Fiório (2011) e Medeiros e Becker (2009) também demonstraram em seus estudos a importância da interação do fisioterapeuta com os professores, principalmente no que remete a inclusão de alunos com demandas de necessidades específicas. Essa questão, foi evidenciada pelos autores como emergencial frente as necessidades de apoio aos professores (NETO e ASSIS, 2009).

O fisioterapeuta, segundo os autores, proporciona benefícios ao aluno, no qual terá um ambiente propício para a sua aprendizagem, aos professores e demais funcionários do ambiente escolar, com o entendimento de patologias, desenvolvimento neuropsicomotor, tecnologias assistivas, posturas adequadas dentre outros. E benefícios com a comunidade escolar como um todo, facilitando assuntos relacionados a acessibilidade e consciência sobre a inclusão (MEDEIROS e BECKER, 2009).

A congruência nas pesquisas foi de que o fisioterapeuta na escola regular, como parte da equipe multidisciplinar, contribui com suas habilidades cinético-funcionais, de ergonomia e acessibilidade. As informações em saúde transcendem aos alunos, isto é, esses conhecimentos atingem os pais e familiares, professores e comunidade

escolar em geral, constituem em um processo humanizado de retorno de cuidado aos cidadãos.

Esta pesquisa apresentou limitação quanto ao período de 10 anos de seleção de artigos, a uma base de dados, pois diminui o número de resultantes, bem como ao número de descritores e esses no idioma português.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do número diminuído de artigos selecionados, observou-se uma concentração de estudos com o cuidado biomecânico dos escolares, isto é, programas para a educação de utilização de mochilas, posturas ao abaixar-se, pegar algum objeto e maximizar a qualidade ao dormir, foram prevalência nesse estudo.

O fisioterapeuta inserido nesse ambiente tem a possibilidade de realizar diversas trocas de conhecimento em um ambiente, muitas vezes, defasado de investimentos, de autoestima e segurança. A escola regular, principalmente a pública, é enriquecedora de informações e torna-se objeto de empoderamento para a sociedade como um todo.

A consolidação do fisioterapeuta nas escolas, acredita-se, que somente se dará por meio de pesquisas científicas, das vivências de profissionais e acadêmicos da fisioterapia inseridos na mesma. Isto é, os resultados virão assim como, esse segmento de mercado será consolidado na profissão, por meio do interesse dos próprios fisioterapeutas.

## REFERÊNCIAS

BADARÓ, Ana Fátima Viero; TURRA, Patrícia; NICHELE, Lidiane de Fátima Ilha; FERNANDES, Débora da Luz; BASSO, Débora Bonesso Andriollo; ZULIAN, Tatiéli. **Apresentação de um Programa de Fisioterapia no Cuidado Corporal de Escolares**: Relato de experiência. Revista Eletrônica Gestão & Saúde, Edição Especial, p. 1825-1839, 2013.

BENINI, Juliana; KAROLCZAK, Ana Paula Barcellos. **Benefícios de um Programa de Educação Postural para Alunos de uma Escola Municipal de Garibaldi, RS**. Fisioterapia e Pesquisa, v. 17, n. 4, p. 346-351, 2010.

COFFITO, **Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional**. Disponível em: <[https://www.coffito.gov.br/nsite/?page\\_id=2341](https://www.coffito.gov.br/nsite/?page_id=2341)>. Acesso em: 16 set. 2017.

DAVID, Maria Laura Oliveira; RIBEIRO, Maria Ângela Gonçalves de Oliveira; ZANOLLI, Maria de Lurdes; MENDES, Roberto Teixeira; ASSUMPÇÃO, Maira Seabra de; SCHIVINSKI, Camila Isabel Santos. **Proposta de Atuação da Fisioterapia na Saúde da Criança e do Adolescente**: uma necessidade na atenção básica.

FELCAR, Josiane Marques; BUENO, Izabele Rafael; MASSAN, Ana Carolina Silva; TOREZAN, Roberta Pereira; CARDOSO, Jefferson Rosa. **Prevalência de Respiradores Bucais em Crianças de Idade Escolar**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 15, n. 2, p. 437-444, 2010.

FERNANDES, Susi Mary de Souza; CASAROTTO, Raquel Aparecida; JOÃO, Silvia Maria Amado. **Efeitos de Sessões Educativas no Uso das Mochilas Escolares em Estudantes do Ensino**

**Fundamental I.** Brazilian Journal of Physical Therapy, v. 12, n. 6, p. 447-453, 2008.

GALLO, Emanuela Cerutti; ORSO, Kelen Daiane; FIÓRIO, Franciane Barbieri; **Análise da Acessibilidade das Pessoas com Deficiência Física nas Escolas de Chapecó-SC e o Papel do Fisioterapeuta no Ambiente Escolar.** O Mundo da Saúde, v. 35, n. 2, p. 201-207, 2011.

LANDMANN, Luciana Machado; RUZZA, Poliana; CHESANI, Fabíola Hermes. **Espaço Educacional e a Possibilidade de Atuação do Fisioterapeuta.** Ciências & Cognição, v.14, n. 3, p. 83-91, 2009.

MANHÃES, Juliana Soares Ferreira; PEREIRA, Neidimara França; FERNANDES, Stephanie Coelho; ALVES, Adelaine de Souza; SOUSA, Lara Luiza Campos de; SHIMODA, Eduardo. **Fisioterapia e educação em saúde: relação entre gravidez precoce e o bebê de risco.** Adolesc. Saúde, v. 8, n. 3, p. 27-34, 2011.

MANSOUR, Kamila Mohammad Kamal; ROVEDA, Patrícia Oliveira. **Presença da Fisioterapia Preventiva no Contexto Escolar: Educação e prevenção em saúde.** Cinergis, v. 17(4 Supl.1), p. 373-377, 2016.

MEDEIROS, Patrícia da Graça; BECKER, Elisabeth. **Interação Fisioterapeuta-Professor a partir das Necessidades Encontradas na Inclusão Escolar.** Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, v. 9, n. 1, p.49-58, 2009.

NETO, Adriana C. Jorqueira; BLASCOVI-ASSIS, Silvana Maria. **Contribuições do Fisioterapeuta na Inclusão Escolar de Alunos com Deficiência Sob a Perspectiva do Brincar.** Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, v. 9, n. 1, p. 76-91, 2009.

NETO, Elísio Alves Pereira; FERREIRA, Josielma Juvito; SILVA, Kaísa Thomaz Cavalcante e; MENDONÇA, Mayara Gabriel Lima de; SANTOS, Renata Newman Leite Cardoso dos; RIBEIRO, Kátia Suely Queiroz Silva. **Saúde na Escola: Reflexões a partir das vivências de estudantes de fisioterapia.** Revista Tempus, actas de saúde coletiva, v. 10, n.1, p. 231-239, 2016.

OLIVEIRA, Terezinha; VIANA, Ana Paula dos Santos; BOVETO, Lais; SARACHE, Mariana Vieira. **Escola, Conhecimento e Formação de Pessoas: considerações históricas.** Políticas Educativas, v. 6, n. 2, p. 145-160, 2013.

REBOLHO, Marília Christina Tenorio; CASAROTTO, Raquel Aparecida; JOÃO, Sílvia Maria Amado. **Estratégias para Ensino de Hábitos Posturais em Crianças: História em quadrinhos versus experiência prática.** Fisioterapia e Pesquisa, v. 16, n. 1, p. 46-51, 2009.

ROCHA, José Carlos Tatmatsu; TATMATSU, Daniely Ildegardes Brito; VILELA, Daisy de Araújo. **Associação entre Uso de Mochilas Escolares e Escoliose em Adolescentes de Escolas Públicas e Privadas.** Motricidade, v. 8, n. S2, p. 803-809, 2012.

SANTOS, Marcelli Evans Telles dos; LARA, Simone; FOLMER, Vanderlei. **Inclusão Escolar: Possíveis contribuições da fisioterapia sob a óptica de professoras.** Revista Educação Especial, v. 28, n. 51, p. 67-82, 2015.

SFORNI, Marta Sueli de Faria. **Aprendizagem conceitual e organização do ensino: contribuições da teoria da atividade.** Araraquara: JM Editora, 2004.

## ESTUDO DOS PADRÕES DE POLINIZAÇÃO DE *Apis mellifera* L. EM PLANTAS DA CAATINGA, COMO ESTRATÉGIA PARA A CONSTRUÇÃO DE UM MATERIAL DIDÁTICO

**Fernanda Kamila Oliveira de Aquino**

Instituto Federal do Ceará – Campus Jaguaribe

**Raíza Lorena Peixoto**

Instituto Federal do Ceará – Campus Jaguaribe

**Larissa Mércia Peixoto**

Instituto Federal do Ceará – Campus Jaguaribe

**George Machado Tabatinga Filho**

Secretaria Estadual de Educação do Ceará -  
Fortaleza

**Ileane Oliveira Barros**

Instituto Federal do Ceará – Campus Paracuru

**RESUMO:** O uso de estratégias didáticas são utilizadas porque além de facilitar o aprendizado de forma lúdica possibilita a relação dos conteúdos apresentados com a vida cotidiana. Sendo assim, a utilização dos materiais didáticos são indispensáveis para que ocorra a construção do conhecimento. Entre as estratégias que podem ser usadas pelo professor destacam-se as aulas práticas e de campo que podem atuar no desenvolvimento das capacidades de observação bem como na análise de dados e da percepção crítica. No ensino de Biologia muitos materiais são desenvolvidos para sua utilização no ensino fundamental e médio, mas é observado uma escassez na elaboração de tais materiais voltados para o ensino superior. Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo a elaboração de um guia de

aulas práticas como ferramenta de auxílio para docentes e discentes do ensino superior, a partir dos aspectos relacionados à polinização em flores da Caatinga por abelhas *Apis mellifera*. Para isso, foram coletadas informações em campo por meio de observações e de registros escritos e fotográficos, realizados semanalmente nos meses de janeiro a março de 2017. A partir da pesquisa para construção do material didático foi possível perceber a escassez de trabalhos dessa natureza voltados para o ensino superior, o que reforça a importância da elaboração do presente guia como ferramenta para o ensino.

**PALAVRAS-CHAVE:** Materiais didáticos. Caatinga. *Apis mellifera*.

**ABSTRACT:** The use of didactic strategies is used because besides facilitating learning in a playful way makes possible the relation of the presented contents with the daily life. Therefore, the use of teaching materials is indispensable for the construction of knowledge. Among the strategies that can be used by the teacher stand out the practical and field classes that can act in the development of the capacities of observation as well as in the analysis of data and the critical perception. In Biology teaching many materials are developed for use in primary and secondary education, but there is a shortage in the development of such materials for higher

education. From this perspective, the objective of this work was the elaboration of a guide to practical classes as an aid tool for teachers and students of higher education, from the aspects related to pollination in flowers of the Caatinga by *Apis mellifera* bees. For this, field information was collected through observations and written and photographic records, performed weekly in the months of January to March, 2017. From the research for the construction of didactic material it was possible to perceive the scarcity of works of this nature aimed at higher education, which reinforces the importance of developing this guide as a tool for teaching.

**KEYWORDS:** Didactic materials. Caatinga. *Apis mellifera*.

## 1 | INTRODUÇÃO

Na área das ciências da natureza e suas tecnologias a disciplina de Biologia é uma das que apresenta muitas possibilidades de exploração dos diferentes recursos para o ensino (PEREIRA; LIMA; GALLÃO, 2014). O uso de estratégias didáticas diversificadas além de facilitar o aprendizado de forma motivadora e lúdica pode também relacionar os conteúdos aprendidos com a vida cotidiana, o que facilita a assimilação dos conteúdos expostos (MORAES, 2016). Dessa maneira, a utilização de materiais didáticos que contribuam para a construção do conhecimento e que viabilizem o processo de ensino-aprendizagem é de grande importância para a renovação do exercício docente, já que esses recursos servem como apoio para o desenvolvimento das funções dos professores e permitem que o educando tenha uma proximidade maior com o conteúdo apresentado (MENDES; LIMA; SILVEIRA, 2012).

Considerando que a transmissão de conhecimento não está somente vinculada à sala de aula (TOLEDO et al., 2018), entre as estratégias a serem utilizadas pelo docente a fim de estimular a participação dos alunos, incluem-se as aulas práticas e de campo, que podem promover o desenvolvimento das capacidades de observação, de análise de dados e da percepção crítica (SILVA; LANDIM, 2012). Assim, quando realizadas de forma adequada, estas metodologias contribuem para o desenvolvimento cognitivo permitindo que os discentes formulem problemas e hipóteses que os auxiliem na expansão de suas reflexões sobre os fenômenos que ocorrem a sua volta (SILVA; LANDIM, 2012).

Para que tais estratégias sejam utilizadas de forma satisfatória, faz-se necessário que os professores tenham uma formação inicial e continuada, proporcionando assim um entendimento crítico das práticas empregadas, o que os proporcionará autonomia e iniciativa para superar suas limitações (VIVEIRO; DINIZ, 2009), além de recursos didáticos de apoio. Tendo isso em vista, inúmeros estudos têm procurado colaborar com o desenvolvimento de materiais didáticos voltados para a Biologia, com foco principalmente no ensino fundamental e médio sendo, contudo, escassos àqueles voltados para o ensino superior.

Entre os temas que trazem desafios ao serem abordados, temos a polinização, que, por seu caráter abrangente, envolve conhecimentos de diversas áreas tais como botânica, zoologia e ecologia, além de englobar vários processos ecológicos, tais como competição, coevolução, forrageamento e sucesso reprodutivo, que afetam as populações, comunidades e ecossistemas.

Particularmente no ensino superior, onde os docentes frequentemente são especialistas e ministram disciplinas específicas, assuntos que permeiam muitas áreas, tais como a polinização, correm o risco de ser subexplorados e pouco aprofundados em virtude da complexidade que envolvem. Entretanto, este é de extrema importância para a manutenção dos ecossistemas o que o torna assunto indispensável na formação de profissionais que lidam com tais aspectos como Biólogos, Agrônomos, Zootecnistas, Gestores e Engenheiros ambientais, entre outros. Essa natureza abrangente do tema pode dificultar o entendimento de algumas de suas peculiaridades e se tornar um desafio aos docentes que abordam o assunto.

Os polinizadores são essenciais para as plantas silvestres e cultivadas, sendo responsáveis por cerca de 75% dos processos de polinização na agricultura, e a sua ausência pode diminuir a produtividade, aumentando conseqüentemente, os custos de polinização para os agricultores (MARQUES et al., 2015). As abelhas, sendo consideradas as principais polinizadoras da flora do planeta, possibilitam a formação de frutos e sementes e contribuem para a manutenção de várias espécies vegetais, tendo assim uma grande importância para a conservação da flora presente em diversos biomas, inclusive na caatinga (SILVA et al., 2014).

Entre as abelhas polinizadoras, as da espécie exótica *Apis mellifera* são distribuídas em quase todos os biomas brasileiros, com predominância na caatinga (NEVES; VIANA, 2002). Elas são bem sucedidas e consideradas benéficas devido à relação com o processo de polinização e à produção de mel (GOULSON, 2003). Embora os trabalhos sobre os efeitos do papel desempenhado por elas na polinização de plantas da caatinga ainda sejam questionáveis, há pesquisas que mostram que as mesmas podem atuar como polinizadores efetivos em ecossistemas brasileiros, como observado em *Copaifera langsdorffii*, em uma área de cerrado (FREITAS; OLIVEIRA, 2002) e na goiabeira (*Psidium guajava*) em uma região de caatinga (FREITAS; ALVES, 2008).

Em virtude da importância da polinização para o funcionamento do ecossistema (MAUÉS; MARTINS, 2014), da sua abrangência e da existência de poucos materiais com fins didáticos sobre o tema voltados para o auxílio dos professores do ensino superior, torna-se relevante a realização de pesquisas na área que tenham como finalidade a obtenção de dados que embasem a construção de tais recursos.

Diante deste cenário, o presente trabalho teve como objetivo construir um guia de aulas práticas para o ensino superior baseado na ecologia da polinização de plantas da Caatinga visitadas por *Apis mellifera*. Objetivou-se ainda catalogar tais espécies em um fragmento de Caatinga no município de Jaguaribe, Ceará, e conhecer os padrões

de visitação desta abelha a fim de embasar a construção do guia que poderá servir como auxílio ao professor e ao aluno, na aprendizagem dos aspectos envolvidos na polinização, bem como de suas especificidades no bioma caatinga.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em duas áreas sendo uma pertencente à sede do município de Jaguaribe e localizada próxima ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE, Campus Jaguaribe. Enquanto a outra, denominada Sítio Alegre, pertence ao distrito de Feiticeiro que está situado a 42 quilômetros da sede do município de Jaguaribe que se localiza na microrregião do Médio Jaguaribe, no sudoeste do Estado do Ceará, a 310 Km da capital (IPECE, 2007).

A coleta dos dados foi realizada durante os meses de janeiro a março de 2017, no período de 06h30min às 17h00min, dois dias por semana, e as coletas das abelhas melíferas foram efetivadas no período da manhã, bem como as observações morfológicas e os registros fotográficos. O guia de aulas práticas foi construído utilizando-se as informações e os registros coletados durante as observações realizadas em campo e em laboratório.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O guia produzido é constituído de três práticas com os seguintes temas: (1) morfologia de *Apis mellifera*, que aborda os nomes e funções das principais estruturas externas do corpo das abelhas, utilizando como modelo de estudo a abelha *Apis mellifera*, (2) comportamento de forrageio por *Apis mellifera*, onde são tratados aspectos do forrageio e do comportamento de *Apis mellifera* em relação aos recursos preferenciais, (3) eficiência da polinização, com enfoque para a eficiência de *Apis mellifera* como polinizadora.

### Prática 1 - Morfologia de *Apis mellifera*

#### Introdução

As abelhas são insetos pertencentes à ordem dos himenópteros e a família dos apídeos. Entre, aproximadamente, as vinte mil espécies conhecidas, as abelhas *Apis mellifera* são as mais eficientes em relação aos processos de polinização, contribuindo para a agricultura e para a produção de mel, própolis, geleia real e pólen (RAMOS; CARVALHO, 2007).

O corpo das abelhas é constituído de três partes: a cabeça, o tórax e o abdômen (Figura 1). A cabeça (Figura 2) contém dois olhos compostos laterais, três ocelos dorsais, um par de antenas que são divididos em três artigos, o escapo, o pedicelo e o flagelo, sendo o último formado por unidades denominadas flagelômeros (Figura 3) (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). Elas possuem também um par de mandíbulas e

o aparelho bucal, que contém a glossa e o labro (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

No tórax delas, têm origem dois pares de asas (Figura 1C) (MARQUES et al., 2015). Apresentam em sua parte ventral três pares de pernas chamadas de pernas anteriores, médias e posteriores (Figura 1D), constituídas por seis artículos, que são: coxa, trocanter, fêmur, tíbia, tarso e pré-tarso. As abelhas melíferas possuem a superfície externa da tíbia posterior em um formato côncavo com pelos nas margens, e tal arranjo é denominado de corbícula, estrutura onde o pólen é depositado para ser transportado (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

A espécie africanizada *A. mellifera* possui uma ampla distribuição já que a mesma prospera em grandes áreas da superfície da Terra. Uma colônia de *A. mellifera* contém uma fêmea fértil, a rainha, e numerosas fêmeas estéreis, as operárias, além delas, durante a maior parte do ano, são encontradas crias em desenvolvimento e durante parte da primavera e do verão, os zangões, que são os machos da colônia (FREE, 1980). Em relação ao tamanho, as operárias possuem um comprimento corpóreo de cerca de 1 cm, sendo as rainhas e os zangões um pouco maiores (PIRES et al., 2014).

A espécie *Apis mellifera* forma uma sociedade onde existe uma só rainha e vários zangões. As rainhas são originadas a partir de uma larva que recebeu geleia real como alimento, e as mesmas são fecundadas durante o voo nupcial, por um ou mais zangões. Os ovos são colocados pelas rainhas em alvéolos nos ninhos, e as larvas são alimentadas pelas operárias (GALLO et al., 2000). Os machos não possuem corbículas (Figura 1D) como as operárias, já que não coletam alimentos para a cria, e em relação as antenas, os mesmos possuem 13 flagelômeros, enquanto as fêmeas apenas 12 (Figura 3) (MARQUES et al., 2015).

O melhor método para realizar a captura é com a rede entomológica (puçá) (Figura 4), que é uma prática que permite ao coletor realizar importantes observações diretas sobre o comportamento e a biologia das abelhas. As redes entomológicas são usadas geralmente para insetos durante o voo, sendo formadas por um aro de arame resistente e por um saco de tela fina de náilon ou filó com borda reforçada, ambos de dimensões variáveis (ALMEIDA; RIBEIRO-COSTA; MARIONI, 2012).

### Roteiro da prática

Conceitos estudados: Morfologia da abelha *A. mellifera* e suas funções.

**Área de aplicação:** Poderá ser aplicada em cursos como Agronomia, Ciências Biológicas e Zootecnia, e nas disciplinas de: Anatomia animal comparada, Apicultura, Entomologia, Sistemática animal e Zoologia de invertebrados.

**Material utilizado:** Estereomicroscópio (lupa), pinça, placa de Petri, potes com tampa, de preferência transparentes, rede entomológica (puçá).

