



Biological

Sciences

Foudantions

Patrícia Michele da Luz
(Organizadora)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Karine de Lima

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)

B615 Biological sciences foudantions [recurso eletrônico] / Organizadora
Patrícia Michele da Luz. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora,
2019.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-173-2

DOI 10.22533/at.ed.732191303

1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. I. Luz,
Patrícia Michele da.

CDD 574

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

Patrícia Michele da Luz

(Organizadora)

Biological Sciences Foudantions

Atena Editora

2019

APRESENTAÇÃO

A presente obra, que se oferece ao leitor, nomeada como “ Biological Sciences Foudantions ” de publicação da Atena Editora, aborda 11 capítulos envolvendo estudos biológicos de Norte a Sul do Brasil. Possuindo temas com vasta importância para compreendermos a importância do conhecimento interferindo na nossa vida.

Alguns estudos abrangem pesquisas realizadas com auxílio de geotecnologia, melhoramento genético e estudos citogenéticos, atividades enzimáticas, com diferentes classes de animais e plantas, relatando os distintos problemas distintos de saúde pública com visão de minimizar os efeitos causados por doenças transmitidas por insetos. Temos também pesquisas com áreas de qualidade de água subterrânea; ensino de microbiologia por jogos pedagógicos e sobre perfil epidemiológico de infecções para os pacientes oncológicos.

Apesar dos avanços tecnológicos e as atividades decorrentes, ainda temos problemas recorrentes que afetam nossa vida, causadores de riscos visíveis e invisíveis à saúde de todos dos humanos. Diante disso, lembramos a importância de discutir questões sobre a saúde pública da população, para aumentar a qualidade de vida.

Agradecemos sinceramente aos autores dos diversos capítulos, pela dedicação e esforços sem limites, que viabilizaram esta obra que retrata os recentes avanços científicos e todos os Organizadores da Atena Editora.

Por fim, esperamos que esta obra possa colaborar e instigar mais estudantes e pesquisadores na constante busca de novas pesquisas e assim, garantir a um melhor ambiente para futuras gerações, minimizando os efeitos de doenças.

Patrícia Michele da Luz

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE ESPACIAL DA PAISAGEM E A INCIDÊNCIA DA COCHONILHA-DO-CARMIM (<i>DACTYLOPIUS OPUNTIAE</i>) EM PALMA FORRAGEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS	
Jackson Pinto Silva Claudio José dos Santos Junior Melchior Carlos do Nascimento Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrisoli	
DOI 10.22533/at.ed.7321913031	
CAPÍTULO 2	11
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DE UM ISOLADO DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> (BALS.) VUILLEMIN <i>IN VITRO</i>	
Gabryel Cezar da Silva Marinho Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.7321913032	
CAPÍTULO 3	24
CARACTERIZAÇÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS RADICULARES DE <i>Allium Cepa L.</i> DO BULBO GRANDE	
Vitória Réggia Ferreira Lopes Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.7321913033	
CAPÍTULO 4	37
CONTROLE BIOLÓGICO E MONITORAMENTO DO MOSQUITO <i>Aedes</i> NO CAMPO	
Adriano Rodrigues de Paula Anderson Ribeiro Leila Eid Imad Silva Eduardo Rodrigues de Paula Richard Ian Samuels	
DOI 10.22533/at.ed.7321913034	
CAPÍTULO 5	46
DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE BORRACHUDOS (DIPTERA: SIMULIIDAE) DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL: INVENTÁRIO FAUNÍSTICO DA MESORREGIÃO NOROESTE RIO-GRANDENSE	
Sirlei Maria Hentges Tieli Cláudia Menzel Milton Norberto Strieder	
DOI 10.22533/at.ed.7321913035	
CAPÍTULO 6	53
IDENTIFICAÇÃO DE <i>Cryptococcus Sp.</i> EM EXCRETAS DE POMBOS – REGIÃO CENTRAL DE SÃO PAULO	
Karen Dias Costa Jorge Luís Freire Pinto Alípio Carmo Rildo Yamaguty Lima Marília Patrão Sandra Nunes Messias	

Fernando Luis Affonso Fonseca
Flávia de Sousa Gehrke
DOI 10.22533/at.ed.7321913036

CAPÍTULO 7 61

O USO DE JOGOS PEDAGÓGICOS NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA

Márcia Regina Terra
Rafaela Sterza da Silva
Elisa Barbosa Leite da Freiria Estevão
Dayanna Saeko Martins Matias da Silva
Fernanda Gianelli Quintana
Ednalva de Oliveira Miranda Guizi

DOI 10.22533/at.ed.7321913037

CAPÍTULO 8 75

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

Bruno Oliveira de Veras
Katharina Marques Diniz
Fernanda Granja da Silva Oliveira
Maria Betânia Melo de Oliveira
Alexandre Gomes da Silva
Márcia Vanusa da Silva

DOI 10.22533/at.ed.7321913038

CAPÍTULO 9 83

PERSISTÊNCIA DE BLASTOSPOROS DE *Metarhizium Anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes Aegypti*

Simone Azevedo Gomes
Aline Teixeira Carolino
Josiane Pessanha Ribeiro
Thais Berçot Pontes Teodoro
Richard Ian Samuels

DOI 10.22533/at.ed.7321913039

CAPÍTULO 10 89

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS DA CIDADE DE CAMPOS DO JORDÃO – SP

Daniela Rodrigues Norberto
Alexandre Magno Batista Machado

DOI 10.22533/at.ed.73219130310

CAPÍTULO 11 93

SCREENING OF L-ASPARAGINASE THE SALT-TOLERANT AND THERMOSTABLE MARINE *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN SR61

Bruno Oliveira de Veras
Yago Queiroz dos Santos
Anderson Felipe Jácome de França
Penha Patricia Cabral Ribeiro
Elaine Costa Almeida Barbosa
Krystyna Gorlach-Lira