### Procedimento

Em campo, preferencialmente pela manhã, onde há uma maior quantidade de flores abertas, bem como de polinizadores, colete uma ou mais abelhas com o puçá e

coloque-as dentro dos potes e leve para o laboratório;

No laboratório, coloque os potes dentro de um congelador e deixe-os lá por 10 minutos, até que as abelhas não apresentem mais movimentos; Utilizando uma pinça retire a abelha do pote, coloque-a na placa de Petri e leve-a para o estereoscópio e faça as observações de sua morfologia externa, procurando relacionar as estruturas com suas respectivas funções.

### Discutindo conceitos

1. Quais são as diferenças morfológicas entre zangões, operárias e rainhas?
2. Qual é a importância do surgimento das corbículas presentes nas pernas posteriores de abelhas como *A. mellifera*?
3. Qual é a relação entre a forma e a função do aparelho bucal de *A. mellifera*?
4. Qual é a relação das antenas com a comunicação das abelhas?

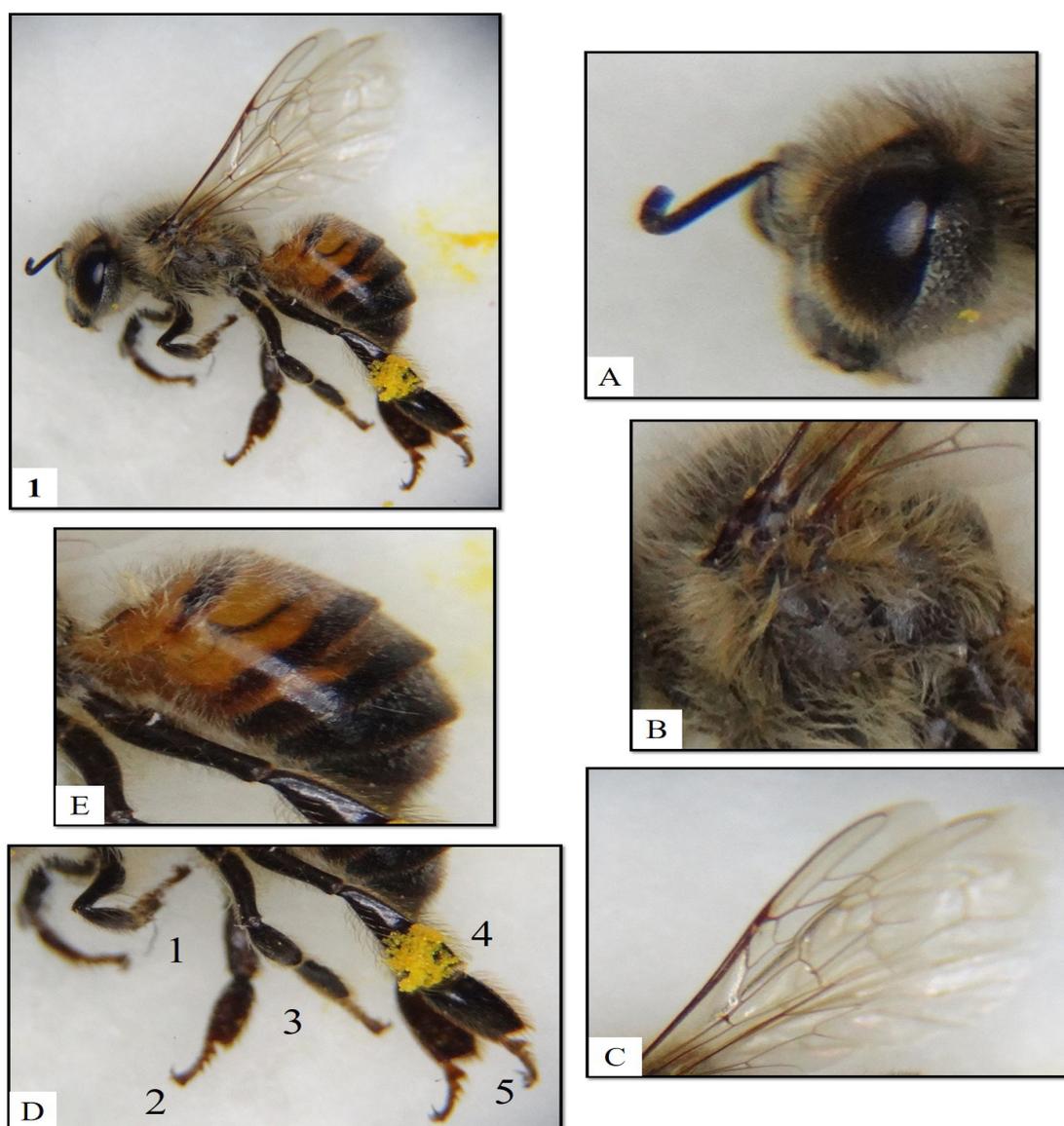


Figura 1- Morfologia externa de *Apis mellifera*. A- cabeça; B- tórax; C- asas; D- pernas (1- pernas anteriores, 2- garra, 3- pernas médias, 4- corbícula, 5- pernas posteriores); E- abdômen.

Fonte: arquivo da pesquisadora



Figura 2- Morfologia externa da cabeça de *Apis mellifera*. A- olho composto; B- alvéolo antenal; C- clípeo; D- antena; E- labro; F- glossa.

Figura 3- Antena de *Apis mellifera*. A- flagelo; B- flagelômeros; C- pedicelo; D- escapo.

Figura 4- Coleta de *Apis mellifera* com puçá. Fonte: arquivo dos pesquisadores

## Prática 2 - Comportamento de Forrageio por *Apis mellifera*

### Introdução

Forrageio ou forrageamento é o termo ecológico empregado para a saída de um animal a procura de alimento. No caso das abelhas, durante esse processo, enquanto visitam inúmeras flores para se alimentarem seja de pólen, néctar, resinas ou óleos, acabam acidentalmente realizando a polinização (FERREIRA, 2015).

A quantidade de alimento coletado depende da necessidade da colônia e da disponibilidade de recursos. Abelhas da espécie *Apis mellifera* possuem alta eficiência no forrageamento de diferentes plantas, sendo as abelhas operárias as responsáveis pela coleta (Figuras 1 a 4) e acondicionamento de recursos florais como o néctar e o pólen.

O pólen representa a principal fonte proteica para imaturos dentro das células de cria, e sua coleta ocorre diretamente das anteras (Figura 1) a partir do aparelho bucal ou outras regiões corpóreas, sendo consumido diretamente (AGOSTINI; LOPES; MACHADO, 2014) ou guardado e carregado para o ninho nas corbículas (Figura 4) (PINHEIRO et al., 2014). Possuindo muito mais do que açúcar, o néctar é produzido como oferta para os polinizadores, já que o animal geralmente o consome e de forma involuntária se responsabiliza pelo transporte de pólen, contribuindo para a reprodução da planta (AGOSTINI; LOPES; MACHADO, 2014). O própolis é coletado de cascas ou de brotos presentes nas árvores e utilizado para preencher fissuras e aberturas

nas paredes dos ninhos. Já a água não é estocada, sendo coletada apenas quando necessário, e utilizada para diluir estoques de mel, e esfriar os ninhos quando estão muito quentes (FREE, 1980). Ainda de acordo com o autor, néctar e água comumente são transportados no papo e pólen e própolis na corbícula. As abelhas podem coletar apenas pólen, apenas néctar, ou ambos simultaneamente (Figura 4). Adicionalmente, óleos e resinas (Figura 3) podem ser coletados e utilizados na construção dos ninhos ou, no caso do óleo, misturado ao pólen e ofertado às larvas como alimento (PINHEIRO et al., 2014).

A caracterização dos ecossistemas de acordo com as espécies vegetais responsáveis por fornecerem recursos para as abelhas melíferas e a relação dos fatores ambientais que intervêm na realização das coletas e desenvolvimento das abelhas é importante, pois, permitem não só melhorar as práticas de manejo, mas também colaborar para a racionalização da criação das mesmas, essenciais tanto para a produção de mel, como para a polinização (MUNIZ; SILVA, 2011).

### Roteiro da Prática

**Conceitos estudados:** Aspectos de forrageio apresentados por *A. mellifera*

**Área de aplicação:** Disciplinas de Botânica e Ecologia dos cursos de Ciências Biológicas, Agronomia, Zootecnia, Gestão Ambiental e áreas afins.

**Material utilizado:** Câmera fotográfica, cronômetro, ficha de campo, lápis.

### Procedimento

As plantas visitadas pela *A. mellifera* devem ser identificadas e numeradas. Registre a condição do tempo (chuvoso, nublado ou ensolarado) na ficha de campo, bem como o horário em que ocorreram as visitas. Deve ser observado e anotado que tipo de recurso floral as abelhas estão coletando: néctar, quando as abelhas não manipulam as anteras e encontram-se com a língua disposta em alguma abertura ou no tubo floral; pólen, quando as mesmas manipulam as anteras com as pernas dianteiras, coletando o pólen e passando posteriormente para as corbículas (Figura 4) nas pernas posteriores; ou outros recursos como resinas e óleos. Registre também se durante as visitas há o contato das abelhas com as estruturas reprodutivas (anteras e estigma), bem como a quantidade de flores abertas na inflorescência, a quantidade de flores visitadas e o tempo de permanência na inflorescência (contabilizado com o auxílio do cronômetro). A área para a realização da prática deve apresentar diversas espécies com flores, como arbustos, árvores e herbáceas. Em campo, realize observações e registros fotográficos acerca do comportamento de *A. mellifera* e outras abelhas em suas visitas às flores presentes na área. A atividade deverá ser dividida em quatro intervalos de 45 minutos separados por pausas de 15 minutos.

### Discutindo conceitos

1. Que comportamento *A. mellifera* apresentou com maior frequência durante

as observações em relação às espécies visitadas, recurso coletado, polinização e duração das visitas?

2. De acordo com as observações, qual recurso foi mais explorado por *A. mellifera*? Por quê?

3. Em qual horário ocorreu o maior número de visitas? A que isto pode estar relacionado?

4. Caracterize as espécies vegetais visitadas quanto a:

a) coloração;      b) odor;      c) tamanho;      d) presença de guias de néctar

### Ficha de Campo

**Espécie/nome popular:**

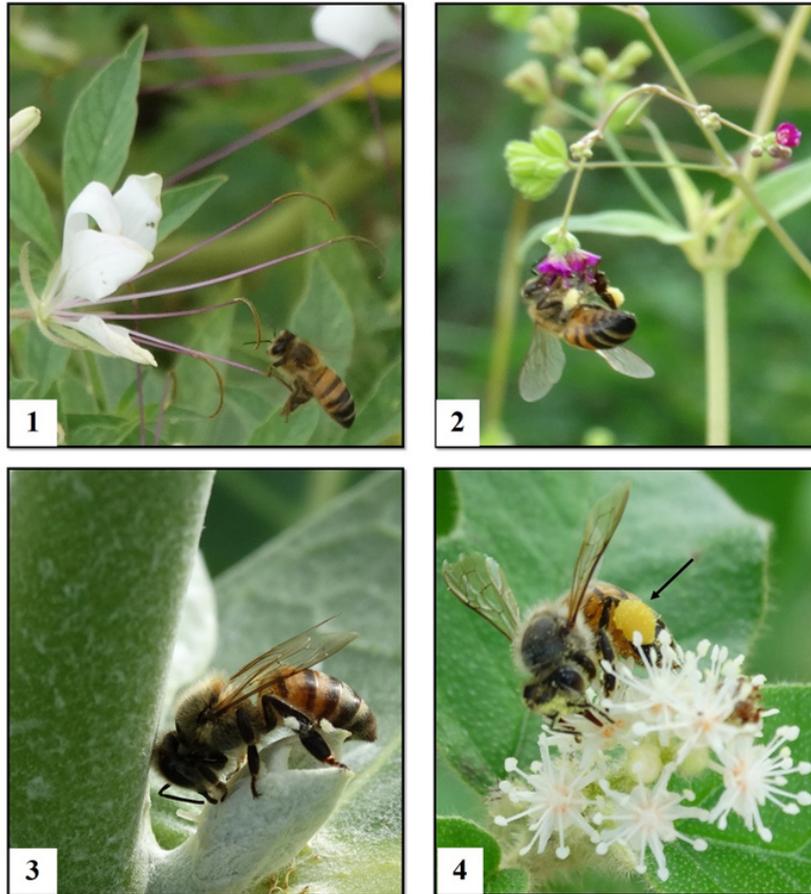
**Código do coletor:**

**Local:**

**Data:**

**I** – intervalo; **T** – (C = chuvoso, N = nublado, S = ensolarado); **NP** – número da planta; **QA** – quantidade de flores abertas na inflorescência observada; **HV** – horário da visita; **RC** – recurso coletado (N = néctar, P = pólen, R = resina, O = óleo, OT = outros); **CR** – contato com estruturas reprodutivas (A = Anteras E = Estigma); **QF** – quantidade de flores; **TI** – tempo na inflorescência.

I	T	NP	QA	HV	RC	CR	QF	TI



### Prática 3 – Eficiência da polinização

#### Introdução

Por serem organismos sésseis, as plantas desenvolveram um conjunto de características que proporcionam certa mobilidade na busca por um parceiro reprodutivo (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2011). As flores são responsáveis por atraírem os animais polinizadores e investem em recursos e estruturas para isso (GONÇALVES, LORENZI, 2011). Elas apresentam um conjunto de atributos morfológicos como coloração, guias de néctar e plataforma de pouso que orientam os polinizadores em direção aos recursos, e também atributos fisiológicos como aroma, néctar e resinas que são disponibilizados para os visitantes (JUDD et al., 2009).

Nas figuras de 1 a 4 são observados diversos visitantes nas flores de espécies da caatinga. Na figura 1 pode ser vista uma abelha da espécie *Apis mellifera* coletando pólen, é possível observar uma massa de pólen já coletado por ela em suas corbículas. Nas figuras 2 a 4 foram registrados diferentes visitantes florais (borboleta, mariposa e mosca) em busca de néctar. Eles podem ser classificados em esporádicos, frequentes, oportunistas, generalistas ou especialistas. Para que seja considerado um polinizador efetivo, o visitante precisa efetivar a transferência do pólen das anteras para o estigma de uma flor da mesma espécie, além disso, o visitante deve ter frequência, fidelidade à planta e desenvolver uma rota de voo que favoreça esse processo (ALVES-DOS-SANTOS et al., 2016).

De uma forma geral, as abelhas são consideradas agentes polinizadores, mas

nem todas realizam essa função ecológica e àquelas que o fazem não polinizam qualquer flor, comumente existe algum nível de especificidade entre elas e estes órgãos vegetais. Tal fato pode ser observado na polinização do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), que por ter uma estrutura que eleva o androceu e o gineceu, tem como polinizadores efetivos um número reduzido de abelhas grandes conhecidas como mamangavas, uma vez que apenas estas possuem o tamanho adequado para tocar as partes reprodutivas enquanto procuram néctar (ALMEIDA et al., 2006). As abelhas africanizadas *Apis mellifera* e as arapuás (*Trigona spinipes*) também visitam as flores do maracujá, mas não atuam como polinizadores e podem ainda danificar as flores cortando o nectário com a finalidade de roubar o néctar, sendo assim consideradas pilhadoras, pois são capazes de usar os recursos ofertados pela flor sem realizar a polinização (ALMEIDA et al., 2006).

Galloni et al. (2008) observou que existe uma relação positiva entre a especificidade do polinizador e o sucesso reprodutivo das plantas. Ou seja, quanto maior a fidelidade do polinizador, maior será a probabilidade de fecundação e, portanto, a formação dos frutos. Quando as abelhas são generalistas, realizam muitas visitas a diversas flores, depositando assim pólen de uma espécie no estigma de outra, o que acaba ocasionando a sua obstrução, impedindo assim a germinação de grãos coespecíficos (NEVES, 2008).

Para verificar a eficiência da polinização são feitos experimentos com sacos, geralmente de filó, onde alguns botões florais são ensacados e depois da antese são feitas observações acerca do visitante de interesse: caso ocorra a visita, as flores são novamente recobertas a fim de observar a formação de frutos e se tal polinizador se comporta como pilhador, quando apenas coleta recursos, ou polinizador eficiente (MILFONT, 2012).

Algumas plantas podem ser polinizadas por diferentes grupos, como no caso da *Spondias tuberosa* Arruda, uma espécie endêmica da caatinga que ao receber visita de diferentes abelhas como *A. mellifera* e *Trigona fuscipennis*, são fecundadas, pelo contato da parte ventral do tórax delas com suas anteras e seus estigmas (NADIA; MACHADO; LOPES, 2007).

No caso do *Ziziphus joazeiro*, conhecido popularmente como joazeiro, também endêmica da caatinga, foi observado que na coleta de néctar as abelhas melíferas não tocavam as anteras ou os estigmas das plantas, mas ao se deslocarem na inflorescência em direção à outra flor, elas ocasionavam a transferência dos grãos de pólen aderidos ao seu corpo, para outras flores (NADIA; MACHADO; LOPES, 2007).

## Roteiro da Prática

**Conceitos estudados:** Eficiência de *A. mellifera* como pilhador ou polinizador e seus desdobramentos ecológicos e econômicos.

**Área de aplicação:** Poderá ser aplicada em cursos como Ciências Biológicas, e

nas disciplinas de Biologia da polinização, Botânica e Ecologia.

**Material utilizado:** Ficha de campo, lápis, sacos de filó ou de plástico.

### Procedimento

Escolha uma área que apresente diversas espécies vegetais, em seguida, faça observações acerca das flores visitadas. Com a régua faça a medição das mesmas e observe também os recursos oferecidos, anotando todas essas informações na ficha de campo. Observe se *A. mellifera* toca as partes reprodutivas das flores visitadas e anote. Observe por 5 minutos quantas espécies de plantas e quantas flores de cada espécie são visitadas e anote na ficha de campo. A visita de muitas flores da mesma espécie pode indicar fidelidade, podendo assim ser um indicativo de que o visitante é um polinizador eficiente. Selecione alguns botões florais e ensaque-os utilizando sacos de filó ou de plásticos. Observe os botões florais ensacados semanalmente até que os mesmos abram-se.

Após a abertura dos botões florais, desensaque-os e observe a primeira visita de *A. mellifera* às flores. Em seguida, ensaque novamente as flores visitadas para que se evite o contato com outros visitantes, e aguarde de uma a duas semanas para que ocorra a formação dos frutos. A formação dos mesmos indicará a eficiência de *Apis* em suas visitas.

### Discutindo conceitos

1. Em quais vegetais foi possível observar *A. mellifera* tocando as partes reprodutivas?
2. Em quais espécies de plantas ficou evidente a eficiência de *A. mellifera*? Outro visitante foi observado?
3. Que outras espécies, além de *A. mellifera* foram observadas? O visitante tocou as partes reprodutivas das plantas?
4. Em que local no polinizador o pólen se depositou? É a mesma região que toca o estigma das flores visitadas?
5. O visitante apresentou comportamento de pilhador? Foi possível observar outras formas de acesso aos recursos como, por exemplo, a construção de orifícios no tubo da corola das flores, ou acesso ao recurso pelo lado de fora da flor?

## FICHA DE CAMPO

Visitante observado	Flor visitada	Tamanho da flor	Recurso oferecido	Número de flores visitadas	Contato com regiões reprodutivas (sim/não)

### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, e em virtude da escassez de materiais didáticos de aulas práticas com sugestões para auxílio de professores e alunos do ensino superior, é possível afirmar que os roteiros produzidos neste trabalho poderão ser ferramentas úteis para a elaboração de aulas práticas, não apenas sobre a polinização no bioma caatinga, mas podendo ser adequados pelo docente de acordo com a região em que a prática será realizada.

Apesar de existirem muitos trabalhos que abordem a importância da polinização, poucos trazem atividades práticas para serem realizadas em campo, o que justifica a produção de mais materiais com esse propósito a fim de colaborar para o ensino e a aprendizagem das relações existentes entre plantas e polinizadores e a influência da espécie africanizada *Apis mellifera* nestas interações.

### REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, K., LOPES, A. V., MACHADO, I. C. Recursos Florais. RECH, A. R., AGOSTINI, K., OLIVEIRA, P. E., MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultura, 2014. 130-150.
- ALMEIDA, A. M. de. VIANA, B. F.; PIOVESAN, J. C.; SOUZA, L de. **O maracujá-amarelo e seus polinizadores na região do vale médio São Francisco**: manual do produtor. Salvador, 2006. Disponível em: <[http://www.labea.ufba.br/polinfrut/manuais/manual\\_maracuja.pdf](http://www.labea.ufba.br/polinfrut/manuais/manual_maracuja.pdf)> Acesso em: 13/06/17
- ALVES-DOS-SANTOS, I.; SILVA, C. I. da. KLEINERT, A. de M. **Quando um visitante floral é um polinizador?**. Revista Rodriguésia, v. 67, n. 2, 2016.
- FERREIRA, B. **Manual de boas práticas agrícolas: conservação e manejo de polinizadores para uma agricultura sustentável**. Rio de Janeiro: Funbio, 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/57-polinizadores>> Acesso em: 10/04/17
- FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. 13ª Ed. São Paulo: EPU, 1980 79p.
- FREITAS, B. M.; ALVES, J. E.; **Efeito do número de visitas florais da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma**. Revista Ciência Agronômica, v. 39, n. 1, p. 148-154, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n5/a10v37n5.pdf>> Acesso em: 10/05/17
- FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E.; **Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae)**. Revista Brazilian Journal of Botany, v. 25, n. 3, p. 311-321, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042002000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042002000300007)>

Acesso em: 11/04/17

GALLONI, M.; PODDA, L.; VIVARELLI, D.; QUARANTA, M.; CRISTOFOLINI, G. **Visitor diversity and pollinator specialization in Mediterranean legumes**. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, v. 203, n. 1, p. 94-102, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367253007001260>> Acesso em: 10/06/17

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estados da Flora, 2011. 51 p.

GOULSON, D.; **Effects of introduced bees on native ecosystems**. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 34, n. 1, p. 1-26, 2003. Disponível em: <<http://annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132355>> Acesso em: 08/05/17

IPECE, **Ceará em mapas**. 2007. Disponível em: <<http://www2.ipece.ce.gov.br/atlas/capitulo1/12/index.htm>> Acessado em: 20/09/2016

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. H.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**; 3ª.ed – Porto Alegre: Artmed, 2009. 611 p.

MARQUES, M. F.; MENEZES, G. B.; DEPRÁ, M. S.; DELAQUA, G. C. G.; HAUTEQUESTT, A. P.; MORAES, M. C. M.; **Polinizadores na agricultura, ênfase em abelhas**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/57-polinizadores?download=1232:polinizadores-na-agricultura-%C3%AAnfase-em-abelhas>> Acesso em: 05/10/16

MAUÉS, M. M.; MARTINS, M. B. Polinização em florestas tropicais: lições de Caxiuana. **Revista Ciência e Natureza**, Belém, v. 9, n. 3, p. 451-454, set.- dez. 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/119399/1/introducao.pdf>>. Acesso em: 10/07/2016

MENDES, G. S.; LIMA, S. T da. SILVEIRA, E. S. da M.; **Recursos de apoio didático para o ensino de biologia: alternativas para o desenvolvimento de novas competências docentes**. VI Colóquio Internacinal “educação e contemporaneidade”, São Cristovão-Sergipe, 20 a 22 de setembro de 2012. Disponível em: <[http://educonse.com.br/2012/eixo\\_06/PDF/42.pdf](http://educonse.com.br/2012/eixo_06/PDF/42.pdf)> Acesso em: 04/04/17

MILFONT, M. de O. **Uso da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na polinização e aumento de produtividade de grãos em variedade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) adaptada às condições climáticas do nordeste brasileiro**. 129f. Tese de doutorado (Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba. 2012. Disponível em: <[http://s1f0aff4f90bc0724.jimcontent.com/download/version/1432556604/module/9240129271/name/tese2012\\_marcelo%20de%20oliveira%20milfont.pdf](http://s1f0aff4f90bc0724.jimcontent.com/download/version/1432556604/module/9240129271/name/tese2012_marcelo%20de%20oliveira%20milfont.pdf)> Acesso em: 19/07/16

MORAES, T. da S.; **Estratégias inovadoras no uso de recursos didáticos para o ensino de ciências e biologia**. 144 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Gestão e Tecnologias Aplicadas à Educação) – Universidade do Estado da Bahia. 2016. Disponível em: <<http://www.uneb.br/gestec/files/2016/04/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Tatyane-da-Silva-Moraes2.pdf>> Acesso em: 04/04/17

MUNIZ, F. H.; SILVA, J. M. Preferências alimentares de abelhas *Apis mellifera* L. em ecossistemas e agroecossistemas do município de São Bento – Baixada Maranhense, Brasil. XIMENES, L. J. F.; COSTA, L. S. de A.; NASCIMENTO, J. L. S. do. **Manejo racional de abelhas africanizadas e de meliponíneos no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2011.

NADIA, T. de L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. **Fenologia reprodutiva e sistema de polinização de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): atuação de *Apis mellifera* e de visitantes florais autóctones como polinizadores**. Revista Acta Botanica Brasilica. 835-845, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v21n4/a08v21n4.pdf>> Acesso em: 20/02/17

NADIA, T de L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Polinização de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) e análise da partilha de polinizadores com *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), espécies frutíferas e endêmicas da caatinga. **Revista Brasileira de Botânica**. v.30, n.1, p.89-100, janeiro.-março. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v30n1/a09v30n1.pdf>> Acesso em: 20/02/17

NEVES, E. L. das. **Polinização de espécies nativas da caatinga e o papel da abelha exótica *Apis mellifera* L.** 2008. 145f. Tese de doutorado (Pós-graduação em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana Bahia, 2008. Disponível em: <<http://www.ppgbot.uefs.br/teses-dissertacoes/downloads/60/polinizacao-de-especies-nativas-da-caatinga-e-o-papel-da-abelha-exotica-apis-mellifera-l.pdf>> Acesso em: 19/07/16

NEVES, E.L.; VIANA, B.F. **As abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) visitantes florais em um ecossistema de dunas continentais no médio Rio São Francisco, Bahia, Brasil.** Revista Brasileira de Entomologia, [online], v. 46, n. 4, p. 571-578, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbent/v46n4/a12v46n4.pdf>>. Acesso em: 10/07/2016

PEREIRA C. J. E.; LIMA, J. R.; GALLÃO, M. I. **Aulas Práticas de Biologia em uma escola pública do ensino médio no Estado do Ceará: Estudo de caso.** Revista da SBEnBio: V Enebio e II Erebio Regional 1. n. 07, p.1410-1422, outubro. 2014. Disponível em: <<http://www.sbenbio.org.br/wordpress/wpcontent/uploads/2014/11/R0552-1.pdf>> Acesso em: 05/05/17

PINHEIRO, M.; GAGLIONE, M. C.; NUNES, C. E. P.; SIGRIST, M. R.; SANTOS, I. A. dos. Polinização por abelhas. RECH, A. R., AGOSTINI, K., OLIVEIRA, P. E., MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização.** Rio de Janeiro: Projeto Cultura, 2014. 205-234

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011.

SILVA, C. I. da. ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; **Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil.** São Paulo, 2014, 50p. Disponível em: <[http://www.semabelhasemalimento.com.br/wp-content/uploads/2015/02/Guia\\_abelhas-polinizadoras\\_02\\_junho\\_2014-1\\_web.pdf](http://www.semabelhasemalimento.com.br/wp-content/uploads/2015/02/Guia_abelhas-polinizadoras_02_junho_2014-1_web.pdf)> Acesso em: 09/10/16

SILVA, T. S.; LANDIM, M. F.; **Aulas práticas no ensino de biologia: análise da sua utilização em escolas no município de Lagarto/SE.** VI Colóquio Internacional “educação e contemporaneidade”, São Cristóvão, Sergipe, 20 a 22 de setembro, 2012. Disponível em: <[http://educonse.com.br/2012/eixo\\_06/PDF/5.pdf](http://educonse.com.br/2012/eixo_06/PDF/5.pdf)> Acesso em: 10/04/17

TOLEDO, G. N.; COITINHO, R. N.; MENDONÇA, D.; LIMA, M.M. de. **Gincana ambiental: uma proposta educativa de sensibilização quanto ao descarte correto dos resíduos sólidos.** In: ATENA EDITORA. Impactos das tecnologias nas ciências biológicas e da saúde [recurso eletrônico]. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. 251 p.

VIVEIRO, A. A.; DINIZ, R. E. da S.; **As atividades de campo no ensino de ciências: reflexões a partir das perspectivas de um grupo de professores.** São Paulo: Editora UNESP; São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009. 27-42. Disponível em: <<http://static.scielo.org/scielobooks/g5q2h/pdf/nardi-9788579830044.pdf>> Acesso em: 10/04/17

## IMAGENS ANALÓGICAS EM LIVROS DIDÁTICOS DE BIOLOGIA

### Francisco Alves Santos

Licenciado em Ciências Biológicas  
Faculdade de Educação de Itapipoca-FACEDI/  
UECE

### Andréa Pereira Silveira

Docente da Universidade Estadual do Ceará,  
campus Itapipoca (FACEDI) e do Mestrado  
Profissional em Ensino de Biologia (PROFBio-  
UECE) – CE

### Isabel Cristina Higino Santana

Docente da Universidade Estadual do Ceará,  
campus Itapipoca (FACEDI) e do Mestrado  
Profissional em Ensino de Biologia (PROFBio-  
UECE) – CE

**RESUMO:** O uso de analogias no ensino tem sido tema recorrente entre as muitas pesquisas desenvolvidas contribuindo de forma significativa no processo de aprendizagem de conceitos complexos e abstratos a partir de domínios já conhecidos. Em relação às imagens analógicas nos livros didáticos, nem sempre é o que se espera da função requerida pelo instrumento. Neste trabalho busca-se refletir sobre o uso das imagens analógicas como forma de pensar sua utilização na sala de aula. Assim, no presente estudo foi quantificado e avaliado o uso das imagens presentes em coleções didáticas de Biologia adotadas em escolas públicas de ensino médio do município

de Itapipoca, no estado do Ceará. O estudo de natureza descritivo-analítica utilizou a investigação documental como metodologia de pesquisa. Verificou-se que o mapeamento entre similitudes e diferenças existentes na relação analógica se faz necessário para que as representações analógicas ocorram de forma exitosa. Os manuais de apoio aos professores precisam destacar a necessidade de problematizar o uso de analogias presentes nos textos, sugerindo sua potencialidade enquanto ferramenta didática. Percebeu-se ainda, que o uso das imagens analógicas é pouco explorado pelos autores de livros didáticos, estando o seu uso principalmente concentrado em conteúdos relacionados à bioquímica. Embora historicamente utilizadas para comunicar conceitos, quando exploradas de forma equivocada podem perder sua função inicial de explicação e aproximação com os conhecimentos prévios, passando então a ser compreendida como parte do conteúdo apreendido pelo estudante, ou seja, favorecendo uma aprendizagem errônea do conceito científico.

**PALAVRAS-CHAVE:** analogia, ensino, aprendizagem, conhecimento prévio.

**ABSTRACT:** The use of analogies in teaching has been a recurring theme among the many researches developed contributing significantly

to the learning process of complex and abstract concepts from domains already known. In relation to analogue images in textbooks, it is not always what is expected of the function required by the instrument. In this work seek to reflect on the use of analogue images as a way of thinking about their use in the classroom. Thus, the present study was quantified and evaluated the use of the images present in didactic collections of Biology adopted in public high schools of the municipality of Itapipoca, in the state of Ceará. The descriptive-analytical study used documentary research as a research methodology. It was verified that the mapping between similarities and differences existing in the analog relation is necessary for the analogical representations to occur successfully. The manuals to support teachers needs to highlight the necessity to problematize the use of analogies in the texts, suggesting their potential as a didactic tool. It was also noticed that the use of the analogical images is little explored by the authors of didactic books, being their use mainly concentrated in contents related to the biochemistry. Although historically used to communicate concepts, when mistakenly explored, they may lose their initial function of explanation and approximation with previous knowledge, and then be understood as part of the content apprehended by the student, that is, favoring an erroneous learning of the scientific concept.

**KEYWORDS:** analogy, teaching, learning, priors knowledge.

## 1 | INTRODUÇÃO

O homem convive diariamente com informações visuais, textuais ou orais e constrói em sua mente as representações dessas informações (MORAIS, 2009). Diante deste fato, o livro didático, principal ferramenta utilizada na sala de aula pelos professores, articula diversos elementos para transferir uma mensagem, sejam eles modelos ou recursos linguísticos, como analogias e metáforas; ou visuais como gravuras, representações gráficas ou expressões matemáticas.

Tais estratégias de comunicação decorrem do reconhecimento das dificuldades enfrentadas nas tarefas de ensinar e aprender Ciências. Neste sentido as imagens são instrumentos facilitadores que auxiliam no entendimento dos muitos conceitos científicos através da representação de estruturas, ou de suas partes. Para uma discussão coerente acerca do tema que norteia esse trabalho, é necessária uma apresentação do mesmo no intuito de gerar o entendimento esperado sobre a temática. Deste modo trataremos de expor inicialmente a temática analogia quanto às concepções de alguns autores.

Falar de analogia requer um entendimento inicial quanto ao conceito atribuído a esta. No artigo intitulado “analogias na educação em ciências contributos e desafios”, Duarte (2005) faz uso de alguns autores e suas definições acerca do termo, como,

Originariamente, analogia era um conceito matemático que significava proporção (HAARAPANTA, 1992). Contudo, posteriormente, ela desvia-se desta visão tecnicista na medida em que se considera que não corresponde a uma identidade de duas relações, mas antes assegura uma similitude de correlações (PERELMAN, 1993). A analogia não pressupõe, portanto, a existência de uma igualdade simétrica,

mas antes uma relação que é assimilada a outra relação, com a finalidade de esclarecer, estruturar e avaliar o desconhecido a partir do que se conhece. [...] Para isso que envolve uma comparação explícita de duas coisas, uma definição de informação nova em termos já familiares, ou um processo através do qual se identificam semelhanças entre diferentes conceitos, sendo um deles conhecido, familiar, e o outro desconhecido (GLYNN, 1991). (DUARTE, 2005, p. 8).

São comparações que fazemos no nosso cotidiano, e na prática docente, e tais comparações podem ser instrumentos de ensino ou ferramentas didáticas que utilizados de maneira fundamentada, torna-se um elemento condutor na construção do conhecimento (SANTOS; FEITOSA; SANTANA, 2016). Desempenham um papel chave na construção do conhecimento científico quando se observa aspetos relacionais entre um domínio familiar - análogo e um domínio desconhecido - alvo, e podem ser poderosas ferramentas para a aprendizagem de Ciências (MOZZER; JUSTI, 2013).

É um processo cognitivo que segundo Newby (1987), envolve uma comparação explícita de duas “coisas”, uma apresentação de informações novas em termos familiares. Correspondem de acordo com Duit (1991) e Treagust, Duit e Joslin (1992), a comparações baseadas em similaridades entre estruturas pertencentes a domínios diferentes, ou seja, um domínio que é desconhecido e outro que é familiar. Percebe-se entre os autores um consenso quanto a essa questão do entendimento e do papel das analogias no contexto do ensino e da aprendizagem.

O uso de analogias na educação básica tem sido tema recorrente entre as muitas pesquisas desenvolvidas e, tem contribuído de forma significativa no processo de aprendizagem de conceitos complexos e abstratos a partir dos domínios já conhecido pelos alunos (FERRAZ; TERRAZZAN, 2001; DUARTE, 2005; ZAMBON; TERRAZZAN, 2013; SANTOS; TERÁN; NAGEM, 2013; SANTANA; DIAS, 2014; PEDROSO; AMORIM, 2009). No nível superior, o uso desse instrumento entre os docentes é comum, e são usadas a partir do desenvolvimento em sua prática docente, como também aquelas que se encontram em livros didáticos (FRANCISCO JR.; FRANCISCO; OLIVEIRA, 2012).

Existe na concepção de Andrade et. al. (2014), várias formas de explicar um conteúdo aos alunos, sem necessariamente minimizar ou diferir quanto ao nível de formação. Para eles “[...] não significa criar imagens distorcidas do conteúdo, mas possibilitar o contato com um universo mais próximo do real e com relações de significado contextual” (ANDRADE et al, 2014, p.2).

No artigo “o uso de analogias em textos escritos” Curtis e Reigeluth (1984) apresentaram seis categorias de análises para classificar as analogias encontradas em livros didáticos para ensino nas áreas de ciências naturais, biologia, física e geologia. As categorias foram relações analógicas, formato de apresentação, condição, posição, nível de enriquecimento e orientação pré-tópico. Esses autores consideram que esse instrumento é útil quando usado no processo de explicação e instrução, embora ainda seja necessária uma maior exploração acerca da relação das características do aprendiz para a aprendizagem analógica.

Ainda nessa linha de investigação, Gonçalves e Julião (2016), pesquisando sobre as analogias em livros didáticos destinados ao ensino superior de Química, além de elencar outras categorias a partir do material de Curtis e Reigeluth (1984), destacam outras categorias, como nível de mapeamento e quanto à apresentação de limitações do análogo quando comparado ao alvo, em que nesse sentido “... o autor da analogia **não reconhece limitações, reconhece limitações** e ate mesmo **discute as limitações.**” (GONÇALVES; JULIÃO, 2016, p. 95). Eles consideram entre outras, que o emprego das analogias quando voltado ao ensino de química deve ser articulado a um planejamento, posto o reconhecimento de suas vantagens e desvantagens serem fatores importantes no processo de ensino e aprendizagem.

Esta forma de comunicação segundo Mendonça, Justi e Oliveira (2006), são populares em ciências, por auxiliarem a comunicação e o entendimento de problemas. Sendo então fundamental compreender esta forma de linguagem.

A apresentação das analogias ao longo das práticas de ensino pode ser realizada de diferentes maneiras, como a verbal, por exemplo, entre professores e alunos, ou ainda associadas a modelos e imagens, através de representações esquemáticas estampadas em quadros brancos, livros, revistas e entre outros. Nesta situação, para Aumont,

“[...] a analogia pictórica (ou, em geral, a analogia icônica) tem sempre duplo aspecto: [...] o aspecto mapa (map): a imitação da natureza passa por esquemas múltiplos: esquemas mentais vinculados a universais, que visam tornar a representação mais clara ao simplificá-la; esquemas artísticos oriundos da tradição e cristalizados por ela etc.” (AUMONT, 1993, p.199)

Cada uma das diferentes possibilidades pode ser considerada na visão de Martins (2006) mais ou menos apta em lidar com demandas comunicativas, como, por exemplo, mostrar, descrever e explicar. As analogias estão presentes no discurso dos docentes e nos livros textos adotados em instituições de ensino (SANTANA, 2014; FELIPE, GALLARRETA; MERINO, 2016). Elas são importantes por que no ensino da química, por exemplo, existe uma grande dificuldade em relacionar os níveis macroscópico com o microscópico e o simbólico (ORDENES, et. al., 2014).

Imagens analógicas são possíveis modelos representativos da realidade, que podem ser utilizá-las como ferramentas didáticas no processo de ensino (MORAIS, 2009). Ou seja, é necessário que além da questão do conhecimento prévio haja também o aspecto interacional entre os sujeitos em formação e as analogias. Para Vosniadou & Ortony (1989) há um consenso acerca do que fundamenta as analogias. Para esses autores, essa fundamentação se baseia em “[...] processos cognitivos e interacionais e deve ser estudada no seu uso e no contexto da conceptualização, do processamento mental e da experiência individual, social e cultural.”

Nessa mesma linha de raciocínio se destacam as ideias de Cachapuz (1989) e Suton (1992), quando afirmam serem as analogias uma alternativa que auxilia o aluno na construção do conhecimento, quando o foco de aprendizagem está nos conceitos

complexos em diversos conteúdos. Isto é, elas são entendidas como um processo cognitivo que envolve, além do texto escrito e falado, as imagens visuais. (MORAIS, 2009). Para Nagem et. al., (2001), utilizar analogias no processo ensino-aprendizagem é um processo defendido por alguns autores, pois tal ferramenta colabora com a ação de mudança conceitual, principalmente em se tratando de conceitos científicos abstratos e complexos. Na concepção de Duit (1991), elas, as analogias, são de fato,

“[...] valiosas ferramentas para mudanças conceituais, pois abrem novas perspectivas, facilitam o entendimento do abstrato, incitam o interesse dos alunos, podem ter função motivacional e ainda encorajam o professor a levar em consideração o conhecimento anterior dos alunos. (DUIT, 1991, p. 198)”.

O que se observa nos livros didáticos em relação às imagens analógicas, nem sempre é o que se espera da função requerida pelo instrumento em si, como destaca Monteiro e Justi (2000), em sua pesquisa ao analisar coleções didáticas destinadas ao ensino médio referente à disciplina de Química. Nela, eles verificaram que inúmeras imagens analógicas aplicadas não contribuem para o processo de aprendizagem, são ilustrações desnecessárias que complicam a compreensão da analogia e que induzem, na verdade, a erros conceituais.

Outra pesquisa, também com livros didáticos de Química realizada por Bernardino, Rodrigues e Bellini (2013), destacou que atribuir características humanas aos análogos ilustrados podem provocar prejuízos à aprendizagem dos alunos. Em virtude das considerações apresentadas quanto ao uso desse instrumento didático cabe questionar, como as imagens analógicas se apresentam nas coleções de didáticas de Biologia destinadas ao ensino médio? Este entendimento se faz necessário no sentido de analisar a relevância desse recurso, e ainda, colaborar no entendimento das possibilidades e eficiência das analogias como ferramentas para a construção de conceitos científicos. Neste movimento as ideias de Francisco Junior (2008) dialogam de forma positiva com este trabalho quando defende o uso das analogias numa perspectiva problematizadora como forma de pensar a utilização das mesmas na sala de aula.

Deste modo, no presente estudo buscou-se quantificar e avaliar o uso das imagens analógicas presentes nas coleções didáticas adotadas por três escolas públicas de ensino médio do município de Itapipoca, região norte do estado do Ceará.