DOI 10.22533/at.ed.73219130311

SOBRE A ORGANIZADORA..... 101

ANÁLISE ESPACIAL DA PAISAGEM E A INCIDÊNCIA DA COCHONILHA-DO-CARMIM (*DACTYLOPIUS OPUNTIAE*) EM PALMA FORRAGEIRA NO ESTADO DE ALAGOAS

Jackson Pinto Silva

Mestre em Análise de Sistemas Ambientais. Graduado em Geografia. Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do IFAL-Campus Maceió, E-mail: comunicacaoifal@gmail.com;

Claudio José dos Santos Junior

Bolsista de Iniciação Científica. Estudante do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, E-mail: claudiosantos_al@hotmail.com;

Melchior Carlos do Nascimento

Geógrafo, Mestre em Ciência Florestal e Doutor em Geografia. E-mail: melchior.nascimento@igdema.ufal.br;

Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrisoni

Bióloga, Doutora e Mestre em Entomologia E-mail: carlaruthdecarvalhobarbosa@gmail.com

RESUMO: A identificação dos ambientes propícios ao desenvolvimento dos insetos-praga pode permitir o planejamento de ações preventivas e mitigadoras na condução de projetos agropecuários. Isso é possível com o estabelecimento de faixas climáticas e sua locação em mapas, mediante a modelagem digital das atuais condições de temperatura e CO₂, bem como de cenário futuro. Nesse sentido, o objetivo da pesquisa é identificar as lavouras de palmas forrageiras em Alagoas susceptíveis à incidência da cochonilha-do-carmim por meio do uso de geotecnologias, avaliando a ocorrência nas áreas de intensa

atividade agrícola, pela presença e ausência do inseto e variáveis climáticas, além de mapear por meio de SIG. O estudo utilizou dados do inventário das amostragens de *D. opuntiae* pela ADEAL onde foram gerados dados qualitativos de incidência do inseto e mapas de ocorrência. A pesquisa utilizou dados climáticos do Instituto Nacional de Meteorologia durante o período de 2005-2016. O inseto ocorreu em cinco Unidades Locais Sanidade Animal Vegetal (ULSAV), durante o período de 2010 a 2016. As porcentagens de incidência do inseto foram de 17%, 17% e 28,9% em ordem crescente nas ULSAV's de Delmiro Gouveia, Mata Grande e Santana do Ipanema, respectivamente. As variáveis climáticas não tiveram efeitos sobre a presença ou ausência nas regiões amostradas ao longo do período analisado. As lavouras de palma forrageira estão localizadas na região da bacia leiteira e semiárida alagoana.

PALAVRAS-CHAVE: cochonilha-do-carmim, risco fitossanitário, variáveis ambientais, ULSAV.

ABSTRACT: The identification of suitable environments for the development of insect pests can allow the planning of preventive and mitigating actions in conducting agricultural projects. This is possible with the establishment of tracks and your location in maps, by digital modeling of current temperature and CO₂, as

well as future scenario. In this sense, the objective of the research is to identify the crops of fodder Palms in Alagoas susceptible to incidence of cochineal Carmine-through the use of GeoTechnologies, evaluating the occurrence in areas of intense agricultural activity, by the presence and absence of the insect and climatic variables, in addition to map through the SIG. The study used data from the inventory of sampling of *D. opuntiae* by ADEAL where qualitative data were generated insect incidence and maps. The research used climate data from the National Institute of meteorology during the 2005-2016 period. The bug occurred in five Local Animal Health Units (ULSAV), during the period from 2010 to 2016. The percentages of incidence of the bug were 17%, 17% and 28.9% in ascending order in the ULSAV's of Delmiro Gouveia, Mata Grande and Santana do Ipanema, respectively. Climatic variables had no effect on the presence or absence in the regions sampled over the analysis period. The forage palm plantations are located in the semi-arid region of dairy basin and Alagoas.

KEYWORDS: cochineal-Carmine, phytosanitary risk, environmental variables, ULSAV

INTRODUÇÃO

A cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) (Hemiptera: Dactylopiidae) é uma das diversas espécies do gênero *Dactylopius* que produzem o corante carmim, criadas em cactáceas podendo se transformar em praga se a lavoura não for conduzida tecnicamente ou se forem disseminadas livremente nas plantas (WARUBY et al., 2005). Caracterizado por liberar um líquido vermelho, parecido com sangue, ao ser esmagado, o inseto é utilizado pela indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e têxtil, para produção de corante vermelho, no entanto, sua população sem o devido manejo, pode fugir ao controle e passar a atacar palmas, podendo levar à morte (LOPES, 2009). Em 2011 A Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas (ADEAL) registrou a ocorrência do inseto no município de Ouro Branco, Sertão alagoano, em torno de 30 km do município pernambucano de Itaíba, localidade onde a praga já estava instalada (ADEAL, 2011). Como esse inseto é considerado uma das principais ameaças à palma forrageira, a Superintendência Federal da Agricultura em Alagoas (SFA/AL) tem desenvolvido ações para conter essa praga com inspeções nas propriedades da região para delimitar a área atingida e o início da sua contenção (ADEAL, 2011). Em Alagoas, a ADEAL cadastrou as propriedades e georreferenciou as áreas ocupadas com as lavouras, organizando palestras com os produtores sobre o perigo da praga e como identificá-la (ADEAL, 2011).

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* L.) Mill (*Caryophyllales: Cactaceae*) consiste em uma importante lavoura do Sertão nordestino, resistente à seca e que ajuda à alimentação de animais, com 500 mil hectares plantados no Nordeste (MOURA et al. 2011). A palma é a segunda cultura mais plantada em Alagoas, só perdendo para a cana-de-açúcar (AMORIM, 2011). Dessa forma, a caracterização das zonas de produção, a distribuição geográfica das enfermidades, diagnóstico dos agentes etiológicos e controle de pragas são essenciais para se estabelecer estratégias

eficazes de prevenção (MAPA, 2006).

De acordo com a Convenção Internacional de Proteção Fitossanitária (CIPF, 1997), conceitua-se que, praga quarentenária A2 é a que têm importância econômica potencial para uma área posta em perigo possui disseminação restrita e estão sob controle oficial. A cochonilha-do-carmim é, portanto uma praga quarentenária A2 presente no território alagoano (ADEAL 2017). A Instrução Normativa (IN) nº 23, de 29 de maio de 2007, atua no controle do trânsito de raquetes e dos focos por parte do produtor (MAPA, 2007). No Brasil cada Estado legisla sobre seus domínios geográficos (FAO, 2002).

A identificação dos ambientes propícios ao desenvolvimento dos insetos-praga permiti o planejamento de ações preventivas e mitigadoras na condução de projetos no setor agropecuário. Isso é possível com o estabelecimento de faixas climáticas e sua locação em mapas, mediante a modelagem digital das atuais condições de temperatura e CO₂, bem como de cenário futuro, projetando a evolução dessas pragas ao longo do território nacional (FONSECA et al. 2011).

Nesse contexto, o geoprocessamento que consiste no conjunto de tecnologias de coleta, tratamento, manipulação e apresentação de informações espaciais georeferenciadas, no qual há a utilização de diferentes sistemas: de digitalização, de conversão de dados, de modelagem digital do terreno, de processamento de imagens, e os de informação geográfica ou SIG. (SENA, 2012). O geoprocessamento possibilita a confecção de mapas para diferentes finalidades, através do manuseio de informações nos formatos vetorial e/ou matricial, que armazena dados geográficos (pontos, linhas e áreas como uma série de coordenadas e identificadores de cada dado) que podem ser descritos sob a forma de duas coordenadas geográficas e que armazena informação geográfica (APARÍCIO, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização e localização da área de estudo

O estudo da pesquisa localiza-se na porção ocidental do estado de Alagoas, com uma área de 8.084,79Km², o que corresponde a 29,03% da área total territorial do Estado (27.933,1 Km²), com uma população de 392.812 pessoas (IBGE 2010) correspondendo a 12,58% da população alagoana. Limita-se com Pernambuco na porção setentrional, com a Bahia no extremo Oeste e com o rio São Francisco na porção Sudoeste correspondendo a todos os municípios que integram as microrregiões alagoanas de: Serrana do Sertão Alagoano (Água Branca, Canapi, Inhapi, Mata Grande, Pariconha), Alagoana do Sertão do São Francisco (Delmiro Gouveia, Olho d'Água do Casado, Piranhas), Santana do Ipanema (Carneiros, Dois Riachos, Maravilha, Ouro Branco, Palestina, Pão de Açúcar, Poço das Trincheiras, Santana do Ipanema, São José da Tapera, Senador Rui Palmeira); dois municípios da microrregião de Batalha

(Major Isidoro, Olivença), essas microrregiões fazem parte da mesorregião do Sertão e apenas dois municípios da microrregião de Palmeiras dos Índios (Estrela de Alagoas, Minador do Negrão) que fazem parte da mesorregião do Agreste.

O estudo foi realizado em áreas de cultivo de palma forrageira nos municípios do estado de Alagoas (Quadro 01) utilizando-se de dados dos levantamentos/inventário das amostragens da *D. opuntiaede*.

Município	Área Oficial (km ²) (2010)	P o p u l a ç ã o (2010)	IDH (2010)	PIB Per capita (2014)
Agua Branca	468,225	19.377	0,549	5.453,11
Canapi	602,778	17.250	0,506	4.343,83
Carneiros	101,853	8.290	0,526	4.824,24
Delmiro Gouveia	626,69	48.096	0,612	9.370,66
Dois Riachos	139,85	10.880	0,532	5.187,74
Estrela de Alagoas	260,772	17.251	0,534	4.772,90
Inhapi	372,02	17.898	0,484	5.104,70
Major Isidoro	448,849	18.897	0,566	6.964,54
Maravilha	332,374	10.284	0,569	5.895,45
Mata Grande	914,726	24.698	0,504	5.689,36
Minador do Negrão	167,604	5.275	0,563	6.731,07
Olho D'água do Casado	321,43	8.491	0,525	5.818,47
Olivença	175,708	11.047	0,493	5.207,72
Ouro Branco	196,561	10.912	0,547	5.258,18
Palestina	38,206	5.112	0,558	5.433,29
Pão de Açúcar	693,692	23.811	0,543	5.773,83
Pariconha	254,719	10.264	0,548	5.013,20
Piranhas	410,112	23.045	0,589	6.664,07
Poço das Trincheiras	284,256	13.872	0,526	4.631,68
Santana do Ipanema	437,875	44.932	0,591	8.679,38
São José da Tapera	494,498	30.083	0,527	7.127,35
Senador Rui Palmeira	341,992	13.047	0,518	4.873,74
ALAGOAS	27.848,14	3.120.494	0,631	18.205,44

Quadro 01- Representa os municípios do Estado de Alagoas onde é cultivada palma-forrageira.

PROCEDIMENTOS

Foram realizadas inspeções a campo nos municípios com o plantio de palma forrageira (Figura 01) para confirmação da atual situação nas propriedades registradas com presença e ou ausência do inseto-praga, além de casos nos estados que fazem fronteira com Alagoas.

A partir dos dados qualitativos dos levantamentos desse inseto foram gerados mapas de ocorrência e dispersão em Alagoas. A presença da cochonilha-do-carmim

de cultivares. Foram considerados os dados de combinações de cultivares com pelo menos 15 registros de coleta de dados. O efeito potencial das variáveis climáticas (temperatura e umidade, mínimas e máximas) sobre a probabilidade de presença do inseto foi avaliada pela análise de regressão logística. Antes da realização destas análises as correlações entre as variáveis climáticas foram medidas pelo coeficiente de correlação de Pearson e variáveis com valores de correlação acima de 0,7 foram eliminadas para evitar redundância nos testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AADEAL estabelece uma regionalização própria, ora respeitando as microrregiões oficiais estabelecidas pela Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio (SEPLAG) ora não, para atender seus interesses de defesa e fiscalização que garanta a qualidade dos animais e vegetais que entram e saem de Alagoas, através de quinze Unidades Local Sanidade Animal e Vegetal (ULSAV) e cinco Barreiras de Fiscalização Fixas entre os Estados fronteiriços.