## 2 | ASPECTOS METODOLÓGICOS

O estudo ora relatado constitui-se de uma investigação de natureza descritiva-analítica, utilizando como metodologia de pesquisa, a investigação documental, prática na qual se examina materiais que ainda não receberam um tratamento analítico, ou que podem ser (re)examinados com vistas a uma interpretação nova ou complementar (GIL, 2008). Após a coleta de dados, os mesmos foram tratados através da abordagem qualitativa.

O material investigado – três coleções didáticas – é adotado em escolas públicas de ensino médio do município de Itapipoca no estado do Ceará. As três coleções já analisadas e aprovadas pelo Programa Nacional do Livro Didático – PNLD (2014), e não fazendo qualquer menção à presença de analogias nas mesmas, são: *Biologia Hoje*, *Bio* e *Biologia em Contexto*, sendo neste processo de investigação, identificadas pelas letras A, B e C, respectivamente, como ilustrado no quadro 1.

SIMBOLO	COLEÇÕES DIDÁTICAS
<b>A</b>	LINHARES, S. V.; GEWANDSZNADJER, F. <b>Biologia hoje</b> . 2ª ed. Ed Ática, 2013.
<b>B</b>	LOPES, S.; ROSSO, S. <b>Bio</b> . 2ª ed. São Paulo: Saraiva, 2013.
<b>C</b>	AMABIS, J. M.; MARTHO, G.R. <b>Biologia em contexto</b> . 1ª ed. São Paulo: Moderna, 2013.

Quadro 1: Identificação das coleções analisadas

Fonte: Os autores.

Para a discussão foi considerado um conjunto de pesquisas a nível nacional que tem investigado como foco o uso das analogias em contexto didático, nos amparando principalmente no que concerne a presença e uso de imagens analógicas enquanto instrumento didático.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigar a presença e adequação de imagens analógicas no ensino de Biologia representa o reconhecimento dessas enquanto ferramentas de ensino, possibilitando (re)pensar sua abordagem no exercício docente e na construção de conhecimento e conceitos científicos. Para Moraes (2009) tais imagens exercem seu potencial enquanto instrumento didático, se o docente se apropriar destas, dominando-as e em seguida, problematizando-as junto ao seu aluno, levando-os assim a uma efetiva construção dos conceitos estudados.

Durante o levantamento dos dados foi compilado 12 representações analógicas distribuídas nas coleções A, B, e C, (Tabela. 1).

Coleções Didáticas	A				B				C			
	v.1	v.2	v.3	Total	v.1	v.2	v.3	Total	v.1	v.2	v.3	Total
<b>Imagens Analógicas</b>	3	–	–	<b>3</b>	2	2	–	<b>4</b>	1	4	–	<b>5</b>

Tabela 1: Distribuição das representações analógicas nas coleções de livros didáticos analisados.

Fonte: Os autores.

Diante desta distribuição observou-se uma predominância do emprego desta forma de representação analógica principalmente na abordagem de temas abstratos, como *estrutura proteica*, *enzimas*, *Ácido Desoxirribonucleico- DNA*, e ainda, na

atividade de exploração de conceitos abstratos como o *efeito gargalo*. O emprego deste recurso para o trabalho com temas abstratos corroboram com o entendimento de Pedrosa Amorim e Terrazan (2007, p.10) ao considerar que as figuras, geralmente, auxiliam o aluno a visualizar as características relevantes do análogo, facilitando o estabelecimento das relações entre alvo e análogo.

Esta forma de apresentação analógica é menor quando comparado com a apresentação verbal deste recurso. Todavia, seu uso ocorre de forma constante em situações de ensino de ciências (FELIPE; GALLARRETA; MERINO, 2005). Consciente deste uso é fundamental discutir o emprego destas, pois como afirma Bernardino, Rodrigues e Bellini (2013) durante a análise de livros didáticos de Química, onde destacam ser necessária a atenção na escolha destas imagens, pois, imagens que apresentam aspectos humanos podem causar prejuízo para a aprendizagem.

O emprego adequado destas segundo Monteiro e Justi (2000) é fundamental ao processo de ensino, pois reconhecem sua importância, porém advertem que uso indevido pode levar a uma compreensão errônea acerca dos conceitos estudados. Durante a análise realizada foi verificado que nos manuais dos professores não há orientação para o uso deste recurso, embora sejam considerados como ferramenta ao processo de uma aprendizagem significativa como sugere a coleção A. Nas outras duas coleções não se observou nenhum esclarecimento quanto à presença e utilização da ferramenta em análise.

Sugerimos que este posicionamento decorra do uso inconsciente deste recurso, ou do seu não reconhecimento como instrumento didático, ou ainda, destas analogias já estarem estabelecidas na história das Ciências Biológicas, tornando-se uma analogia morta (OLIVEIRA, 1996).

Nesse sentido, a necessidade de uma atenção especial para o uso desta ferramenta didática, é evidenciar sua presença! Pois, a relação analógica estabelecida nem sempre está clara para o aluno (CLEMENT, 1993), sendo indispensáveis maiores esclarecimentos para que essas exerçam com êxito a função esperada (RIGOLON e OBARA, 2010). Tais considerações partem da compreensão de que há uma carência na formação de professores de momentos que os orientem para o trabalho com este instrumento como indicado nas pesquisas (RIGOLON; OBARA (2010); BOZELLI; NARDI (2006)).

Nessa análise percebeu-se que o uso de representações analógicas ocorrerá de forma exitosa se houver maiores esclarecimentos nos textos para que facilitem a compreensão dos conceitos explorados pelos alunos, ou seja, é preciso haver o mapeamento entre similitudes e diferenças existentes na relação analógica. Outro destaque, para a necessidade de que os manuais de apoio destinado aos professores problematizem o uso de analogias presentes nos textos, ou sugira a estes profissionais fontes de consultas que possam potencializar a utilização desta ferramenta didática.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste levantamento foi possível verificar que a utilização de imagens analógica é pouco explorada pelos autores de livros didáticos, estando o seu uso principalmente concentrado em conteúdos relacionados à bioquímica. Nesta área de concentração muitas das analogias se repetem demonstrando que já fazem parte da construção deste conhecimento. Porém é válido ressaltar que apesar de já historicamente utilizadas para comunicar tais conceitos, quando exploradas de forma equivocada podem perder sua função inicial de explicação e aproximação com os conhecimentos prévios, passando então a ser compreendida como parte do conceito aprendido pelo estudante.

As orientações quanto ao uso destas analogias são essências para que os docentes possam direcionar seus aprendizes frente a situações analógicas, possibilitando compreendê-las apenas como um meio na construção de um determinado entendimento sobre o objeto estudado, podendo em seguida abandoná-la. Neste sentido é necessário que mais estudos sejam realizados, possibilitando ampliar o debate sobre este tema. Todavia outras investigações podem ser desenvolvidas para verificar a compreensão e uso destas imagens no processo de aprendizagens, permitindo verificar o seu valor para as práticas de ensino, assim como evidenciar os conhecimentos dos professores de Biologia e sua relação com este instrumento didático, ou ainda, avaliar o entendimento dos alunos sobre estas representações, posto que as imagens sejam destinadas a estes.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C. S.; SUSSUCHI, E. M.; MAGALHÃES, C.N.; PIOVESAN, A. F. Analogias e metáforas no ensino e aprendizagem do conceito de átomo: breve análise em livros didáticos. *Scientia Plena*. v.10, n.4, p.1-9, 2014.

AUMONT, Jacques. **A imagem**. Tradução: Estela dos Santos Abreu e Claudio C. Santoro - Campinas, SP: Papirus, 1993.

BERNARDINO, M. A. D.; RODRIGUES, M. A.; BELLINI, L. M. Análise crítica das analogias do livro didático público de química do estado do Paraná. **Ciência & Educação**, v. 19, n. 1, p. 135-150, 2013.

BOZELLI, F.C.; NARDI R.O. Discurso analógico no Ensino Superior. In: R. Nardi e M.J.P.M. Almeida. (Ed.), **Analogias, leituras e modelos no ensino da ciência: A sala de aula em estudo**. São Paulo: Escrituras, 2006. p. 11-28.

CLEMENT, J. J. **Using bridging analogies and anchoring intuitions to deal with students' preconceptions in physics**. *Journal of Research in Science Teaching*, v. 30, n. 10, 1993.

CURTIS, R. V.; REIGELUTH, C. M. The use of analogies in written text. **Instructional Science**, New York, v. 13, n. 2, p. 99-117, 1984.

DUARTE, M. da C. Analogias na educação em ciências contributos e desafios. **Investigações em Ensino de Ciências**. v.10, n.1, p. 7-29, 2005.

- DUIT, R. O papel das analogias e metáforas na aprendizagem da ciência. **Ciências da educação**, London, v. 75, n. 6, p. 649-772. 1991.
- FELIPE A. E.; GALLARRETA S. C.; MERINO, G. Aportes para la utilización de analogías en la enseñanza de las Ciencias. Ejemplos en biología del desarrollo. **Revista Iberoamericana de Educación**. Disponível em: <[www.rieoei.org/deloslectores/1233Felipe.pdf](http://www.rieoei.org/deloslectores/1233Felipe.pdf)> . Acesso em: 12 de out. 2015.
- FERRAZ, D. F.; TERRAZZAN, E. A. O uso de analogias como recurso didático por professores de biologia no ensino médio. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 3., 2001, Atibaia-SP. **Atas...** Atibaia – SP, 2001. Disponível em:<<http://www.nutes.ufrj.br/abrapec/iiinepec/Atas%20em%20html/o92.htm>>. Acesso em: 20 de ago.2018.
- FRANCISCO JUNIOR, W. E. Analogias em livros didáticos de química: um estudo das obras aprovadas pelo Plano Nacional do Livro Didático Para o Ensino Médio 2007. **Ciências & Cognição**. v.14, n.1, p.121-143. 2009. Disponível: <<http://www.cien.ciasecognicao.org>>. Acesso em: 01 de jun. 2016.
- GIL. A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas. 2002.
- GLYNN, S. Explaining Science Concepts: A Teaching-with-Analogies Model. In: GLYNN, S. M.; YEANY, R.H. & BRITTON, B.K. (Eds). **The Psychology of Learning Science**. New Jersey:Lawrence Erlbaum Associate, 219-240. 1991.
- GONÇALVES, J.M.; JULIÃO, M.S.S. Analogias em livros didáticos destinados ao ensino superior: química orgânica versus físico-química. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 21, n.3, pp. 92-108, 2016. Disponível em file:///C:/Users/adm/Downloads/256-1376-1-PB.pdf. Acesso em 10 de mai. 2017.
- MARTINS, I. Analisando livros didáticos na perspectiva dos estudos do discurso: compartilhando reflexões e sugerindo uma agenda para a pesquisa. **ProPosições**, n.17, v.49, jan./abr. 2006.
- MENDONÇA, P. C. C.; JUSTI, R.; OLIVEIRA, M. M. Analogias sobre ligações químicas elaboradas por alunos do ensino médio. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**. v. 6, p. 35-54. 2006.
- MONTEIRO, I. G.; JUSTI, R. S. Analogias em livros didáticos de química brasileiros destinados ao ensino médio. **Investigações em Ensino de Ciências**, n.5, v.2, p. 67-91. 2000.
- MORAIS, W. R. **Imagens tridimensionais virtuais no ensino de ciências: o modelo analógico do olho humano**. 2009. 154 f. Dissertação (Mestrado em Educação Tecnológica) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. 2009.
- MOZZER, N. B.; JUSTI, R. Science teachers' analogical reasoning. **Research in Science Education**, vol.43, n.4, p.1689-1713, 2013.
- NEWBY, T. Learning Abstract Concepts: The Use of Analogies as a MediationalStrategy. **Journal of Instructional Development**, n.10, v.2, p. 20-26. 1987.
- OLIVEIRA, M. C. A metáfora, a analogia e a construção do conhecimento científico no ensino e na aprendizagem. Uma abordagem didática. **Tese**. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. 1996.
- PEDROSO, C. V., AMORIM, M. A. L. Uso de uma atividade didática baseada em analogia para o ensino de genética: o que há de comum entre dois prédios iguais e cromossomos homólogos? In. SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2009. **Anais...** PUCRS, 2009. p.1618-1620.

PEDROSO, C. V.; AMORIM, M. A. L. & TERRAZZAN, E. A. Uso de analogias em livros didáticos de Biologia: um estudo comparativo. In: Associação Nacional de Pesquisadores em Educação em Ciência. ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIA, 7., 2007, Paraná: Florianópolis. **Anais...** Paraná: Florianópolis. 2007.

RIGOLON, R. G.; OBARA, A. T. O conceito de analogias por licenciandos de biologia. **Revista Teoria e Prática da Educação**, v. 13, n. 3, p. 19-31, set./dez. 2010.

SANTANA, I. C. H.; DIAS, A. M. I. Reconhecendo as analogias enquanto instrumento didático no processo de formação e no exercício docente por professores de biologia. **Revista Enebio** n7. 2014. p.2945-2956.

SANTOS, S. C. S.; TERÁN, A. F.; NAGEM, R. L. Analogias e metáforas por professores de ciências de escolas municipais de manaus-am, brasil. In. SIMPÓSIO EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS NA AMAZÔNIA, 3., SEMINÁRIO DE ENSINO DE CIÊNCIAS, 8., FÓRUM DE EDUCAÇÃO, DIVULGAÇÃO E DIFUSÃO EM CIÊNCIAS NO AMAZONAS, 2., 2013, Manaus – AM, **Anais...** Manaus – AM, 2013. p. 1-16.

TREAGUST, D. F.; DUIT, R.; JOSLIN, P. Science teachers' use of analogies: observations from classroom practice. **International Journal of Science Education**, n.14, v.4, p.413-422. 1992.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Universidade Estadual do Ceará – UECE e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor.

## SITUAÇÃO DA PREVENÇÃO DE DOENÇAS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS, MORADORAS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DE UM SERVIÇO DE ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE

**Déborah Silveira König**

Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas - RS

**Juvenal Soares Dias da Costa**

Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas - RS

**Denise Silva da Silveira**

Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas - RS

**Cintia Müller Leal**

Instituto Federal Sul-Rio-Grandense  
Pelotas - RS

**Ubirajara Amaral Vinholes Filho**

Universidade Federal de Pelotas  
Pelotas - RS

**RESUMO:** As crianças menores de cinco anos são as principais usuárias dos serviços de saúde no Brasil e seus padrões de adoecimento e morte são indicadores da qualidade de vida da população. Este trabalho analisou indicadores de prevenção de doença em crianças menores de cinco anos em uma Unidade Básica de Saúde no sul do Brasil. O inquérito epidemiológico incluiu dois grupos de crianças (de zero a um e de um a cinco anos), por meio de questionário semiestruturado, auditoria de cadernetas de saúde e prontuário médico. Nas crianças menores de um ano analisaram-se

idade (meses), peso ao nascer, tipo de parto, tempo de amamentação, cobertura vacinal, uso de sulfato ferroso e consultas de puericultura. No grupo entre um e cinco anos estudou-se: idade (meses), cobertura vacinal, consumo de sulfato ferroso e consultas de puericultura. Das 110 crianças estudadas 35 eram menores de um ano e 75 tinham entre um e cinco anos de idade. Nas crianças menores de um ano foi observado 20% de baixo peso ao nascer, 60% de nascimento por parto cesariano, 89% de amamentação com 29% que mamou menos de dois meses, e 54% de uso de sulfato ferroso. Entre as crianças de um a cinco havia 11% com baixo peso ao nascer e 67% de utilização de sulfato ferroso. Identificou-se a necessidade de ampliar os programas de prevenção de doenças, o incentivo à amamentação exclusiva e ao uso do sulfato ferroso profilático bem como reduzir o número de partos cesarianos.

**PALAVRAS-CHAVE:** saúde da criança; puericultura, prevenção, amamentação.

**ABSTRACT:** Children under five are the main users of health services in Brazil and their patterns of illness and death are indicators of the quality of life of the population. This study analyzed disease prevention indicators in children under five years of age at a Primary Health Service in southern Brazil. The epidemiological survey included two groups of children (from zero to

one and from one to five years), through a semi-structured questionnaire, child` health book and document analysis. In children under one year of age were analyzed: age (months), birth weight, type of delivery, time of breastfeeding, vaccination coverage, use of ferrous sulfate and childcare appointments. In the group aged between one and five years, we studied: age (months), vaccination coverage, consumption of ferrous sulfate and childcare appointments. Of the 110 children studied, 35 were under one year of age and 75 were between one and five years of age. In children under one year of age, 20% of low birth weight, 60% of birth by cesarean section, 89% of breastfeeding with 29% who breastfed less than two months, and 54% of use of ferrous sulfate were observed. Among children one to five were 11% with low birth weight and 67% use of ferrous sulfate. We identified the need to expand disease prevention programs, the encouragement of exclusive breastfeeding and the use of prophylactic ferrous sulfate as well as reducing the number of cesarean deliveries.

**KEYWORDS:** child health; childcare, prevention, breastfeeding.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, as crianças menores de cinco anos continuam sendo as principais usuárias dos serviços de saúde. Elas são as primeiras a sofrerem o impacto de qualquer mudança na comunidade e, por isso, seu padrão de adoecimento e morte tem sido muito utilizado como indicador da qualidade de vida de toda a população, devendo, portanto, ser considerado um grupo prioritário para a realização de intervenções por parte dos governos nos seus mais diversos níveis (CESAR, 2006; BRASIL, 2015a).

De modo geral, o que se vê é uma oferta de serviço individualizada, curativa, paliativa, repetitiva e voltada para uma demanda quase infinita, o que dificulta a análise da efetividade das ações e serviços para este grupo etário, os quais contribuem direta e indiretamente para a qualidade de vida. De acordo com o estudo de Cesar são poucas as situações em que o município avalia seus indicadores de saúde e prevenção de doenças para examinar a cobertura de programas, definir prioridades de intervenção e traçar metas a serem alcançadas em determinado período (CESAR, 2009). A sua não realização acaba diminuindo o impacto das intervenções oferecidas e pode levar muitos programas importantes ao descrédito, tanto por parte dos gestores quanto das equipes de saúde e dos usuários (CESAR, 2009).

Este estudo visa realizar uma análise de alguns indicadores de medidas de prevenção de doenças em crianças menores de cinco anos de idade que residem na área de abrangência de uma Unidade Básica de Saúde (UBS) do extremo Sul do Brasil, que atua nos princípios da Atenção Primária à Saúde (APS).

## 2 | METODOLOGIA

Foi realizado um inquérito epidemiológico na população de crianças de até cinco anos de idade residentes nas zonas de cobertura de uma UBS que atua nos princípios da APS. A população de crianças foi dividida em dois grupos: menores de um ano e de um a cinco anos. O presente estudo integra o projeto de pesquisa “Saúde das Crianças do Areal Leste: diagnóstico, avaliação e intervenção” aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), cadastrado no Cobalto com o código 5380 e com término previsto para dezembro 2016.

O projeto incluiu a aplicação de um questionário semiestruturado com perguntas fechadas e abertas específicas para cada grupo e uma auditoria médica nas cadernetas de saúde e nos prontuários de cada criança incluída no estudo. Nas crianças menores de um ano investigou-se idade em meses na entrevista, peso ao nascer, tipo de parto, tempo de amamentação, cobertura vacinal e uso de sulfato ferroso profilático de acordo com a idade, frequência ao programa de puericultura e local de realização desse acompanhamento, e inscrição no Programa Bolsa Família. Para o grupo etário entre um e cinco anos estudou-se: idade em meses na entrevista, cobertura vacinal, consumo de sulfato ferroso profilático, frequência ao programa de puericultura, local de realização das consultas e inscrição no Programa Bolsa Família.

Os dados foram obtidos pelos agentes comunitários de saúde de cada criança residente na microárea sob sua responsabilidade, em entrevistas com as mães ou responsáveis, de 1º de dezembro de 2014 até 31 de dezembro de 2015; digitados no software Epidata versão 3.1; e, analisados no programa Excel®. A análise incluiu a frequência simples das variáveis de interesse.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo incluiu um total de 110 crianças até o momento desta análise, com a seguinte distribuição etária: 35 crianças menores de um ano e 75 crianças entre um e cinco anos de idade. De acordo com a estimativa de crianças de cada um dos grupos, essas amostras representam uma cobertura de 42% para o primeiro e de 45% para o segundo, respectivamente.

Em relação às crianças menores de um ano, 16 (46%) eram do sexo masculino e 19 do sexo feminino (54%). Sete crianças (20%) apresentaram peso baixo ao nascer (inferior a 2500 gramas) e as demais apresentaram peso considerado adequado (igual ou superior a 2500 gramas). Quanto ao tipo de parto, 14 (40%) nasceram por parto natural e 21 (60%) por cesariana, o que condiz com a alarmante realidade brasileira com mais da metade dos partos sendo cesarianos (85% na rede privada e 40% na rede pública), mas está em desacordo às recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) a qual afirma que as taxas de cesárea devem variar entre 10 e 15% (BRASIL, 2015b; OMS, 2015). Em relação ao Programa Bolsa Família, seis crianças

(17%) estavam inscritas no programa.

Quanto ao aleitamento materno, 31 crianças (89%) foram amamentadas e em nove (29%) o tempo de aleitamento variou entre um e dois meses, contrariando a indicação da OMS e do Ministério da Saúde de ser exclusivo nos seis primeiros meses de vida (BRASIL, 2015a). Das 31 crianças amamentadas, 22 (71%) ainda se encontravam em aleitamento materno, sendo oito crianças com mais de seis meses.