Os municípios da pesquisa identificados pelo cultivo de palma forrageira e que registraram ausência e presença da cochonilha-do-carmim, pertencem a quase todos os municípios das ULSAV's de Batalha, Palmeira dos Índios, Delmiro Gouveia, Mata Grande e Santana do Ipanema. A incidência do inseto foi de 17%, 17% e 28,9% em ordem crescente nas ULSAV's de Delmiro Gouveia, de Mata Grande e de Santana do Ipanema, com regiões mais afetadas pelo inseto do que outras apresentando diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) (Figura 02).

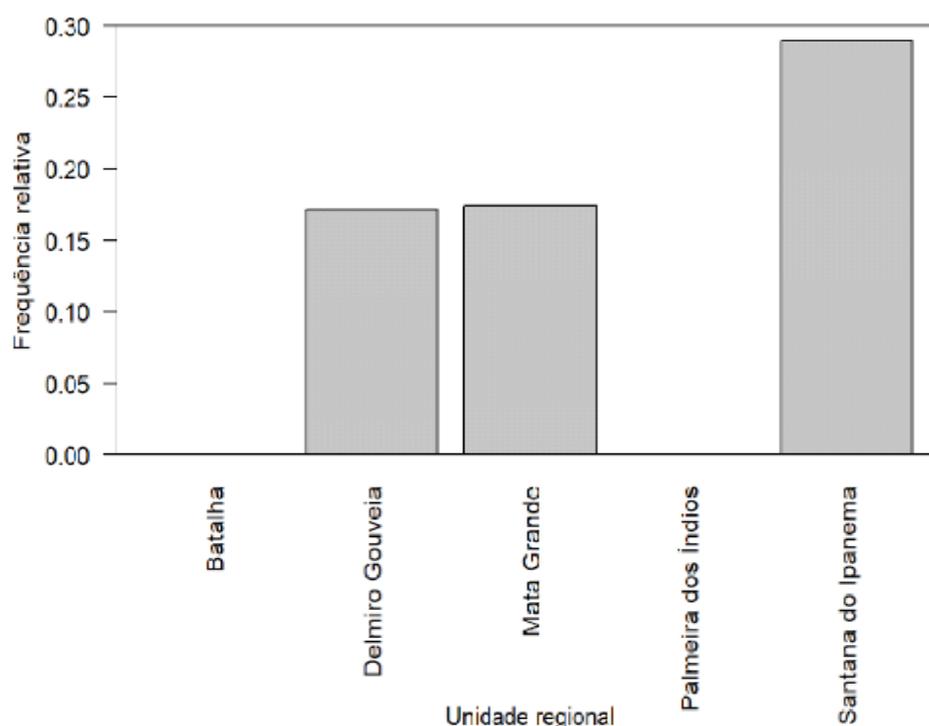


Figura 02 - Frequência relativa da incidência da cochonilha-do-carmim *D. opuntiae* nos municípios pertencentes às ULSAV's da ADEAL

Em Alagoas, no período entre 2005 a 2009 houve ausência do inseto nos municípios amostrados. Não parece existir um padrão claro de mudança na incidência de áreas com o inseto ao longo do tempo, apresentando picos de pouca oscilação, demonstrada nos anos de 2012, 2014 e 2015 com maior e menor número de áreas com presença relativa do inseto. A frequência relativa da incidência de áreas com presença do inseto oscilou na seguinte ordem: aumento, declínio, aumento, declínio e aumento durante os períodos compreendidos entre 2010-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015 e 2015-2016.

De um total de 36 combinações entre variedades de palma forrageira as que registraram em ordem decrescente de frequência de registros de presença e ausência do inseto foram 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 15, 22 e 26, respectivamente. Dentre essas foram consideradas apenas 8 combinações que são as: 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12 e 26 com remoção das combinações 15 e 22 por conter valores menores do que 15 registros de presença do inseto. De acordo com o teste do Qui-quadrado em escala logarítmica de um total de 20 valores na tabela combinações, ou seja, 20% delas com cinco ou menos, considerado aceitável para o modelo R (escala *log*). Houve pouca diferença entre algumas cultivares mais comum quando comparamos com os menos comuns, com diferenças significativas entre as combinações de cultivares em relação aos registros de incidência do inseto, ou seja, com variedades de palmas forrageiras suscetíveis (6, 7, 10, 11 e 12) e resistentes (3, 5, 15, 22 e 26) ao ataque do inseto (Figura 03).

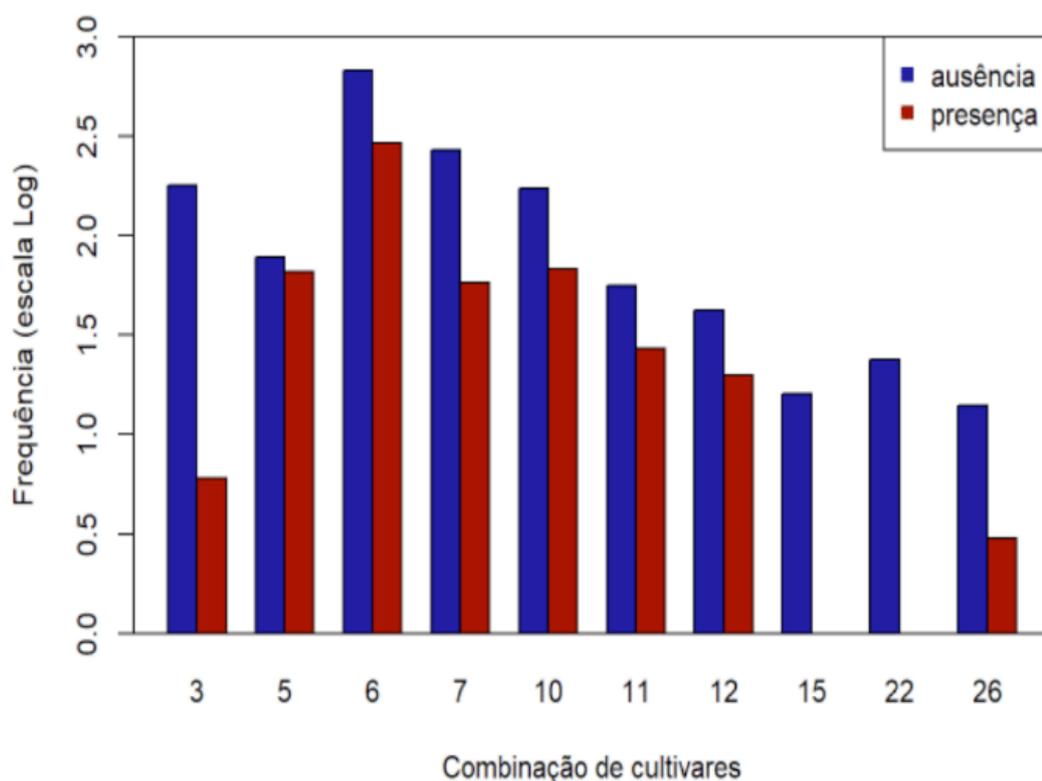


Figura 03 - Frequência em escala logarítmica de combinações (3=*Nopolea cochenillifera* clone miúda, 5=*Opuntia ficus indica* clone grande, 6=*Opuntia ficus indica* clone gigante, 7=*Opuntia ficus indica* clone comprida, 10=*Nopolea cochenillifera* clone miúda + *Opuntia ficus indica* clone

carmim (*D. opuntiae*) foi registrada no período entre 2010 a 2016 em 15 municípios alagoanos. As porcentagens de incidência de *D. opuntiae* é de 17%, 17% e 28,9% em ordem crescente nas variedades de palma forrageira nas ULSAV's de Delmiro Gouveia, de Mata Grande e de Santana do Ipanema, respectivamente.

As variáveis ambientais (temperatura e umidade) não favorecem a incidência ou não de *D. opuntiae* nas variedades de palma forrageira ao longo do período de 2005 a 2016 em Alagoas. Para um melhor entendimento sobre possível presença ou ausência da cochonilha-do-carmim relacionado às variáveis ambientais, sugerem-se estudos futuros como mais coletas de indicadores ambientais.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse de nenhuma ordem.

REFERÊNCIAS

ADEAL. Disponível em: <http://www.defesaagropecuaria.al.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/2011-1/01/cochonilha-do-carmim-e-identificada-em-alagoas> Acessado em: 18 de agosto de 2016.

ADEAL. Gerência de Defesa Vegetal da Adeal Capacita Extensionistas no Sertão de Alagoas. Disponível em: www.fesaagropecuaria.al.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/gerenciamento-de-defesa-vegetal-da-adeal-capacita-extensionistas-no-sertao-de-alagoas Acesso em 12/05/2017

AMORIM, P. L. de. Caracterização morfológica e produtiva em variedades de palma forrageira / Philipe Lima de Amorim. – 2011 p.18 - 20.

APARÍCIO, C. Utilização de **Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto Orbital para análise espacial de paisagem com incidência de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Dissertação de Mestrado apresentada no IB – USP, São Paulo 2001.

FONSECA, P.R.B.; FORTUNATO, R.P.; LIMA JUNIOR, I.S.; BERTONCELLO, T.F.; DEGRANDE, P.E. **Absorção foliar, caulinar e radicular dos inseticidas pymetrozine e flonicamid no controle do pulgão Aphis gossypii Glover 1877 em algodoeiro**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, 2011.

LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C. et al. **Desempenho do óleo de laranja no controle da cochonilha**. Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 252-258, jan/abr 2009.

MAPA – MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, Brasília 2006.

MAPA – MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa nº 23 de 29.05.2007**, Brasília.

MOREIRA, Maurício Alves. **Fundamentos do Sensoriamento Remoto e Metodologias de Aplicação**. 4. ed. Viçosa: Ufv, 2011.

MOURA, M. S. B. de; SOUZA, L. S. B. de; SÁ, I. I. S.; SILVA, T. G. F. da. Aptidão do Nordeste brasileiro ao cultivo da palma forrageira sob cenários de mudanças climáticas. In: **SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**, 3., 2011, Juazeiro.

SENA, FELIPE THIAGO NERES DE SOUSA; NETO, B. J. S.; LEITE, A. C. DE S. **uso do geoprocessamento como subsídio à análise ambiental: imagem srmt na geração dos mapas hipsométrico e de declividade das bacias difusas da barragem boa esperança no estado do Piauí.** IV Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação Recife - PE, 06- 09 de Maio de 2012.

WARUMBY, J.F.; ARRUDA FILHO, G.P.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Pragas da palma. In: MENEZES, R.S.C; SIMÕES, D.A.; SAMPAIO, E.V.S.B (Eds.). **A palma no Nordeste do Brasil.** 1. ed. Recife: UFPE; Editora Universitária, 2005. p.65-80.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DE UM ISOLADO DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN IN VITRO

Gabryel Cezar da Silva Marinho

Graduando em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

RESUMO: *Beauveria bassiana* é utilizado no controle biológico de insetos-praga na agricultura. Estudos comportamentais como germinação, esporulação, crescimento e atividade enzimática são parâmetros importantes para auxiliar na caracterização e virulência. Portanto, o nosso objetivo foi avaliar a atividade proteolítica e caracterizar, do ponto de vista citomorfológico, um isolado de *B. bassiana*, visando à seleção para uso no controle biológico de insetos-praga. Para análise macro e microscópica, foi utilizado o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose. A análise citológica foi realizada através de cultura em lamínula, no período de 48 a 120 horas. A atividade enzimática foi determinada a partir do índice enzimático (IE) em meio ágar-leite. Macroscopicamente, a colônia apresentou micélio aéreo branco e uma pigmentação creme no verso. O crescimento radial foi rápido e ao oitavo dia, o fungo cobriu toda a superfície do meio de cultura,

apresentando um diâmetro de 6,9 cm. As observações microscópicas revelaram que as estruturas se formaram a partir da germinação dos conídios, originando um micélio hialino, septado, anastomoses, numerosos conidióforos formando densos cachos de conídios globosos e subglobosos. A atividade proteolítica foi constatada pela formação do halo transparente ao redor da colônia (1,1 cm), onde a caseína do leite foi degradada, comprovando que a caseína do leite é uma fonte indutora das proteases. O IE foi fortemente positiva (0,81). *B. bassiana* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando este isolado como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, fungo entomopatogênico, fungo filamentoso, proteases.