No contexto da frequência à atendimento de puericultura, 34 crianças (97%) faziam a rotina de consultas, sendo 31 (91%) realizadas na UBS em questão. A família da única criança que não realizava puericultura foi encaminhada ao serviço e orientada quanto à importância da realização da rotina e dos problemas de não realizar o acompanhamento adequado.

O uso de sulfato ferroso como profilaxia da anemia foi relatado para 19 crianças (54%) a realizaram, e, dentre elas, 17 (89%) ainda estavam fazendo uso do suplemento. As crianças com seis meses ou mais que nasceram a termo e as crianças prematuras com quatro meses ou mais que não faziam uso do sulfato ferroso receberam orientações por escrito sobre a importância da prevenção de anemia, com os sinais e sintomas que a carência de ferro pode causar, constando ainda, os prejuízos para o crescimento, comportamento e aprendizagem da criança. Todas as crianças apresentaram carteira de vacinação e certidão de nascimento.

No grupo de crianças entre um e cinco anos, 47 (63%) eram do sexo masculino e 28 (27%) do sexo feminino. Quanto ao peso ao nascer, oito (11%) crianças apresentaram baixo peso ao nascer e, em se tratando da puericultura, 70 (93%) realizavam a rotina de consultas, sendo 31 (42%) na UBS em questão. As cinco crianças que não eram levadas para consulta tiveram suas famílias encaminhadas para a realização da rotina e orientadas da sua importância. Quanto ao uso de sulfato ferroso, 50 crianças (67%) ainda fazem ou já fizeram uso do suplemento. Tal como as do outro grupo, todas as crianças possuíam carteira de vacinação e, do total, 13 (17%) estavam inscritas no Programa Bolsa família.

#### 4 | CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho foi possível identificar a necessidade da ampliação dos programas de prevenção de doenças em crianças menores de cinco anos de idade, bem como esclarecer e incentivar as mães quanto à amamentação exclusiva até os seis meses de idade, pois apesar do elevado número de crianças amamentadas, um terço das crianças menores de um ano recebeu aleitamento materno menos de seis meses.

Destacou-se ainda a constatação do elevado número de partos cesarianos em detrimento do parto vaginal, sendo necessário algum tipo de ação educativa a fim de reduzir este percentual. Também foi observado que a comunidade leva suas crianças

às consultas de puericultura para realizar o acompanhamento adequado, com maior vínculo à UBS da área de moradia para os menores de um ano. Considera-se portanto que existe muitas oportunidades para a equipe trabalhar temas de educação em saúde.

O trabalho também observou a necessidade de ampliar o uso de sulfato ferroso nessa faixa etária através da prescrição, do esclarecimento de sua importância e da adesão das famílias ao uso deste suplemento.

Estudar e analisar como se encontra a saúde das crianças nos auxilia a compreender o perfil de adoecimento nessa faixa etária, ajuda a identificar os principais problemas e as principais falhas assistenciais e de ensino, a fim de que possamos agir e corrigir e/ou melhorar a atenção proporcionada a elas, contribuindo assim para que possam ter uma infância e conseqüente vida adulta mais saudável.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos CONITEC. **Diretrizes de Atenção à Gestante: a operação Cesariana.** Relatório de Recomendação. Brasília: DF, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Caderno de Atenção Básica Nº 23: **Saúde da Criança: Aleitamento Materno e Alimentação Complementar.** Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, Ministério da Saúde, 2015b.

CESAR, JA; et al. **Indicadores básicos de saúde infantil em área urbana do extremo Sul do Brasil: estimando prevalências e avaliando diferenciais.** Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro), Porto Alegre, v.82, n.6, p.437 - 444, 2006. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572006000800008&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572006000800008&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 03 ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572006000800008>.

CESAR, JÁ. et al. **Saúde infantil em áreas pobres: resultados de um estudo de base populacional nos municípios de Caracol, Piauí e Garrafão do Norte, Pará, Brasil.** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p. 809 – 818, 2009. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2009000400012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009000400012&lng=en&nrm=iso)>. acessos em 03 ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000400012>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Declaração da OMS sobre as taxas de cesáreas.** OMS: Fevereiro, 2015.

## UMA NOVA ABORDAGEM PARA A ORIENTAÇÃO SEXUAL NA ESCOLA ESTADUAL NESTOR LIMA, NATAL RN.

### **Francicleide Venâncio Bezerra Alves**

Universidade Potiguar –Unp. Laureate international universities. Escola Da Saúde e da Ciências Biológicas. Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP: 59056-000, Natal/RN, Brasil. Escola Estadual Nestor Lima- Rua São José, s/n, Lagoa Nova, CEP: 59054-590, Natal/RN

### **Gabriel Henrique Santana da Silva**

Universidade Potiguar –Unp. Laureate international universities. Escola Da Saúde e da Ciências Biológicas. Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP: 59056-000, Natal/RN, Brasil. Escola Estadual Nestor Lima- Rua São José, s/n, Lagoa Nova, CEP: 59054-590, Natal/RN  
gabriel.henrik14@gmail.com

### **Kaline Karla Gomes dos Santos**

Universidade Potiguar –Unp. Laureate international universities. Escola Da Saúde e da Ciências Biológicas. Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP: 59056-000, Natal/RN, Brasil. Escola Estadual Nestor Lima- Rua São José, s/n, Lagoa Nova, CEP: 59054-590, Natal/RN

### **Rosangela Lopes Dias**

Universidade Potiguar –Unp. Laureate international universities. Escola Da Saúde e da Ciências Biológicas. Av. Sen. Salgado Filho, 1610, Lagoa Nova, CEP: 59056-000, Natal/RN, Brasil. Escola Estadual Nestor Lima- Rua São José, s/n, Lagoa Nova, CEP: 59054-590, Natal/RN

objetivo desenvolver uma nova abordagem para o ensino de educação sexual voltada ao ensino fundamental da Escola Estadual Nestor Lima, situada na cidade do Natal, Rio Grande do Norte. No início da vida adulta, o aluno necessita de uma formação que possibilita fazer boas escolhas quanto social e como preservação da saúde. Essa escolha é proveniente do acompanhamento familiar-escolar. Sendo assim, a pesquisa teve como proposta tornar o aluno apto diante da compreensão do próprio corpo de acordo com sua ética, moral e função, visando o valor enquanto pessoa. Foram alcançados 91 alunos, sendo aplicado ao 7º ano do ano letivo de 2015, dando continuidade no 8º e 9º ano do ensino fundamental e o 1º ano do ensino médio, no ano de 2016. Contornando uma abordagem que parte do “homem suscetível aos seus sentimentos”, abordando as paixões e comportamento humano, até “identidade de gênero”, explorando a diversidade social e as diferentes culturas que precisam ser orientadas e conhecidas. Notamos a eficácia do método ativo abordado com um resultado de 97% de adesão geral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Educação sexual; Nova abordagem; Método ativo.

**RESUMO:** Estudo de orientação e educação sexual no ensino fundamental qual teve como

## INTRODUÇÃO

Nos parâmetros de ensino na educação brasileira, como orienta a PCN (Parâmetros Curriculares Nacionais), encontramos vários métodos que dosam o conhecimento e aprendizado gradativo dos alunos. Dentro das Ciências Biológicas o professor da área encontra, além da grade de ensino, assuntos transversais, qual tem o objetivo de agregar valores e ensino junto ao contexto educacional e social.

A orientação sexual é um destes assuntos que disponibiliza aos alunos o conhecimento não só do corpo, nas aulas que tratam de função e estrutura, dispendo ainda da ética e da moral, como também da educação da saúde e a prática do respeito coletivo e com sigilo mesmo. (Tooby e Cosmides, 2000.)

De acordo com a PCN (Parâmetros Curriculares Nacionais/ Orientação Sexual), firma que as manifestações da sexualidade afloram em todas as faixas etárias. Ignorar, ocultar ou reprimir são respostas habituais dadas por profissionais da escola, baseados na ideia de que a sexualidade é assunto para ser lidado apenas pela família.

Com isso, foram dispostos analisar os critérios deste documento como base, afim de uma nova reformulação. Executando com novas manobras esse assunto. Visando o documento em sua estrutura como também as práticas em sala correspondendo às necessidades da educação em formar jovens com mentalidade crítica e ética.

Há uma necessidade pedagógica de uma formação continuada. Desenvolver, ainda criança, uma mentalidade sobre a finalidade do corpo e a sua preservação. Na adolescência, o processo de descobertas, adquirirem conhecimento fisiológico, anatômico e principalmente moral. No início da vida adulta possuirá com positividade uma formação que possibilita fazer boas escolhas quanto social e como preservação da saúde.

A escola é uma das instituições nas quais se instalam mecanismos do dispositivo da sexualidade, através das tecnologias do sexo, os corpos dos estudantes podem ser controlados, administrados. (Louro, 1999. P.25-26).

Mas para isso é necessário que a educação ofereça estrutura e espaço para o diálogo e a formação. Que não se cria novas mentalidades sociais em poucas aulas e sim é adquirida no processo de formação da vida.

“A sexualidade forma parte integral da personalidade de cada um. É uma necessidade básica e um aspecto do ser humano que não pode ser separado de outros aspectos da vida. A sexualidade não é sinônima de coito e não se limita à presença ou não do orgasmo. Sexualidade é muito mais do que isso, é a energia que motiva encontrar o amor, contato e intimidade, e se expressa na forma de sentir, na forma de as pessoas tocarem e serem tocadas.” (Brasil, 1998, p265).

A sexualidade influencia pensamentos, sentimentos, ações e interações e tanto o estado físico como mental. “Se a saúde é um direito humano fundamental, a saúde sexual também deveria ser considerada como um direito humano básico.” (Organização Mundial de Saúde, 1975.)

Sendo assim necessário ao sistema educacional compor uma abordagem contínua, explicativa, informativa e conselheira. Possuindo uma abordagem da sexualidade de forma simples, clara e direta. Acompanhando o ritmo dos alunos envolvidos em comparação às necessidades dos mesmos com a metodologia evolutiva.

## **OBJETIVO**

A pesquisa teve como proposta tornar o aluno apto a interpretar e reconhecer o próprio corpo de acordo com sua ética, moral e função, visando o valor enquanto pessoa. Ainda, Comparar as diversas formas de expressão na sociedade atual, em observância da pluriculturalidade. Além de avaliar a necessidade de um aprendizado contínuo na formação do aluno, recurso de um processo facilitador de aprendizagem.

## **METODOLOGIA**

### **Caracterização da escola em estudo.**

A Escola Estadual Nestor Lima, está localizada na Rua São José, S/N - Lagoa Nova, Natal – RN. A escola dispõe do ensino fundamental ao ensino médio nos dois turnos escolares. A partir das necessidades da escola e da aplicação de uma nova metodologia, foram apresentadas as turmas matutinas do 7º ano do ano letivo de 2015, 8º e 9º ano do ensino fundamental e os 1º anos do ensino médio no ano de 2016, colaborando com o desempenho do projeto contínuo em contato dos alunos com a abordagem sexual e permitindo ao ambiente escolar uma área de diálogo, sensibilização e educação.

De acordo com a grade curricular, os alunos do ensino fundamental ainda não tiveram contato com as aulas de sistema reprodutor, permitido que houvesse um contato com a execução de forma “mais bruta”. No ensino médio, a intervenção tornou-se mais flexível na medida em que os alunos compreenderam que o contexto de sexualidade ocorre na vida deles de forma intensa na idade qual eles estão. As atividades com a turma foram divididas em quatro semanas com 100horas/aulas semanais, sendo abordados os seguintes temas:

- 1º Semana: Apresentação e o homem sensível as paixões.
- 2º Semana: Nosso corpo, nossa identidade.
- 3º Semana: Sexo biológico, sexo e DST's.
- 4º Semana: Teatros, debates e conclusões

## Reconhecendo as realidades

Os alunos do 7º ano variam dos seus 12 anos a 17 anos de idade, os do 9º ano dos 15 a 19 anos e os jovens do ensino médio dos 14 aos 27 anos de idade. Tempos de descobertas e amadurecimento enquanto pessoas.

O primeiro contato com alunos permitiu, a partir de um questionário fechado e objetivo, contendo 8 questões, aplicado para 28 alunos do 7º ano, 32 alunos do 9º ano e 31 alunos do 1º ano ensino médio, onde estes discorressem sobre temas como a compreensão do que é educação sexual, diálogo familiar, auxílio da escola, prática sexual, incentivo do aborto e influência afetiva e sexual através de amigos. Esses pontuaram as questões com as alternativas entre sempre, quase sempre, às vezes e nunca, estabelecendo o grau de importância para cada temática.

Com isso, possibilitou encontrar quais os melhores temas poderiam ser discutidos e aprimorados para esta turma. Reconhecer os indivíduos é fundamental para explanação da educação, nelas são alcançadas as dúvidas, mas diversas que um indivíduo pode ter e não saber como solucionar.

### Primeira abordagem

A primeira Semana tratava sobre a apresentação do projeto e a temática: O homem sensível as paixões. Sendo abordados as sensações e sentimentos que afloram na puberdade e que percorre todo o organismo. Estabelecendo um sentido a afetividade como a necessidade de amizade, namoro, paixões, raiva, e entre outros sentimentos.

De início os alunos foram encaminhados à sala de vídeo da escola que foi ornamentada com bexigas e fitas coloridas para aumentar a descontração do local, com o objetivo de que eles observassem que não era uma aula comum e que houvesse um maior diálogo e uma maior comunicabilidade dos alunos diante de um assunto tão delicado.

Depois de acomodados nas cadeiras, foi distribuído um questionário onde eles não se identificavam e com o propósito de saber o nível de conhecimento da turma quanto ao assunto que seria exposto.

Posteriormente foram apresentadas as temáticas das quatro semanas que veio ser trabalhados juntos as turmas. Em seguida, foram exibidos dois vídeos, “paperman” e “hoje eu não quero voltar sozinho”, sempre após cada vídeo era iniciada uma discussão para retratar a capacidade que o ser humano tem de se apaixonar e que é normal que dois indivíduos criem um laço afetivo e sentimental.

Por fim nesse primeiro dia foi pedido que as pessoas que tivessem dúvidas relacionadas ao assunto de orientação e educação sexual, que escrevessem em um papel os seus questionamentos para que pudessemos escolher alguns para sanar as dúvidas. Muitas tinham relação a doenças sexualmente transmissíveis, na qual

utilizamos para montar a palestra, atingindo com mais foco as indagações da realidade vivida nesta turma.

## Segunda abordagem

Na segunda semana da execução do projeto foi abordado como temática à identidade de gênero, este por sua vez estar relacionada à maneira de como alguém se sente e se apresenta para si e para as demais pessoas como masculino ou feminino, ou ainda pode ser uma mescla, uma mistura de ambos, independentemente do sexo biológico (fêmea ou macho) ou da orientação sexual (orientação do desejo: homossexual, heterossexual ou bissexual).

Antecedente à entrada na temática com os alunos, foi passado o material acerca de identidade de uma forma geral, este por sua vez esclarecia que a personalidade de um indivíduo estar relacionado ao modo de como ele vive na sociedade, levando em consideração questões culturais, econômicas e sociais.

Sendo assim, o intuito girava em torno de que eles entendam o tema, tirando suas dúvidas e acima de qualquer coisa fixando o conceito de respeito entre os cidadãos, além de expor para os alunos os distintos tipos de gêneros existentes na sociedade e estabelecendo o conceito de inclusão social, direitos e deveres de todos.

A iniciação da apresentação sobre o tema, tinha como objetivo dispor de informações e diálogo acerca da nossa identidade. Com a proposta de expor aos alunos os diversos tipos de identidade que encontramos seja ela cultural, visual ou até mesmo social. E esclarecendo que a temática identidade não está somente relacionada com os termos citados, mas também com o valor que se deve ter, o valor encontrado no corpo, que a identidade não se limita apenas naquela simples documentação que recebe e sim, define como ser humanos diante da sociedade.

Sendo assim, ao dar início ao tema, foi pedido para que os alunos sentassem em duplas onde descrevessem o que viram um no outro, levando em consideração as características físicas e a personalidade, posteriormente foram invertidas os papéis onde eles se auto-analisaram levando em conta suas características e valores. Em seguida, foi exposta a ideia de um senhor bem visto perante a sociedade, posteriormente foi mostrado a mesma imagem, entretanto, desta vez ele se apresenta totalmente tatuado e radical. Outro exemplo foi a imagem de uma senhora simples, estilo mais padrões, na imagem posterior, a senhora aparentemente cheia de “netinhos”, aparece como uma grande ginasta olímpica (Figura 1). O que causou espanto por parte dos alunos, pois rotularam ele ao observar.



Figura 1. Imagem do material visual utilizado em sala.

Portanto, com atuação da segunda semana foi possível observar a construção e o entendimento do conceito de identidade da parte dos alunos. Contudo, para a iniciação da entrada propriamente dita no tema gênero, foram demonstrados os conceitos gerais sobre diversos tipos de gêneros sociais, como os indivíduos heteroafetivos e homoafetivos, ainda levando em consideração as diversas expressões de gêneros, como por exemplo, as travestis, dragquenn, drag king e os Cross play. A medida que era esclarecida a temática para os alunos, era notável o grau de interesse e curiosidade da parte deles sobre o tema, isso foi possível observar devido a interação que eles tinham de acordo que era dialogado o assunto.

No final desta atividade foi planejado e executado uma dinâmica denominada de teia de valores, que tinha como objetivo promover a união, aproximação e respeito social, visando à igualdade e a maior tolerância mútua, onde cada aluno inicialmente colocou uma característica afetuosa dentro de uma bola de encher, essas deveriam conter características tais como bondoso, humilde, atencioso, companheiro, leal e entre outras. Essas bexigas foram aleatoriamente trocadas entre eles para que de acordo com a característica ali presente eles deveriam lançar o barbante para outro aluno que apresenta aquela característica marcada, de forma que todos lançassem o barbante formando uma grande teia onde todos fazem parte independente da sua característica particular.

### Terceira semana

Com a temática sexo biológico, sexo e DST's. Foi trabalhado uma base de sistema reprodutor masculino e feminino com as suas respectivas estruturas e funções. Em seguida foi exposto um pouco sobre a preservação do corpo não apenas para ato sexual, mas as nossas socializações e posturas.

DST's e contraceptivos foram abordados com o intuito de transmitir de forma clara e objetiva para todos os alunos como se prevenir de doenças sexualmente transmissíveis e de uma gravidez indesejável.

Os temas fizeram com quer debatêssemos para que tirássemos todas as dúvidas com perguntas e respostas entre os alunos, além de trabalhar com eles imagens, textos e dinâmicas.

Foi executado uma dinâmica com produtos químicos solda cáustica (NaOH), fenolftaleína (mostrando supostamente pessoas contaminadas com DST's) e água (mostrando as pessoas não contaminadas) com os alunos mostrando como se contamina com as doenças sexualmente transmissíveis de uma forma dinâmica e ativa tendo como propósito mostrar que é mais fácil do que se imagina pegar DST's, no final foi discutido sobre os métodos contraceptivos de como usar um preservativo de uso feminino e masculino (com distribuição dos mesmos) e ainda explorado que não só se previne doenças e sim uma gravidez indesejada na adolescência.

### **Quarta semana**

Na quarta e última semana foi executado sobre uma ótica mais avaliativa com o tema Teatros, debates e conclusões.

Com o intuito de extrair de cada aluno, o que foi compreendido por estes e vivenciado durante esse processo, eles foram divididos em grupos e instigados a produzirem pequenas peças ou esquetes teatrais que abordassem algum determinado tema trabalhado.

Diante disso, foi confeccionado papeis com as temáticas realizadas para sorteio dos grupos, disponibilizando 20 minutos para a elaboração da atividade.

Antes de iniciarmos as atividades foi elaborada uma breve apresentação expositiva fazendo memória das semanas anteriores e suas respectivas abordagens.

Os alunos apresentaram com êxito cada assunto explanado sendo fidedignas aos temas, as realidades sociais. Como por exemplo, as apresentações de quatro alunos que exploraram as DST's encenaram a contaminação do vírus da Aids em um rapaz através de uma mesma agulha em uma tatuadora clandestina, onde ao passar do tempo ele vem descobrir a presença do vírus em seu organismo.

Os outros grupos também exploraram outras temáticas com novos olhares e mais maduros.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com o questionário aplicado, de oito questões, nas séries do 7º, 8º e 9º ano do ensino fundamental e o 1º ano do ensino médio, totalizando 91 alunos participantes, qual tinha o intuito de visualizar e conseqüentemente avaliar as necessidades pedagógicas e educativas de cada indivíduo de diferentes turmas sobre o tema proposto, entretanto, a avaliação final foi possível por meio das respostas vindas das atividades interativas da 4ª semana.

Os primeiros dados das turmas, os alunos apresentam a queixa de não possuírem auxílio da escola, métodos acerca de informações e orientações sexuais para os mesmos ou ainda não se sentem assegurados em dialogar em sala, ou encontrar um professor que possa ajuda-los e orienta-los (Figura 2 e 3).