ABSTRACT: *Beauveria bassiana* is used in the biological control of insect pests in agriculture. Behavioral studies such as germination, sporulation, growth and enzymatic activity are important parameters to aid characterization and virulence. Therefore, our objective was to evaluate the proteolytic activity and to characterize, from the cytomorphological point of view, a *B. bassiana* isolate, aiming at the selection

for use in the biological control of pest insects. For macro and microscopic analysis, the agar-Sabouraud-dextrose medium was used. Cytological analysis was performed through a cover slip culture, in the period of 48 to 120 hours. The enzymatic activity was determined from the enzymatic index (IE) in milk agar medium. Macroscopically, the colony showed white aerial mycelium and a cream pigmentation on the reverse side. Radial growth was rapid and on day 8, the fungus covered the entire surface of the culture medium, having a diameter of 6.9 cm. Microscopic observations revealed that the structures formed from the germination of the conidia, originating a hyaline mycelium, septate, anastomoses, numerous conidiophores forming dense clusters of globose and subglobose conidia. Proteolytic activity was evidenced by the formation of the transparent halo around the colony (1.1 cm), where milk casein was degraded, proving that milk casein is a protease inducing source. IE was strongly positive (0.81). *B. bassiana* showed good development and response to the experiments performed *in vitro*, pointing this isolate as a possible entomopathogenic agent to be explored to minimize the ecotoxic damages in animal and vegetal production.

KEYWORDS: Biological control, entomopathogenic fungus, filamentous fungus, proteases.

1 | INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin é um importante agente microbiano utilizado no controle biológico de insetos-praga. O controle biológico pode ser aplicado pela proteção ou manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno (GRONVOLD et al., 1996). A aplicação de um organismo exógeno em um meio ambiente a fim de controlar uma praga constitui-se no emprego do controle biológico clássico. Porém, é de fundamental importância controlar a adaptação e o sucesso deste agente exógeno no ambiente de aplicação, para que haja o controle da praga alvo de maneira harmoniosa e sem impactar outras espécies nativas (HOWARTH, 1996).

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os micro-organismos, devido à facilidade de manuseio e aplicação, o custo, ao fácil conhecimento de produção, além da eficiência já pronunciada por algumas espécies. Entre os micro-organismos utilizados para este propósito, destacam-se os fungos filamentosos, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (ALVES, 1998b).

Entre os primeiros fungos entomopatogênicos utilizados no controle microbiano de insetos-praga, destacam-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH; PELL, 2003). Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de

80 % das doenças causadas em insetos. Existindo cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos patogênicos de invertebrados já descritos. Apesar disso, a maioria dos trabalhos refere-se apenas a duas espécies de fungos: *B. bassiana* e *M. anisopliae* (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

B. bassiana é considerado um deuteromiceto (fungo imperfeito), no qual não se observa fase sexuada. Fungos que se reproduzem de forma assexuada são geralmente menos diversos que os micro-organismos que possuem reprodução sexual, devido à ausência de recombinação genética (BURDON, 1993). Apesar de se reproduzir por via assexual, *B. bassiana* apresenta uma considerável variabilidade genética, devido a sua ubiquidade, ampla distribuição geográfica e especificidade a diversos hospedeiros. Esta diversidade pode conferir ao microrganismo uma plasticidade para se adaptar e sobreviver em ambientes heterogêneos. Estes fungos podem apresentar durante o seu ciclo biológico uma fase parasitária e outra não parasitária (ALVES, 1998a).

As espécies de *Beauveria* são facilmente distinguidas morfologicamente. Suas características principais são os grupos de células conidiogênicas curtas e globosas que produzem uma sucessão de conídios unicelulares a partir de uma raque alongada e em *zig-zag* (KIRK et al., 2001). A forma dos conídios pode variar de globoso, elipsóide, cilíndrico, reniforme e vermiforme e com uma grande variedade de tamanhos (REHNER, 2005).

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *B. bassiana* no controle de *Melolontha melolontha*, *Hypsipyla grandella*, *Plutella maculipennis* dentre outros, com resultados promissores no controle biológico. No Brasil, *B. bassiana* foi encontrado colonizando *Diatraea saccharalis*, *Anthonomus grandis*, *Dialrotica speciosa*, *Castnia liais*, *Solenopsis invicta*, *S. saevissima*, *Cosmopolites sordidus* e *Hypothenemus hampei*, entre outros (AZEVEDO, 1998; BITTENCOURT, 2000; FARIA; MAGALHÃES, 2001). Dessa forma, torna-se evidente o amplo espectro de ação destes fungos, os quais podem ser utilizados em vários grupos de insetos no controle integrado de diversas pragas (SCHAMNE, 2010).

O processo de infecção de *B. bassiana* em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação. A infecção inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo sobre a superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da ação de enzimas (esterases, proteases, lípases, e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. Na germinação, o esporo diferencia-se em um tubo germinativo com uma dilatação na extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico. Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que mantêm o contato com a cutícula. Após atravessar a cutícula, *B. bassiana* encontra um ambiente rico em nutrientes, disseminando-se rapidamente através da hemolinfa por todos

os tecidos, produzindo toxinas como as dextruxinas e citocalasinas, que ocasionam paralisia e conseqüentemente, a morte do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999).

Os sintomas observados após a infecção do hospedeiro incluem inquietação, perda da sensibilidade, perda de coordenação dos movimentos e paralisia, ocasionando a morte. O ciclo total da doença é de 8 a 10 dias. Os insetos infectados tornam-se duros e recobertos por uma camada pulverulenta de conídios. Ao final da conidiogênese, a colônia possui um aspecto cotonoso e uma massa de conídios brancos (ALVES, 1998b). A produção de conídios também é indispensável, pois sem os esporos não há inóculo e a produção de conídios após a infecção do inseto garante a manutenção do controle no campo (THOMAS; JENKINS, 1997).

Estudos comportamentais como germinação, esporulação, número de colônias, crescimento radial e atividade enzimática *in vitro* são realizados para auxiliar na caracterização de fungos entomopatogênicos (KUMAR et al., 1999; GUIMARÃES, 2002; ALMEIDA et al., 2005). Estes parâmetros são importantes para definir a virulência de uma linhagem fúngica (LIU et al., 2003). A viabilidade de formas infectivas, tanto quanto, a virulência merece ser destacada, considerando que a germinação dos conídios é a parte essencial na patogênese (SHAH; PELL, 2003).

De modo geral, *Beauveria* sp. exibem considerável variação morfológica natural, citológica e patogênica, dificultando a sua classificação e seleção para uso no controle biológico de insetos-praga. A avaliação e caracterização *in vitro* são ferramentas que oferecem subsídios para a compreensão da virulência do fungo sobre o inseto. Partindo dessas considerações, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade proteolítica em meio de cultura sintético e caracterizar, do ponto de vista citomorfológico um isolado de *B. bassiana*, visando a seleção para uso no controle biológico de insetos-praga.

2 | METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Multiusuários do Centro de Biotecnologia – CBiotec/UFPB.

Foi utilizado um isolado de *B. bassiana* coletado do solo de um sistema agroflorestal (zona da mata de Pernambuco), no ano de 2015.

2.1 Meios de cultura

Ágar-Sabouraud-Dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 6,8.

Ágar-Leite: 50 g de leite molico desnatado, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 6,8. Todos os meios de cultura foram autoclavados por 15 min a 120 °C.

2.2 Manutenção da cultura fúngica

As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

2.3 Crescimento radial

Fragmentos da cultura fúngica foram inoculados no centro da placa de *Petri* contendo o meio de cultura específico. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente. As observações foram feitas nos intervalos de 0-2, 2-4, 6-8, 8-10, 10-12 12-14, 14-15 dias. Mensurações com régua milimetrada foram feitas e empregadas para a construção de um gráfico para a observação do crescimento radial.

2.4 Cultura em lamínula

Fragmentos do fungo foram colocados estrategicamente sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, contidos em placas de *Petri* e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante azul de metil e observada ao microscópio óptico.

2.5 Atividade enzimática

Inóculo do fungo foi colocado no centro da placa de *Petri* sobre o meio de cultura ágar-leite. Foi avaliada no período de 12 dias, a capacidade de degradação da caseína do leite em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio, para medir a atividade proteolítica de *B. bassiana*. A degradação foi avaliada macroscopicamente pela formação do halo transparente ao redor da colônia.

2.6 Determinação da atividade enzimática e do índice enzimático

Para a determinação do índice enzimático (IE), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em que a atividade da espécie avaliada decorre da razão entre o diâmetro da colônia ($\emptyset c$) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação do halo ($\emptyset h$). A partir do (IE) a atividade enzimática (Pz) poderá ser classificada como: A) negativa (IE =1, Pz = classe 1); B) positiva (0,64 = IE < 1, Pz = classe 2); C) fortemente positiva (IE < 0,64, Pz = classe 3).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro da colônia } (\varnothing c)}{\text{Diâmetro da colônia + Zona de precipitação do halo } (\varnothing h)}$$

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análise macroscópica de *Beauveria bassiana*

O crescimento micelial de *B. bassiana* foi avaliado durante 15 dias no meio de cultura de ágar-Sabouraud-dextrose. A Figura 1 ilustra o aspecto macroscópico da colônia.

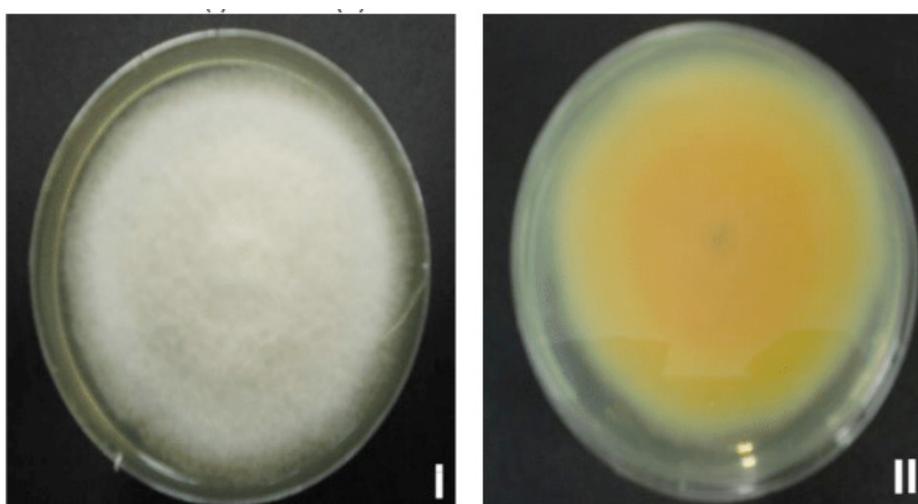


Figura 1 – Aspecto macroscópico da colônia de *Beauveria bassiana* em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose. Frente (I) e verso (II) da colônia.

Fonte: Autores

A colônia de *B. bassiana* em meio ágar-Sabouraud-dextrose apresentou micélio aéreo de aspecto algodinoso esbranquiçado e uma pigmentação creme clara no verso. O crescimento radial em meio ágar-Sabouraud-dextrose atingiu 6,9 cm (Tabela 1 e Figura 2). Estes resultados indicaram que o meio de cultura foi eficaz para induzir o crescimento e esporulação de *B. bassiana* em temperatura ambiente ($\pm 30^\circ \text{C}$), pois garantiram o suprimento nutricional necessário para o isolado, favorecendo o seu desenvolvimento *in vitro*.