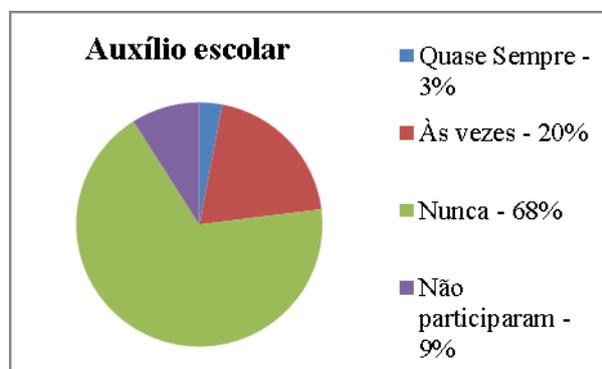


Figura 2. Gráfico percentual de índice de auxílio da escola com as turmas 7º e 9º anos no uso de métodos para com a educação sexual.

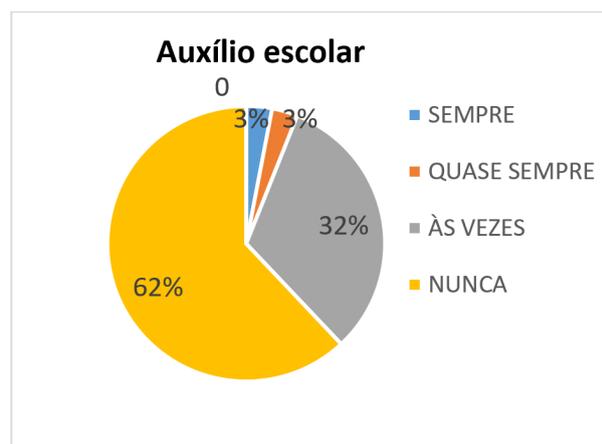


Figura 3. Gráfico percentual de índice de auxílio da escola com a turma do 1º ano do ensino médio no uso de métodos para com a educação sexual.

Percebesse que há uma continuidade do índice de ausência no acompanhamento e suporte da escola para os alunos. Ou seja, ao ver dos alunos, estes não encontram espaço, professor ou outra unidade na qual possa auxiliá-los, promovendo o acompanhamento e suporte ao decorrer dos níveis escolares.

Outro dado observado foi a presença do diálogo familiar com cada aluno. No qual é desejável que os alunos tenham um espaço físico para o diálogo dentro das áreas escolares e é imaginável que este hábito seja já praticado na conjunção familiar, com o uso da educação e base para cada aluno.

Porém, como já esperado esta prática não passa de imaginação. Os alunos não vêm fundamentados de casa, e sim constrói suas visões de mundo a partir de suas próprias concepções pessoais construídas muitas vezes por experiências curiosas ou relatos de amigos. (Figura 4)

Encontra partida, o amadurecimento dos alunos é um fator fundamental para a compreensão do índice do diálogo ser frequente entre as famílias. O processo de maturidade tende a aproximar os mesmos em suas residências. (Figura 5)

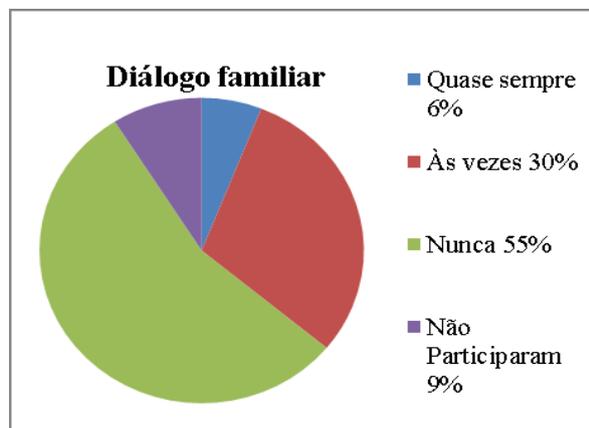


Figura 4. Gráfico percentual de índice de auxílio da escola com as turmas 7º e 9º anos no uso de métodos para com a educação sexual.

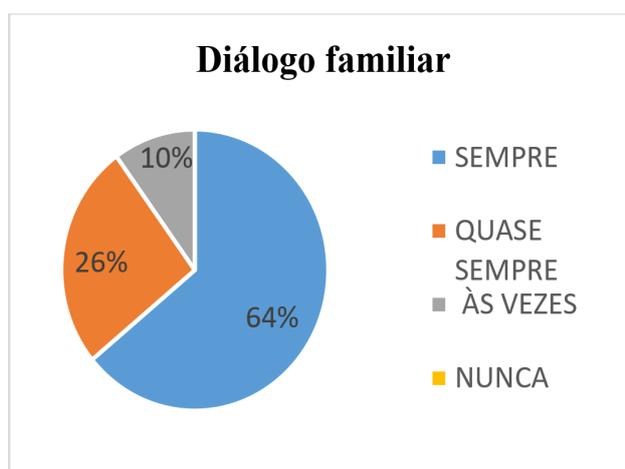


Figura 5. Gráfico percentual de índice de auxílio da escola com a turma de 1º do ensino médio no uso de métodos para com a educação sexual

Destaca-se ainda, a pratica sexual como 30% da atividade no ensino fundamental, que ao ser comparado com o percentual dos alunos que não possuem, de 61%, compreende-se que o índice é ainda razoável devido a imaturidade da idade. Quando analisado com o ensino médio, que apresenta 64% de alunos que mantém relação sexual, observa-se que os alunos possuem uma prática maior quando comparada com os que não mantêm. (Figura 6 e 7)

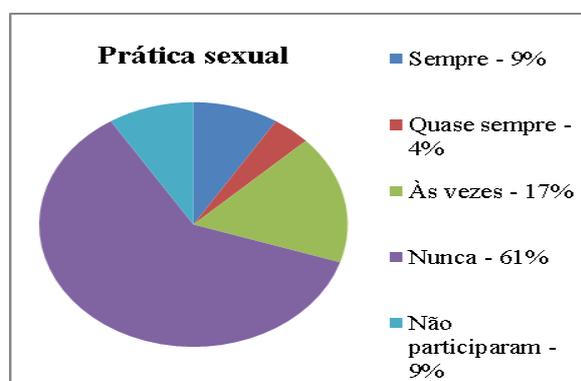


Figura 6. Gráfico percentual de índice de prática sexual ativa das turmas do 7º e 9º anos

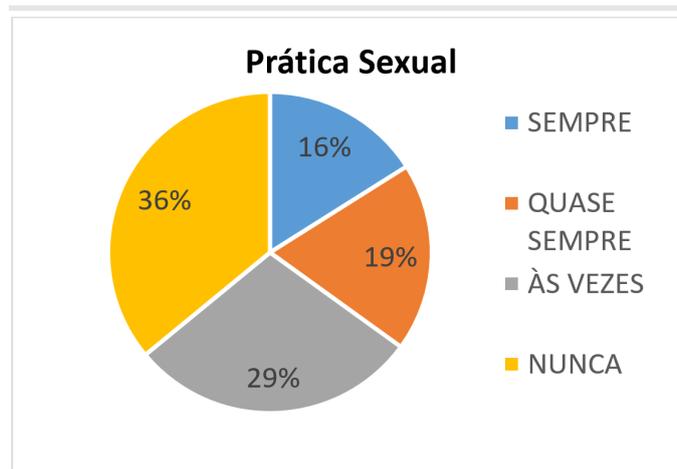


Figura 7. Gráfico percentual de índice de prática sexual ativa da turma do 1º ano.

A partir disso se fez necessárias atividades que alcançasse toda a turma e permitisse que estes consolidassem suas concepções ou as reconstruíssem de forma mais segura, adequada e respeitosa.

Os métodos ativos de dinâmica que eram abordados permitiam que cada aluno compreendesse as didáticas trabalhadas nos permitindo uma resposta de trabalho geral de quase 100% de alcance (Figura 8)

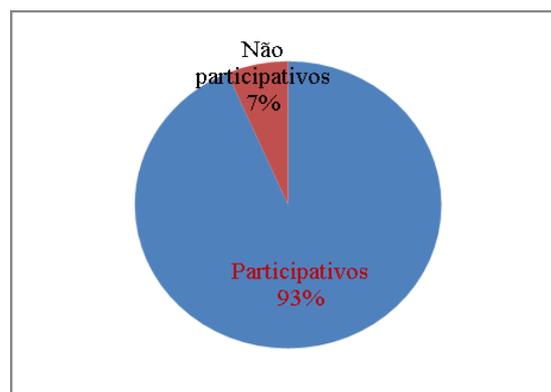


Figura 8. Índice geral de participação ativa na conclusão das atividades elaboradas para 31 alunos.

Com isso, podemos enfatizar que o uso de métodos práticos, claros e sucintos, onde alcança todos os tipos de gêneros, concepções e identidade permite que haja um resultado eficaz e positivo não apenas para obter grandes números e sim alunos que possuem mentalidade firme e nova.

## CONCLUSÕES

A nova abordagem sobre educação sexual na escola tem como finalidade promover uma interação entre aluno e professor, dando espaço ao discente a expor seus questionamentos e dúvidas referentes ao assunto abordado.

A construção de propostas de intervenção escolar na socialização afetivo-sexual dos adolescentes promove a redefinição de classificações coletivas referentes aos

papéis sociais da família e da escola. Desde o início do século XX, houve uma série de iniciativas para a criação de espaços escolares no debate sobre a sexualidade dos adolescentes. A partir da publicação dos Parâmetros Curriculares Nacionais, a escola ganha legitimidade para desenvolver projetos estruturados a partir de três blocos de conteúdo: a) Corpo - matriz da sexualidade; b) Relações de gênero; c) Prevenção de doença sexualmente transmissíveis (Aids) em todo o território nacional (ALTMANN, 2001).

Sendo assim, pode-se concluir que essa nova metodologia é altamente eficaz, pois estabelece uma ponte íntima entre professor e aluno sem que haja empecilho. Levando ainda em consideração as práticas abordadas por outros métodos educativos que exclui indivíduos de identidade que se afugenta do padrão de gênero, já que o professor ainda está limitado ao campo biológico, mesmo estando respaldado com a ciências humanas. Sendo assim, este método amplia o olhar da educação, discutindo o ser humano não apenas em seu sexo biológico, mas também a sua identidade mais íntima, expressões, sentimentos, afetividade, cultura e sociedade.



Figura 9. Palestra referente à educação sexual, tendo como base o sentimentalismo humano.

Nas primeiras semanas houve um grupo de alunos que não participou, pois achavam à proposta insignificante, porém, no decorrer da execução do projeto este mesmo grupo de alunos começaram a ter a iniciativa de participar e interagir nas discussões que eram propostas. Isto por sua vez foi possível pois estes discentes começaram a compreender o grau de importância do assunto, pois as informações que eram compartilhadas entre os palestrantes e alunos eram de total importância para possuírem o seguimento de uma vida sexual saudável.



Figura 10. Interação entre alunos e palestrantes acerca da temática educação sexual por meio da apresentação de forma lúdica.

Portanto, mediante as experiências vivenciadas pelos autores deste artigo, pode-se afirmar que com a participação de forma íntegra da parte dos alunos no decorrer do desenvolvimento e aplicação do projeto, este novo método de abordagem é eficaz, pois facilita o entendimento sobre os assuntos relacionados à educação sexual, visto que houve total interação entre palestrantes e ouvintes, podendo trazer para à execução do projeto situações do cotidiano do aluno ou não, assim, facilitando a absorção da informação.



Figura 11. Interação entre alunos e palestrantes acerca dos métodos contraceptivos por meio da dinâmica de “dst’s química”

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a nossa querida amiga, professora e Orientadora Rosângela Lopes Dias por ter aceitado orientar o nosso projeto integrador de Orientação sexual, sempre nos transmitindo todo o seu conhecimento, para que pudéssemos transmitir aos alunos e colaborando com a construção desse material.

Agradecemos aos professores Margareth, Alexandre e Felipe por liberar e apoiarem-nos em suas aulas do 7° ao 9° ano do Ens. Fundamental e o 1° ano do Ens. Médio para trabalharmos com os alunos e contar com a participação durante o tempo que passamos na escola. Nossos agradecimentos a Escola Estadual Nestor Lima por abrir suas portas e nos conceder a oportunidade de apresentar o nosso trabalho neste ambiente escolar. A união de todos da escola possibilitou que os alunos construíssem um conhecimento transformador. Com a oportunidade de expressar e debater opiniões

construindo um saber que nos torna cidadãos responsáveis.

## REFERÊNCIAS

ALTMANN, Helena. Sexual Orientation at the National Curriculum Parameters. **Revista Estudos Feministas**, v. 9, n. 2, p. 575-585, 2001.

BRASIL. Secretaria de Educação Fundamental. *Parâmetros Curriculares Nacionais: terceiro e quarto ciclos: apresentação dos temas transversais*. Brasília: MECSEF, 1998.

BUSQUETS, Maria Dolores. *Temas transversais em educação*. São Paulo: Ática, 1999.

CAMARGO, Ana Maria F.; RIBEIRO, Cláudia. *Sexualidade(s) e infância(s): a sexualidade como um tema transversal*. São Paulo: Moderna e Campinas: Ed. da Unicamp, 1999

COSMIDES, L., & TOOBY, J. (2000). Evolutionary psychology and the emotions. In M. Lewis & J. M. Haviland-Jones (Eds.), *Handbook of emotions* (2nd ed., pp. 91–115). New York: Guilford Press.

FOUCAULT, Michel. *A história da sexualidade 1: a vontade de saber*. 12. ed. Trad. Maria Thereza da Costa Albuquerque e J.A. Guilhon Albuquerque. Rio de Janeiro: Graal, 1997.

LOURO, Guacira. “Pedagogias da sexualidade”. In: \_\_\_\_\_. (Org.). *O corpo educado: pedagogias da sexualidade*. Belo Horizonte: Autêntica, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 1975. Disponível em: <http://www.who.int/country/bra/en>. Acesso em 19 abr. 2016.

PAIVA, Vera. “Sexualidades adolescentes: escolaridade, gênero e o sujeito sexual”. In: PARKER, R.; BARBOSA, R. M. (Orgs.). *Sexualidades brasileiras*. Rio de Janeiro: RelumeDumará, 1996.

ROSEMBERG, Fúlvia. “A educação sexual na escola”. *Cadernos de Pesquisa*, n. 53, p. 11-19, mai. 1985.

SILVA, Tomaz T. *Identidades terminais*. Petrópolis: Vozes, 1996.

YUS, Rafael. *Temas transversais: em busca de uma nova escola*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

ZAMIN, Camila. “Educação sexual nas escolas: a necessidade de uma política pública-estudo de caso no município de Araricá.” (2012).

## UTILIZAÇÃO DE ESTUDO DE CASO NO TÓPICO SISTEMA REPRODUTOR HUMANO NO ENSINO MÉDIO

### **Messias Rodrigues Arruda**

Docente do Instituto Federal de Educação do Ceará, campus Umirim (IFCE) e Discente do Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO-UECE) - CE.

### **Isabel Cristina Higino Santana**

Docente da Universidade Estadual do Ceará, campus Itapipoca (FACEDI) e do Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO-UECE) - CE.

### **Andréa Pereira Silveira**

Docente da Universidade Estadual do Ceará, campus Itapipoca (FACEDI) e do Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO-UECE) - CE.

**RESUMO:** A compreensão dos conteúdos relacionados aos sistemas reprodutores humanos é de extrema importância para os alunos do ensino médio. Essa importância reside não apenas no entendimento teórico do funcionamento regular dos próprios órgãos, mas também para promover uma visão crítica de assuntos estreitamente relacionados como a gravidez, a contracepção, as infecções sexualmente transmissíveis, as doenças não infecciosas como a endometriose e alterações provocadas pelo uso indiscriminado de esteroides anabolizantes, seja com objetivos atléticos ou estéticos. Para promover uma melhor compreensão desses conteúdos, foi

utilizada como proposta metodológica o estudo de caso, pois além de trazer para os educandos situações reais envolvendo os conteúdos teorizados em sala, o método, quando trabalhado por grupos de alunos, favorece o compartilhamento dos conhecimentos entre os estudantes. Participaram desta pesquisa 20 alunos de uma turma de terceiro ano do ensino médio do curso técnico em agropecuária do Instituto Federal de Educação do Ceará, campus Umirim. Foram registrados por meio de questionários elevados percentuais de acerto nas questões objetivas, acima de 67% por equipe e altos índices de questões subjetivas com embasamento teórico adequado, acima de 69%. A metodologia incentivou à socialização e a articulação ativa entre os saberes prévios e os adquiridos em sala.

**PALAVRAS-CHAVE:** active methodology, ensino de biologia, sistema reprodutor humano.

**ABSTRACT:** The understanding of contents related to human reproductive systems is of utmost importance to high school students. This importance lies not only in the theoretical understanding of the regular functioning of the organs themselves, but also in promoting a critical view of closely related issues such as pregnancy, contraception, sexually transmitted infections, non-infectious diseases such as endometriosis, and changes caused by the

indiscriminate use of anabolic steroids, whether for athletic or aesthetic purposes. In order to promote a better understanding of these contents, the case study was used as a methodological proposal, in order to bring, to the students, real situations involving theorized contents in the classroom. This method, when worked by groups of students, favors the sharing of knowledge between the students. Twenty students from a third-grade high school class in the agricultural technician course at the Federal Institute of Education of Ceara - Umirim campus. High percentage of accuracy in objective questions was recorded through questionnaires, above 67% per team and high subjective indexes with adequate theoretical background, above 69%. The methodology encouraged the socialization and the active articulation between their previous knowledge and those acquired in the classroom.

**KEYWORDS:** case study, biology teaching, human reproductive system.

## 1 | INTRODUÇÃO

O assunto de reprodução humana, no ensino médio, compreende diversos conteúdos intimamente interligados como: noções de anatomia dos sistemas reprodutores; mecanismos de regulação hormonal (controle por retroalimentação) e distúrbios relacionados. Os sistemas reprodutores humanos (masculino e feminino) estão, como os demais sistemas fisiológicos, sujeitos à regulação hormonal. Assim, tanto as funções ovarianas como testiculares são reguladas pelas alças de retroalimentação (*feedback*) com o GnRH (*gonadotrofin releasing hormone*) hipotalâmico e com os FSH (*follicle stimulating hormone*) e LH (*luteinizing hormone*), e as gonadotrofinas hipofisárias (AIRES, 2012).

A compreensão por parte dos alunos do ensino médio de distúrbios de caráter hormonal, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e a utilização de fármacos potencialmente lesivos como os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) se fazem importantes, permitindo uma articulação entre os conhecimentos de anatomia e fisiologia teorizados em sala. Além disso, permitem a conscientização sobre os prejuízos decorrentes do uso indiscriminado dos EAA, que devido ao uso abusivo e crescente, constitui um problema de saúde pública (ABRAHIN & SOUSA, 2013; DARTORA et al, 2014)

Para melhor compreensão de temas complexos, como a regulação hormonal por *feedback* e sua relação com as alterações fisiológicas proporcionadas pelo uso de esteroides anabolizantes androgênicos, foram utilizados os estudos de caso, como metodologia de ensino-aprendizagem. Como método de ensino, entende-se caso, como uma narrativa de uma situação possível, real ou fictícia, que pode ser utilizada como subsídio para discussões sobre um determinado assunto em sala de aula (SÁ, QUEIROZ, 2010). Segundo estes autores o estudo de caso é uma variação do método de aprendizagem baseada em problemas; sendo, portanto uma estratégia didática centrada no aluno como sujeito ativo do processo e tendo a aproximação com

a realidade um ponto chave da metodologia que objetiva desenvolver com os alunos o pensamento crítico e a habilidade de resolver problemas.

O estudo de caso se diferencia da aprendizagem baseada em problemas, no contexto de sua utilização didática. Enquanto na aprendizagem baseada em problemas presume-se a aplicação de problemas durante todo o período do curso ou disciplina, no estudo de caso pode ser utilizado de forma isolada no contexto de uma disciplina ou de um assunto específico (QUEIROZ, 2015).

O estudo de caso também pode ser entendido em outro contexto, como sendo um tipo de pesquisa qualitativa como destacado por Martins,

“Estudo de caso é uma estratégia metodológica de se fazer pesquisa nas ciências sociais e nas ciências da saúde. Trata-se de uma metodologia aplicada para avaliar ou descrever situações dinâmicas em que o elemento humano está presente. Busca-se apreender a totalidade de uma situação e, criativamente, descrever, compreender e interpretar a complexidade de um caso concreto, mediante um mergulho profundo e exaustivo em um objeto delimitado.” (MARTINS, 2006, p.11.).

No entanto, aqui foi abordado o contexto de estratégia didática do estudo de caso. Nesta acepção, o método permite que o aluno faça uma aplicação de seus conhecimentos prévios, possibilitando que seja autor de julgamentos críticos no qual exerce papel central. Neste estudo será relatado o processo de planejamento e execução do estudo de caso como atividade pedagógica voltada para a temática “sistemas reprodutores humanos” no ensino médio.

Todavia, o caso em si não fornece análise própria, mas os educandos, a partir de seus conhecimentos prévios, devem ser capazes de interpretar situações possíveis dentro de uma realidade que lhes foi apresentada (QUEIROZ & CABRAL, 2016). Além disso, quando aplicado em grupos, o método do estudo de caso estimula também o trabalho em equipe e a troca de conhecimentos entre os alunos, aspectos geralmente não alcançado somente com aula expositiva tradicional.

O objetivo foi utilizar a estratégia de estudo de caso com grupos de alunos do ensino médio, para abordar o conteúdo de sistemas reprodutores humanos e possibilitar a compreensão de distúrbios fisiológicos relacionados com os efeitos potencialmente lesivos de fármacos hormonais. Para tanto propusemos: i) trabalhar o conteúdo referente aos aspectos anatômicos envolvendo os sistemas reprodutores masculinos e femininos humanos; ii) discutir os mecanismos fisiológicos básicos de regulação hormonal sobre as gônadas; iii) debater sobre a interferência lesiva do uso indiscriminado de esteroides anabolizantes androgênicos no sistema reprodutor e; iv) informar sobre algumas alterações específicas do sistema reprodutor feminino como a síndrome dos ovários policísticos, a endometriose e a tríade da atleta.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em quatro aulas (4 horas aula cada, totalizando 16 horas) com alunos de uma turma de terceiro ano do ensino médio do Instituto Federal

de Educação do Ceará, campus Umirim. Os estudantes são alunos do curso técnico em agropecuária, uma vez que estão inseridos na educação profissional técnica, articulada ao ensino médio de forma integrada.

No início da primeira aula os alunos, num total de vinte, foram orientados a formar equipes de cinco integrantes, constituindo quatro equipes: 1, 2, 3 e 4. Em seguida cada equipe recebeu uma folha com instruções para que seus membros expressassem de forma livre, ideias sobre o tema reprodução humana e uso de anabolizantes (Quadro 1) durante 10 minutos. A partir desse “brainstorming” (tempestade de ideias) inicial, as ideias expostas nas folhas foram utilizadas como base para a discussão do conteúdo central a ser trabalhado em duas aulas teóricas geminadas.

Atividade	Orientações
Forme equipes de cinco alunos e transcreva para o espaço abaixo ideias relacionadas aos fármacos conhecidos como esteroides anabolizantes e sua possível relação com os sistemas reprodutores humanos.	1- cada aluno deve apresentar no mínimo uma ideia; 2- todas as ideias serão aceitas inicialmente; 3- as ideias deverão ser transcritas sem alterações a partir do pensamento inicial.

Quadro 1: Atividade do *Brainstorming* sobre reprodução humana e uso de anabolizante.

Fonte: Os autores

Durante a primeira aula foram abordados, por meio de aula expositiva e dialogada, os assuntos relativos aos aspectos principais da anatomia e fisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino. Na segunda aula, foram apresentados os fundamentos básicos da regulação hormonal das gônadas pelo eixo hipotálamo-hipofisário, sendo demonstrados o mecanismo de retroalimentação (feedback) negativo e algumas patologias não infecciosas como a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e endometriose. Ainda na segunda aula foi realizada uma discussão sobre o uso dos esteroides anabolizantes androgênicos, tanto na prática médica quanto esportiva e para fins estéticos. As aulas expositivas foram ministradas permitindo a participação dos alunos e utilizando o conhecimento prévio dos mesmos.

Nas duas aulas subsequentes (terceira e quarta aula), após a explicação e discussão inicial do assunto ter sido realizada, as mesmas equipes, com os mesmos integrantes, receberam uma folha onde os alunos foram orientados a trabalhar com estudos de casos envolvendo 4 indivíduos (numerados em algarismo romano I, II, III e IV) em situações reais de alterações fisiológicas (Quadro 2).

Descrição dos Estudos de Casos	Atividade e Orientações
<p><b>Caso I</b> - Indivíduo do sexo masculino, 25 anos, praticante de exercícios resistidos e usuário de esteroides anabolizantes androgênicos para fins estéticos há cinco meses. Apresenta aumento moderado de massa magra.</p>	<p>- Observe a seguir quatro indivíduos (I, II, III e IV) em situações reais com modos de vida e sintomatologia próprios.</p>
<p><b>Caso II</b> - Indivíduo do sexo masculino, 25 anos, atleta amador de culturismo (bodybuilder) e usuário de EAA há dez anos. Apresenta aumento moderado de massa magra; ginecomastia e hipogonadismo.</p>	<p>- Faça uma análise comparativa entre os indivíduos I e II e entre os indivíduos III e IV, estabelecendo possíveis causas para os sintomas apresentados e explicações para as semelhanças e diferenças entre os casos, relacionando esse raciocínio com o conteúdo teórico visto em sala.</p>
<p><b>Caso III</b> - Indivíduo do sexo feminino, 25 anos e praticante de atividade física para fins estéticos. Apresenta amenorreia secundária, dificuldade para engravidar, tendência a obesidade e pelos faciais e torácicos desenvolvidos.</p>	
<p><b>Caso IV</b> - Indivíduo do sexo feminino, 25 anos, submetida a uma dieta hipocalórica insuficiente e atleta amadora de triatlo há cinco anos. Apresenta amenorreia secundária e osteoporose.</p>	

Quadro 2: Estudos de casos sobre reprodução humana.

Fonte: Os autores

Os indivíduos I e II eram do sexo masculino, com idade de 25 anos, praticante de exercícios resistidos e usuários de esteroides anabolizantes e apresentavam moderado desenvolvimento de massa muscular magra. Contudo, o indivíduo II era atleta amador e usuário de EAA a dez anos, apresentando ginecomastia e hipogonadismo acentuados, enquanto o indivíduo I não era atleta e usava EAA a três meses para fins estéticos, não apresentando nenhum sintoma expressivo. Os indivíduos III e IV eram do sexo feminino, com idade de 25 anos, praticantes de atividade física, mas com alguns sintomas e hábitos distintos: III era praticante de atividade física para fins estéticos e apresentava obesidade, pelos faciais e no tórax; IV era atleta amadora de triatlo, submetida à rigorosa dieta apresentando osteoporose.

Durantes os estudos de casos, foi permitida a interação entre os integrantes de um mesmo grupo, não sendo permitido o compartilhamento de informações entre as equipes. Os estudos de casos foram centrados na interpretação das alterações fisiológicas dos quatro indivíduos, possíveis causas e patologias associadas, numa perspectiva comparativa.

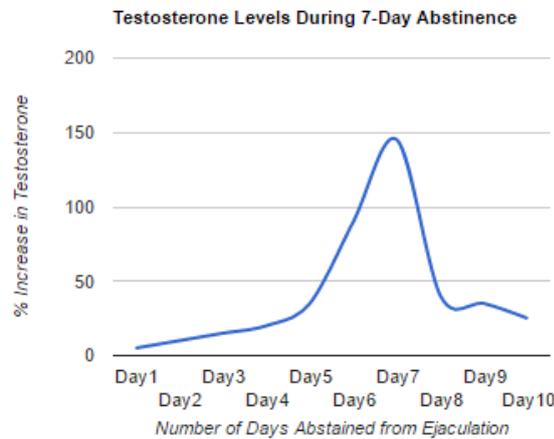
Após a aplicação dos estudos de casos, a estratégia de ensino foi avaliada por um questionário composto por um total de dez questões, sendo seis objetivas de múltipla escolha (a, b, c, d, e) e quatro discursivas (Quadro 3). As primeiras questões, de 1 a 5, abordaram conceitos teóricos de caráter geral sobre o assunto principal das aulas - sistemas reprodutores, já as questões de 6 a 10 foram baseadas nas discussões desenvolvidas a partir dos estudos de casos realizados previamente. Os

mesmos grupos que participaram do *brainstorming* inicial participaram da avaliação enquanto equipe, sendo as respostas realizadas em um único questionário, a partir do compartilhamento de conhecimentos entre os membros de uma mesma equipe.

Todas as atividades realizadas durante esta pesquisa se encontram em consonância com a resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que regulam as pesquisas com seres humanos. Dessa forma, asseguramos que a integridade e o anonimato dos participantes foram mantidos.

<b>Equipe:</b> _____ <b>Integrantes:</b> _____
1. Os sistemas orgânicos humanos (nervoso, endócrino, digestório...) desempenham mais de uma função. Considerando os sistemas reprodutores, que item possui funções comuns, desempenhadas pelos sistemas reprodutores masculinos e femininos humanos? a) gametogênese, fecundação e nidação. b) crescimento do folículo ovariano, fecundação e condução dos gametas. c) gametogênese, condução dos gametas e cópula. d) produção dos gametas, maturação e formação do corpo lúteo. e) produção do líquido seminal e lubrificação pelas glândulas bulbouretrais
2. O sistema reprodutor masculino é formado por diversos órgãos e são classificados de modo geral em gônadas, vias condutoras, glândulas anexas e órgão copulador. Assinale o item que apresenta funções típicas das gônadas: a) produção e transporte das células sexuais (gametas). b) realização do encontro dos gametas (fecundação) e implantação do zigoto. c) maturação dos gametas e sua condução até a fecundação. d) produção dos gametas e dos hormônios sexuais. e) produção dos hormônios sexuais e gonadotróficos.
3. Embora os órgãos que compõem os sistemas fisiológicos sejam cooperativos e harmônicos, estados de desequilíbrio podem acontecer e resultam no surgimento de patologias (doenças). A menstruação retrógrada pode ser um fator que, tipicamente, predispõe para a) câncer de colo de útero b) síndrome dos ovários policísticos (SOP). c) vulvovaginite. d) mioma. e) endometriose

4. O mecanismo de retroalimentação (“feedback”) hormonal ocorre continuamente no organismo humano, permitindo a manutenção do estado de equilíbrio fisiológico (homeostase). O gráfico a seguir demonstra a variação dos níveis de testosterona ao longo de sete dias de abstinência sexual. Considerando o conceito de feedback e as informações do gráfico abaixo, comente sobre a variação do hormônio gonadotrófico ICSH (LH) durante esses sete dias.



Fonte: <https://www.anabolicmen.com/weird-tricks-to-raise-testosterone/> Acesso em 04/12/2017.

5. Diversos compostos podem ser utilizados com o propósito de aumentar o desempenho atlético e entre eles estão os esteroides anabólicos androgênicos (EAA). Defina-os e informe quais os seus principais efeitos colaterais no corpo humano.

6. Utilizando seus conhecimentos sobre fisiologia dos sistemas reprodutores humanos, assinale o item que apresenta as principais vantagens observadas pelo paciente I, após o uso da droga.

- a) Aumento de massa corpórea total e dos triglicerídeos.
- b) Aumento de massa muscular magra, de força e potência.
- c) Redução dos níveis de insulina no sangue e elevação da pressão arterial.
- d) Redução dos níveis de colesterol e aumento dos níveis de testosterona e ICSH.
- e) Aumento de massa muscular magra e hipoglicemia.

7. Sabendo que um hormônio pode estar submetido aos efeitos estimulatórios ou inibitórios de um outro hormônio, assinale a opção que apresenta o provável mecanismo fisiológico de controle hormonal afetado pelas drogas utilizadas pelos pacientes I e II.

- a) Feedback negativo.
- b) Feedback positivo.
- c) Hipergonadismo.
- d) Hipogonadismo.
- e) Amenorreia primária e secundária.

8. Considerando o quadro clínico apresentado pela paciente 4 seja resultado de uma redução acentuada e inesperada dos níveis de progesterona e estrógenos, assinale a opção que apresenta os prováveis níveis de FSH e LH:

- a) FSH alto e LH baixo.
- b) FSH alto e LH alto.
- c) FSH baixo e LH baixo.
- d) FSH baixo e LH alto.
- e) FSH e LH ausentes.

9. A automedicação e a utilização de fármacos em quantidades abusivas podem gerar quadros danosos para a fisiologia humana e potencialmente fatais. Nessa perspectiva, os esteroides anabolizantes androgênicos, quando administrados de forma indiscriminada, podem levar a situações patológicas graves. Faça uma comparação entre os pacientes 1 e 2 estabelecendo hipóteses para os diferentes sintomas apresentados entre eles.

10. Hormônios são substâncias que possuem natureza química típica (lipídica ou peptídica) e, dessa forma, podem ser classificados e estudados a partir de seus precursores. Utilizando seus conhecimentos sobre a produção endógena e as funções dos hormônios sexuais, elabore possíveis explicações para os sintomas apresentados pelos pacientes 3 e 4 e quais soluções poderiam ser sugeridas para restabelecer a homeostase do paciente 4?

Quadro 3. Questionário sobre sistemas reprodutores humanos. As questões 6, 7, 8, 9 e 10 são relativas aos estudos de casos do quadro 2.

Fonte: Os autores

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das respostas dos alunos, por equipe, referentes às questões objetivas apresentou um índice alto de acerto tanto nas perguntas de teoria básica quanto nas questões relacionadas diretamente aos estudos de casos (Quadro 3). Do total de seis questões objetivas, apenas a equipe quatro errou duas questões (67% de índice de acerto) e a equipe 2 errou uma questão (83% de índice de acerto), sendo que as outras duas equipes apresentaram um aproveitamento de 100% para esse tipo de questão (Fig. 1).

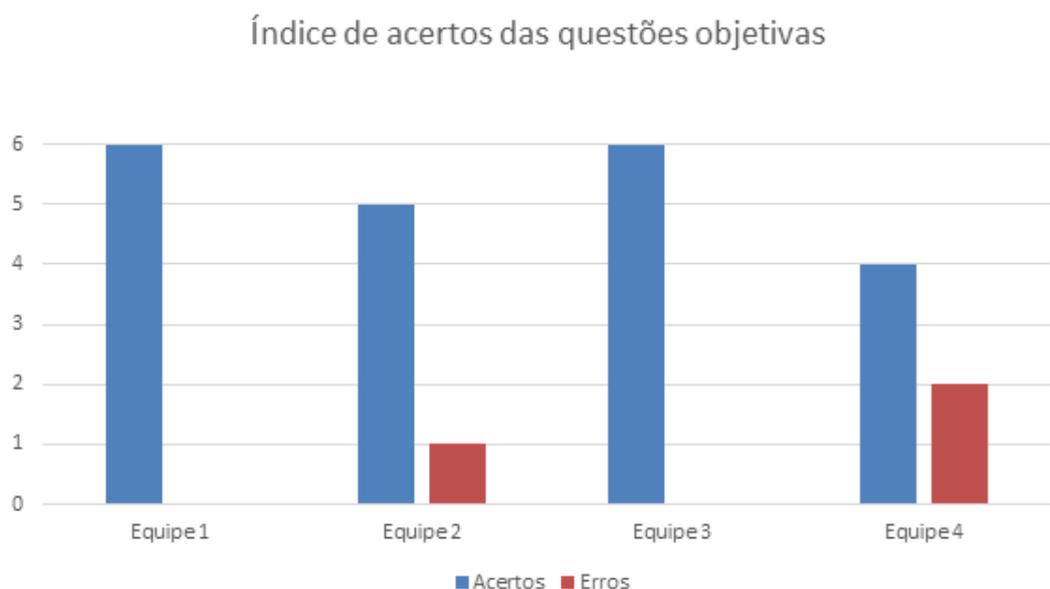


Figura 1: Índice de acertos e erros das questões objetivas sobre conceitos teóricos de reprodução humana e sobre os estudos de casos, por equipe.

Fonte: Os autores

Pesquisas na área de educação em ciências veem demonstrando o potencial da metodologia de estudos de caso para o desenvolvimento de conteúdos informativos

e formativos em diversos níveis de ensino, desde a educação básica (QUEIROZ & CABRAL, 2016) até o ensino superior (SÁ et al., 2007). Nós registramos um elevado percentual de acerto nas questões que envolviam assuntos tradicionalmente considerados de difícil compreensão pelos alunos participantes desta pesquisa, corroborando com o papel didático do uso do estudo de caso como ferramenta facilitadora do ensino e da aprendizagem.

Além disso, durante a realização das aulas com os estudos de casos foi possível observar um crescente interesse e uma acentuada participação dos estudantes. Eles conseguiram paulatinamente articular os conhecimentos prévios com aqueles adquiridos em sala, tanto na interpretação dos casos, envolvendo as explicações e possíveis causas, quanto nas questões discursivas do questionário aplicado na última aula. Foi registrado um percentual reduzido de questões subjetivas respondidas sem embasamento teórico adequado, apenas 31% (Fig. 2).

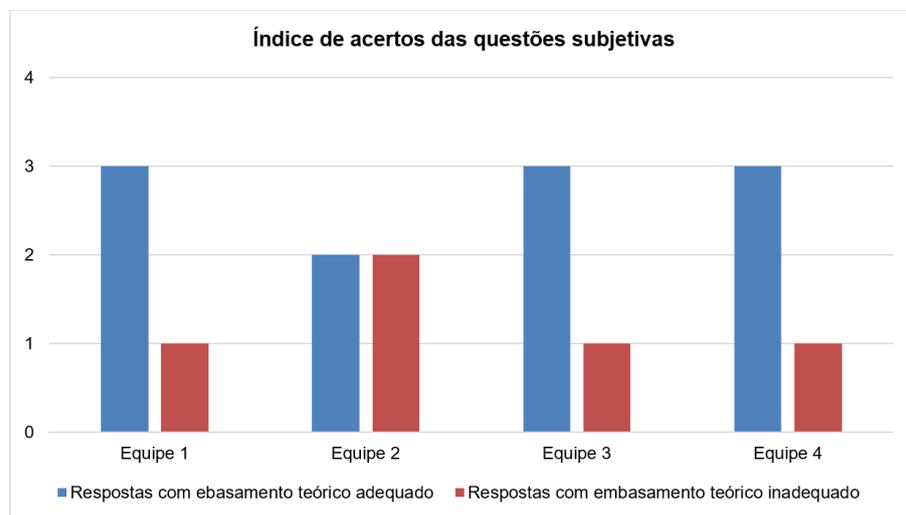


Figura 2: Índice de acerto das questões subjetivas relacionadas aos conceitos teóricos de reprodução humana e sobre os estudos de casos, por equipe.

Fonte: Os autores

Durante o procedimento de responder as perguntas do questionário, os alunos, em sua maioria, conseguiram fazer a associação entre o uso dos esteroides anabolizantes e seus efeitos lesivos ao mecanismo de regulação hormonal de feedback (ABRAHIN & SOUSA, 2013; DARTORA et al, 2014). Foi comentado pelas quatro equipes sobre a possível redução da função testicular (hipogonadismo) presente no indivíduo II estar associada ao uso por longo período em comparação com o indivíduo I que é usuário recente de EAA e, portanto, não apresentaria ainda os efeitos negativos do uso desses fármacos (GUYTON & HALL, 1998). Uma das equipes conseguiu associar adequadamente a Tríade da atleta, doença exposta em sala durante as aulas teóricas iniciais, como provável distúrbio do indivíduo IV (OTIS et al, 1999). No tocante ao indivíduo III, três equipes associaram corretamente as alterações apresentadas como decorrentes da síndrome dos ovários policísticos (ROSSI et al, 2007).

Os pesquisadores que utilizam e pesquisam a aplicação dessa metodologia como uma das estratégias facilitadoras do ensino e da aprendizagem em ciências o fazem destacando em síntese seis atributos que o estudo de caso possui: i) é um método centrado no aluno como sujeito ativo no processo de ensino e aprendizagem; ii) permite a atuação dos professores como intermediadores do processo; iii) possibilita a aproximação com a realidade do aluno; iv) favorece a aquisição de conhecimento científico e tecnológico; v) desenvolve o pensamento crítico e a habilidade de resolver problemas e, ainda vi) contribui para o desenvolvimento do espírito colaborativo quando a atividade é realizada em grupo (QUEIROZ 2015; QUEIROZ & CABRAL, 2016; SÁ et al., 2007; SÁ, QUEIROZ, 2010). Balizados por estes autores atribuímos a aceitação, a participação e os resultados positivos dos estudos de casos para abordar o conteúdo - sistemas reprodutores humanos e distúrbios fisiológicos relacionados com os efeitos potencialmente lesivos de fármacos hormonais - a estes seis atributos, com especial destaque para o fator colaborativo do trabalho em grupo desenvolvido pelos alunos participantes desta investigação.

## 4 | CONCLUSÕES

Analisando as explicações elaboradas pelos estudantes para os estudos de casos e a partir da apreciação dos resultados do processo avaliativo, pode-se perceber que os estudos de casos representaram um importante recurso de ensino, não apenas por expor o conteúdo de modo atrativo, mas também, como metodologia ativa, pois possibilitou envolvimento dos alunos no processo de ensino e aprendizagem.

Ao utilizar situações possíveis, reais e não hipotéticas, o método de estudo de caso permite que o estudante faça parte da construção do seu conhecimento, numa perspectiva prática, levando em consideração seus próprios conhecimentos prévios e os adquiridos durante a exposição teórica e/ou prática. Isto favorece um ambiente interativo, pois envolve a troca de saberes entre os integrantes dos grupos e facilita a criticidade, uma vez que as explicações desenvolvidas devem ser baseadas em teorias e informações científicas a partir das evidências expostas. Além disso, permite a valorização do estudante como agente ativo no processo de ensino-aprendizagem.

## REFERÊNCIAS

ABRAHIN, Odilon Salim Costa; SOUSA, Evitom Corrêa. Esteroides anabolizantes androgênicos e seus efeitos colaterais: uma revisão crítico-científica. *Journal of Physical Education*, v. 24, n. 4, p. 669-679, 2013.

AIRES, Margarida de Mello. *Fisiologia*. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1352 p. 2012.

DARTORA, William Jones; WARTCHOW, Krista Minéia; RODRÍGUEZ ACELAS, Alba Luz. O uso abusivo de esteroides anabolizantes como um problema de saúde pública. *Revista Cuidarte*, v. 5, n. 1, p. 689-693, 2014.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John Edward. Fisiologia humana e mecanismos das doenças. 6<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.

MARTINS, Gilberto de Andrade. Estudo de Caso: Uma estratégia de pesquisa. São Paulo: Atlas, 2006.

OTIS, Carol L. et al. A tríade da atleta: posicionamento oficial. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 5, n. 4, p. 150-158, 1999.

QUEIROZ, Salete Linhares. Estudo de casos aplicados ao ensino de ciências da natureza – ensino médio, 2015. Disponível em: <[http://www.cpscetec.com.br/cpscetec/arquivos/natureza\\_estudo\\_casos.pdf](http://www.cpscetec.com.br/cpscetec/arquivos/natureza_estudo_casos.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2018.

QUEIROZ, Salete Linhares; CABRAL, Patrícia Fernanda de Oliveira (Org.). Estudos de Caso no Ensino de Ciências Naturais. São Paulo: Art Point. 2016.

ROSSI, Patricia de; RIBEIRO, Ricardo Muniz; BARACAT, Edmund Chada. Manual de ginecologia de consultório. São Paulo: Atheneu. 2007.

SA, Luciana Passo. et al. Estudos de caso em química. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 731-739, 2007.

SÁ, Luciana Passos; QUEIROZ, S. L. Estudo de casos no ensino de química. 2 ed. Campinas: Átomo, 2010.

## INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA DO PIBID CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM SALA DE RECURSO MULTIFUNCIONAL

### **Emellyn Gabriela Ioris**

Mestranda em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR

### **Claudinei de Freitas Vieira**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR

### **Leide Daiane Nascimento Mascarello**

Mestranda do programa em Agroecossistema, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR

### **Michele Potrich**

Professora na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, COBIO

**RESUMO:** A intervenção pedagógica foi desenvolvida por alunos bolsistas do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID) do curso de Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-DV. Este trabalho teve como objetivo trabalhar com alunos da Sala de Recursos que apresentam dificuldades no aprendizado e na assimilação do conteúdo transposto nas aulas de Ciências e Biologia. O trabalho se desenvolveu através da parceria com professora regente da Sala de Recursos, que se propôs a ajudar na execução da atividade. O trabalho se desenvolveu durante o período de quatro semanas, onde foram aplicadas atividades

de cunho pedagógico, sendo que em cada semana foi cumprida uma etapa de conteúdos práticos, sobre conceitos de meio ambiente, germinação de semente, fotossíntese, destinação correta de lixo e reutilização de materiais. O desenvolvimento do trabalho foi acompanhado pela supervisora do PIBID no colégio e teve atuação efetiva de todos os pibidianos. Na atividade observou-se a interação dos alunos durante a execução dos conteúdos de maneira dinâmica e interdisciplinar, sendo que o interesse no aprendizado em Ciências e Biologia foi satisfatório e gerou resultados positivos no desempenho dos alunos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Educação Especial, Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência, Ensino de Ciências e Biologia

**ABSTRACT:** A pedagogic intervention was developed by stock exchange pupils from the Institutional Program of Stock Exchange of Initiation to the Teaching (PIBID) of the course of Biological Sciences of the Federal Technological University of the Paraná – UTFPR-DV. This work had as I aim to work with pupils of the resource Room who present difficulties in the apprenticeship and in the assimilation of the content transposed in the classrooms of Sciences and Biology. The work was developed through the partnership with teacher by regent of the resource Room, which it intended to help

in the execution of the activity. The work was developed during the period of four weeks, where activities of pedagogic hallmark were applied, being that in each week a stage of practical contents was carried out, on concepts of environment, germination of seed, photosynthesis, correct destination of garbage and reuse of materials. The development of the work was accompanied by the supervisor of the PIBID in the college and it had effective acting of all the pibidianos. In the activity the interaction of the pupils was observed during the execution of the contents of dynamic and interdisciplinary way, being that the interest in the apprenticeship in Sciences and Biology was satisfactory and produced positive results in the performance of the pupils.

**KEY-WORDS:** Special education, Institutional Program of Stock Exchange of Initiation to the Teaching, Teaching of Sciences and Biology.

## 1 | INTRODUÇÃO

A sala de recurso multifuncional funciona como uma ferramenta pedagógica na modalidade de Educação Especial, para complementar/suplementar o aprendizado de estudantes com deficiência, transtornos globais do desenvolvimento, altas habilidades/superdotação, e tem como característica a não substituição do espaço da sala de aula comum, mas sim auxiliar estes estudantes, assegurando-lhes condições de melhor participação e aprendizagem.

No objetivo da inclusão, o direito à aprendizagem e o acesso a níveis mais elevados de educação fazem parte do que está posto como igualdade de direitos e de oportunidades educacionais para todos (LOPES; MARQUEZINE, 2012).

Segundo Fonseca (2015), a Sala de Recursos Multifuncionais é um espaço de aprendizagem e compreensão dos processos cognitivos, sociais e emocionais, visando à superação das dificuldades de aprendizagem e o desenvolvimento de diferentes possibilidades dos sujeitos.

Nesse contexto, visando que a escola permite a interação de diversas ferramentas, procura-se trabalhar com a interdisciplinaridade, levando o conhecimento de outras áreas para a sala de aula, para oportunizar a eficiência na transposição dos conteúdos sempre procurando eliminar ao máximo as discrepâncias que por ventura venham a interferir no trabalho.

O presente trabalho teve como objetivo trabalhar com alunos da Sala de Recursos que apresentam dificuldades no aprendizado e na assimilação do conteúdo transposto nas aulas de Ciências e Biologia, buscando a interação com os alunos, no contexto que se refere melhoria de aprendizagem e a realização de atividades interdisciplinares, levando ao aluno um estímulo positivo que o desperta para algo diferente e inovador, cativando o aluno a aprender.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em um Colégio Estadual da rede pública do município de Dois Vizinhos-PR, com uma turma da Sala de Recursos que funcionava no período contrário das aulas regulares. A turma era composta por 10 alunos matriculados no Ensino Fundamental II (7) e Ensino Médio (3), todos devidamente avaliados e respaldados com laudos médicos para frequentarem essa classe. Estes laudos permitiram o estudo prévio antes da elaboração da atividade de intervenção. A professora responsável pela sala de Sala de Recursos concedeu espaço de uma tarde por semana (duas horas), durante quatro semanas.

O trabalho foi desempenhado por seis alunos bolsistas do PIBID e teve orientação da professora supervisora do PIBID da referida escola. Houve divisão de atividades práticas entre os bolsistas nas principais temáticas sobre conceitos de meio ambiente, germinação de semente, fotossíntese, destinação correta de lixo e reutilização de materiais, sendo cada um dos seis pibidianos responsáveis em preparar e organizar uma aula prática. Depois da formulação de um plano de aula, por cada pibidiano e sua determinada atividade, foi marcada a data para executar a atividade com os alunos.

Os alunos ficaram responsáveis por levar cada material solicitado pelos pibidianos como: materiais orgânicos, garrafas PET's, sementes de hortaliças, entre outros, para o desenvolvimento das práticas e as atividades que foram desenvolvidas no ambiente da horta do colégio bem como ferramentas para o desenvolvimento das mesmas. Em seguida, foi entregue para os alunos uma tabela de acompanhamento para anotação da observação diária da germinação da semente.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira semana a abordagem feita foi sobre a reutilização de materiais recicláveis, a importância do respeito com o meio ambiente e redução do consumismo. Nesta etapa, através de diálogo, foi proporcionado aos alunos tempo para que eles pudessem expor individualmente o conhecimento sobre o assunto onde os alunos explanarão que conheciam muitas coisas e conceitos que aprenderão com os pais, onde eles ajudavam em casa na reciclagem e muitos deles reutilizavam os matérias para outros fins, como criar hortas verticais sempre na intenção de discutir a importância de diminuir o consumo e reutilizar materiais. Também foi solicitado para que os alunos levassem litros de garrafas PET's para confecção de minicomposteiras, onde o produto final seria utilizado na horta escolar.

Na segunda semana, foi levado aos alunos sementes de leguminosas para ser trabalhado as questões de composição química da semente, as etapas do processo de germinação, importância da luminosidade do Sol e da nutrição pela água para os seres vivos, em especial as plantas. Nesta etapa, foi debatido com os alunos características morfológicas e fisiológicas necessárias para que a planta cresça e se desenvolva

naturalmente. Para melhor entendimento do assunto, as sementes foram plantadas em recipiente com substrato e alocadas de forma apropriada para o desenvolvimento.

Na terceira semana, o assunto que foi abordado teve como concordância a importância dos cloroplastos presentes nas plantas e a ação da energia química e luminosa nos vegetais, onde os alunos demonstraram grande interesse em estar aprendendo como que as plantas absorviam a luz e as metabolizavam tendo o cloroplasto desempenhando um papel muito importante na fotossíntese.

Na quarta semana, os alunos ficaram muito felizes por saberem além de aprenderem que os materiais orgânicos podem ser um principal fator para o crescimento das plantas e que o adubamento no solo é de grande importância, bem como ficaram ansiosos em chegarem em casa e poderem elaborar os próprios adubos com restos de alimentos que sobram em suas casas.

Como método avaliativo, foi solicitado que os alunos reproduzissem de forma discursiva as atividades realizadas, e sobre o que eles aprenderam com o projeto. Alguns alunos preferiram utilizar a oralidade como forma de expressão, em decorrência dos limites individuais.

O tema escolhido para ser trabalhado com os alunos foi a construção de uma horta escolar, sendo este o objetivo final após a sequência de conteúdos trabalhados. Essa temática possibilitou utilizar uma metodologia que respeitasse o tempo e o espaço de cada aluno com maior significância ao que se propunha ensinar, para um melhor aproveitamento de todos.

## **4 | CONCLUSÕES**

Portanto os conhecimentos e experiências que foram adquiridas e transpostas nesta atividade nos faz refletir o quão é importante e necessária à abordagem com diferentes realidades, que podem ser encontradas na profissão de futuro educador. A prática da interdisciplinaridade tem maior eficiência quando é aplicada com carinho e dedicação tornando os alunos mais motivados em participar das aulas, bem como a eficiência no desenvolvimento cognitivo e despertar dos interesses sociais e particulares de cada indivíduo em aprender Ciências e Biologia, em uma abordagem voltada na educação inclusiva.

## **AGRADECIMENTOS**

Capes.

## REFERÊNCIAS

FONSECA, Janini Galvão. **O Atendimento Educacional Especializado e o uso das Tecnologias nas Salas de Recursos Multifuncionais no Ensino Médio Público do Distrito Federal.** UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-FACULDADE DE EDUCAÇÃO-PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO. 126 p. 2015

LOPES, Esther; MARQUEZINE, Maria Cristina. **Sala de recursos no processo de inclusão do aluno com deficiência intelectual na percepção dos professores.** Rev. bras. educ. espec. [online]. 2012, vol.18, n.3, pp. 487-506. ISSN 1413-6538. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-65382012000300009>> Acesso em 20 ago. 2015

## UTILIZAÇÃO DO LÚDICO NO ENSINO DE BIOQUÍMICA: JOGOS DE ENCAIXE PARA DEMONSTRAÇÃO DIDÁTICA DE MUDANÇAS ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DA GLICÓLISE

**Maria Julia Sousa da Fonseca**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas – Ceará

**Rebeca Eller Ferreira**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas – Ceará

**Luis Flávio Mendes Saraiva**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas – Ceará

**RESUMO:** Muitos assuntos em bioquímica, como glicólise, possuem uma maior dificuldade de assimilação devido às complexas vias de reações. Por esse motivo, esses assuntos tornam-se “decorativos” não sendo totalmente fixados ou compreendidos pelos alunos. Uma vez que esses assuntos não são fixados, uma falha na aprendizagem é gerada e levada adiante em outras disciplinas, visto que bioquímica é pré-requisito para outras disciplinas. O lúdico é, por muitas vezes, o meio pelo qual os professores utilizam em suas aulas, para enriquecer e facilitar o aprendizado dos alunos, como também para reduzir falhas que possam ser encontradas durante a aprendizagem de assuntos complexos. O objetivo desse trabalho é diminuir as dificuldades encontradas pelos discentes durante a aprendizagem do assunto referente à glicólise na disciplina de bioquímica. Para a construção do modelo foram utilizadas

peças de encaixe do tipo macho/fêmea as quais foram utilizadas para representar as moléculas de cada etapa da glicólise. Na aplicação em sala de aula, os alunos responderam a um questionário acerca do assunto para sabermos o que eles haviam absorvido da aula expositiva, ministrada anteriormente. Após a aplicação do primeiro questionário, foi feita a apresentação do modelo e outra aula foi dada utilizando-o. Após disso, um segundo questionário avaliativo, com as mesmas questões anteriores, foi passado. Diante dos resultados, foi notório que o uso do modelo didático foi capaz de diminuir o número de questões erradas ou não respondidas, mostrando assimilação da explicação durante a apresentação do modelo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Jogos; Bioquímica; Ensino.

**ABSTRACT:** Many subjects in biochemistry, such as glycolysis, have a greater difficulty in assimilation due to the complex pathways of reactions. For this reason, these subjects become “decorative” not being fully fixed or understood by students. Since these subjects are not fixed, a learning failure is generated and carried forward in other disciplines, since biochemistry is a prerequisite for other disciplines. Playfulness is often the means by which teachers use their classes to enrich and facilitate student learning as well as to reduce

failures that can be encountered while learning complex subjects. The objective of this work is to reduce the difficulties encountered by students during the learning of the subject related to glycolysis in the discipline of biochemistry. For the construction of the model were used fitting parts which were used to represent the molecules of each step of the glycolysis. In the classroom application, the students answered a questionnaire about the subject in order to know what they had absorbed from the previously given lecture. After the application of the first questionnaire, the presentation of the model was made and another class was given using it. After that, a second evaluative questionnaire, with the same previous questions, was passed. In view of the results, it was clear that the use of the didactic model was able to reduce the number of wrong or unanswered questions, showing the assimilation of the explanation during the presentation of the model.

**KEYWORDS:** Games; Biochemistry; Teaching.

## 1 | INTRODUÇÃO

Estar diante de um assunto que gostamos pode facilitar consideravelmente nosso aprendizado, porém, isso nem sempre será o suficiente. Para a Bioquímica ser compreendida é necessário um grau de abstração que muitos discentes da saúde podem apresentar dificuldades para desenvolver.

Muitos assuntos em bioquímica, como os de metabolismo, possuem uma maior dificuldade de assimilação devido às complexas vias de reações. Por esse motivo, esses assuntos se tornam “decorativos” não sendo totalmente fixados ou compreendidos pelos alunos. Além disso, segundo Schoenmaker (2009, apud OLIVEIRA et al, 2015, p. 47), a disciplina de bioquímica está presente em vários cursos relacionados a saúde e por ser pré-requisito para outras disciplinas, uma falha na aprendizagem comprometeria a formação do aluno.

É comum reclamações entre os discentes acerca de assuntos extensos e complexos. Afirmam não conseguirem absorver todo o conteúdo ou até mesmo não compreender por completo. O lúdico é, por muitas vezes, o meio que os professores utilizam em suas aulas, para enriquecer e facilitar o aprendizado dos alunos. Isso tem se tornado uma eficaz ferramenta nas mãos dos docentes, uma vez que tem sido utilizado para reduzir falhas que possam ser encontradas durante a aprendizagem de assuntos complexos.

Diante disso, é possível perceber a importância da elaboração de trabalhos relacionados à área de ensino. Ainda mais, é importante desenvolver, juntamente com os alunos, melhores métodos que venham a acrescentar o ensino dentro das universidades, tendo como foco nesse presente trabalho, a disciplina de bioquímica.

Levando em consideração os assuntos complexos presentes na disciplina de bioquímica, foi tomado como base o conteúdo referente à glicólise. Assunto o qual tem causado, muitas vezes, uma aversão nos alunos ao se depararem com tantas

reações, nomes de enzimas e produtos do metabolismo. Com isso, o uso de uma ferramenta lúdica coadjuvante ao ensino desse conteúdo, pode ser algo inovador dentro da disciplina, influenciando diretamente e positivamente o aprendizado dos alunos.

Dessa maneira, foi tomado como objetivo, reduzir as dificuldades encontradas pelos discentes durante a aprendizagem do assunto referente à glicólise na disciplina de bioquímica.

## 2 | REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Yokaichiya (2004), devido a complexidade de seus conteúdos, a bioquímica se tornou uma disciplina difícil de ser ministrada e compreendida pelos discentes. Com isso, muitas atividades lúdicas têm sido escolhidas para o auxílio no ensino de conteúdos dentro da bioquímica, com intuito de despertar o interesse e favorecer o aprendizado do aluno. (OLIVEIRA, 2015)

Assuntos do metabolismo celular, como ciclo de Krebs, fotossíntese e glicólise são do tipo abstrato que requerem um conhecimento prévio acerca de biologia e química. (Gomes e Messeder, 2014, apud SANTOS et al, 2014) A idéia do lúdico na sala de aula vai exatamente de encontro a quebra do abstrato, tornando possível uma melhor visualização do conteúdo teórico.

O uso do lúdico atua de várias formas na construção do aprendizado do aluno e apresenta muitos benefícios. Segundo Carl R. Rogers (1983. p. 149- 167, apud Roloff) na sala de aula o aluno tem a possibilidade de estimular e desenvolver uma auto-estima, uma valorização própria, onde o lúdico atua como um estímulo positivo, facilitando e integrando a aprendizagem, trabalhando o lado cognitivo, social e emocional do aluno.

## 3 | ASPECTOS METODOLÓGICOS

Para a montagem do modelo foram utilizados peças de encaixe do tipo macho e fêmea (Pinos mágicos- Elka), feitas de material plástico, com diversas cores e números de encaixes. Além disso, foram utilizados botões plásticos como complemento na montagem. Também foram usados papel e canetinha para a confecção das placas que levaram o nome de cada molécula.

Cada montagem de peças representou uma estrutura presente em cada uma das 10 etapas da glicólise. Onde cada peça representava um elemento contido na molécula. Os botões também foram usados para reproduzir a adição ou perda de fosfato, ATP (Adenosina Tri-Fosfato) ou molécula de água.

Após a montagem, a idéia proposta pelo modelo é ser apresentado em sala de aula onde os alunos irão observar o modelo e colocar as placas com os nomes das moléculas participantes de cada etapa. Quando tudo estiver nomeado, os alunos irão

explicar resumidamente o porquê de terem escolhido cada placa e o que ocorre em cada etapa. Ao término da aula, será respondido um questionário, onde os próprios alunos irão avaliar a eficiência e eficácia do modelo proposto em sala de aula.

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo didático produzido, o qual representou passo a passo as etapas da glicólise, foi um excelente meio de visualização dessas etapas. Onde foi possível identificar mudanças estruturais das moléculas. A nomeação de cada peça também auxiliou a fixação dos nomes das moléculas, substituindo a continua decoração de nomes que era feita pelos alunos.

Além disso, o modelo incita os alunos a usarem da criatividade no momento de montagem, tornando o processo ainda mais dinâmico e instigando o discente cada vez mais usar seus conhecimentos prévios e adquiridos na aula teórica durante a montagem de cada etapa.

O assunto de bioquímica referente à glicólise é amplamente abordado nos cursos de ciências biológicas e da saúde. De forma geral, é sabida a dificuldade encontrada pelos acadêmicos nesse conteúdo, uma vez que é apresentada em dez etapas, cada uma contendo mudanças estruturais ocasionadas por enzimas específicas. Por esse motivo, modelos didáticos podem configurar-se ferramentas adicionais valiosas no ensino de disciplinas complexas.

#### 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, a utilização de meios didáticos como adjutórios na construção da aprendizagem tem se mostrado eficaz, sendo tal afirmação comprovada por estudos já feitos, como os citados acima. Por esse motivo, desenvolver novas metodologias que atuam de forma coadjuvante no ensino é de modo essencial na licenciatura.

#### REFERÊNCIAS

GOMES, L. M. J. B.; MESSEDER, J. C. Fotossíntese e respiração aeróbica: vamos quebrar a cabeça? Proposta de jogo. Revista do Ensino de Bioquímica, 12(2), 2014.

OLIVEIRA, F. S et al. Um jogo de construção para o aprendizado colaborativo de Glicólise e Gliconeogênese. Revista de ensino em bioquímica V13, N1. Rio de Janeiro, 2015.

ROGERS, Carl Ransom. et al. Em busca da vida. São Paulo: Summus, 1983.

ROLLOF, E. M. A importância do lúdico em sala de aula.

SANTOS, J.B et al. A utilização de recurso didático para o ensino da bioquímica. Recife, 2014.

SCHOENMAKER, F. Análise das dificuldades na disciplina de Bioquímica diagnosticadas por um Plantão por um Plantão de Dúvidas online. Universidade de São Paulo, 2009.

YOKAICHIYA, D. K, GALEMBECK, E. ; TORRES, B.B. O que alunos de diferentes cursos procuram em disciplinas extracurriculares de bioquímica? Revista Brasileira de ensino de Bioquímica e Biologia molecular. São Paulo, 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 (biossurfactantes). 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 978-85-7247-037-7



9 788572 470377