Dias	Diâmetro da colônia
1 à 2	1,7 cm
2 à 4	3,8 cm
4 à 6	6,2 cm
6 à 8*	6,9 cm

*A partir do 8º dia a colônia tomou toda a placa de *Petri*.

Tabela 1 - Crescimento de *Beauveria bassiana* avaliada durante 15 dias em meio ágar-Sabouraud-dextrose.

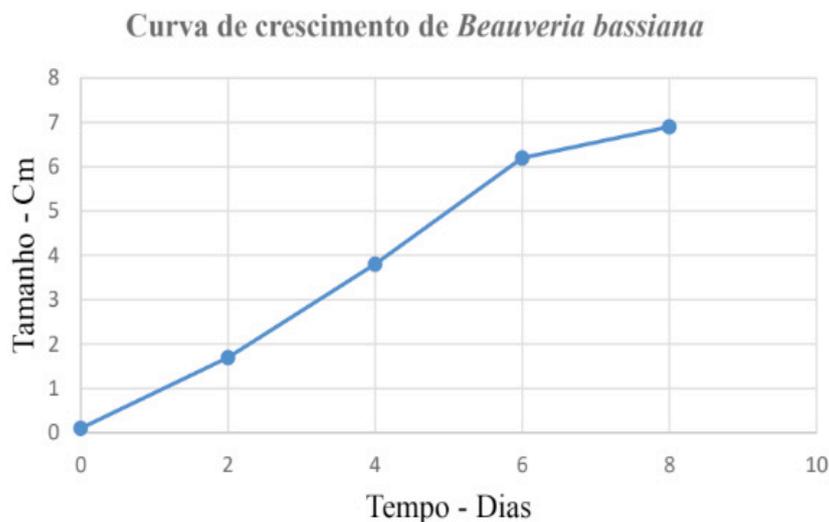


Figura 2 – Curva de crescimento de *Beauveria bassiana* durante oito dias de crescimento em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose.

Na maioria absoluta dos fungos, o crescimento é uma resposta a composição e ao enriquecimento do meio de cultivo. No entanto, a concentração da fonte de carbono, pode justificar a resposta do desenvolvimento vegetativo *in vitro* (ROCHA, 1997).

Fatores ambientais como temperatura e umidade relativa, podem diminuir a eficácia de fungos entomopatogênicos utilizados como agentes de controle biológico, pelo simples fato de limitarem o seu desenvolvimento na superfície do inseto. A maioria destes fungos requer cerca de 90% de umidade relativa e uma temperatura adequada de crescimento para germinação, formação do tubo germinativo e infecção. Desta forma, a temperatura é um fator determinante para a taxa de germinação, crescimento, esporulação e sobrevivência dos fungos entomopatogênicos (CHANDLER et al., 2000).

3.2 Análise citomorfológica de *Beauveria bassiana*

A análise citológica foi realizada por meio de cultura em lamínula, no período de 24 a 120 horas após a inoculação. As observações microscópicas mostraram que as estruturas se formaram a partir da germinação dos conídios (Figura 3- AI e AII). A partir das 48 horas de cultivo foi verificada a diferenciação micelial formada por hifas hialinas, septadas (Figura 3 – AIII), uninucleadas e várias anastomoses (Figura 3 – B). O septo é formado da periferia para o centro do micélio, através da invaginação da parede interna onde há um poro mediano que permite a passagem do citoplasma e núcleo. Esta diferenciação funcional e morfológica da hifa é encontrada predominantemente nos Deuteromycetos, Ascomycetos, Uredinales e Ustilaginales (ALEXOPOULOS et al., 1996). As anastomoses são eventos importantes dentro dos Deuteromycetos,

porque possibilitam a troca do material genético (citoplasma e núcleo) entre hifas de diferentes origens (AZEVEDO, 2001). Com 72 horas de cultivo constatou-se a presença de conidióforos sésseis (Figura 3 - C). Com 72 horas foi constatada a presença de abundantes conidióforos formando densos cachos de conídios globosos e subglobosos. Os conídios são unicelulares e haplóides. Foi observado que os conídios estavam dispostos sobre as hastes das fiálides com várias ramificações do tipo zigue-zague. Existe uma variabilidade citológica dentro do gênero *Beauveria*, dificultando estudos taxonômicos e a caracterização das linhagens. A disposição dos conídios sobre as fiálides em zigue-zague é um caráter taxonômico e característico de *B. bassiana* (SAMSON; EVANS, 1982). Observações realizadas as 96 e 120 horas mostraram todas as estruturas em estágios avançados de desenvolvimento e numerosos conídios (Figura 3 - D).

Os conídios de *B. bassiana* são elementos reprodutivos de origem assexuada capazes de resistir às condições adversas, e de germinar sob condições favoráveis, garantindo a propagação da espécie (VIDOTTO, 2004). São caracterizados como ectosporos porque são formados nas extremidades de hifas especiais, denominadas de conidióforos (BERGAMIN FILHO et al., 1995). A disposição dos conidióforos, estruturas onde estão depositados os conídios e a forma dos conídios são características taxonômicas essenciais para distinguir as espécies de *Beauveria* e suas variedades (ALVES, 1998a).

B. bassiana é considerado um fungo eucárpico (ALEXOPOULOS et al., 1996). Característica facilmente identificada na cultura em lâmina realizada na espécie. As estruturas reprodutivas surgiram apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte restante, a forma vegetativa. De modo geral as estruturas somáticas são diferentes das reprodutivas e estas possuem uma diversificação de formas nas quais se baseia a classificação dessas espécies (ELENA; PAPAS, 2002).

A correta identificação dos isolados fúngicos é extremamente importante devido ao papel que os fungos desempenham na natureza, particularmente os entomopatogênicos, que são utilizados no controle biológico de insetos-praga na agricultura (LUNA-ALVES LIMA, 1989; COSTA et al., 2006).

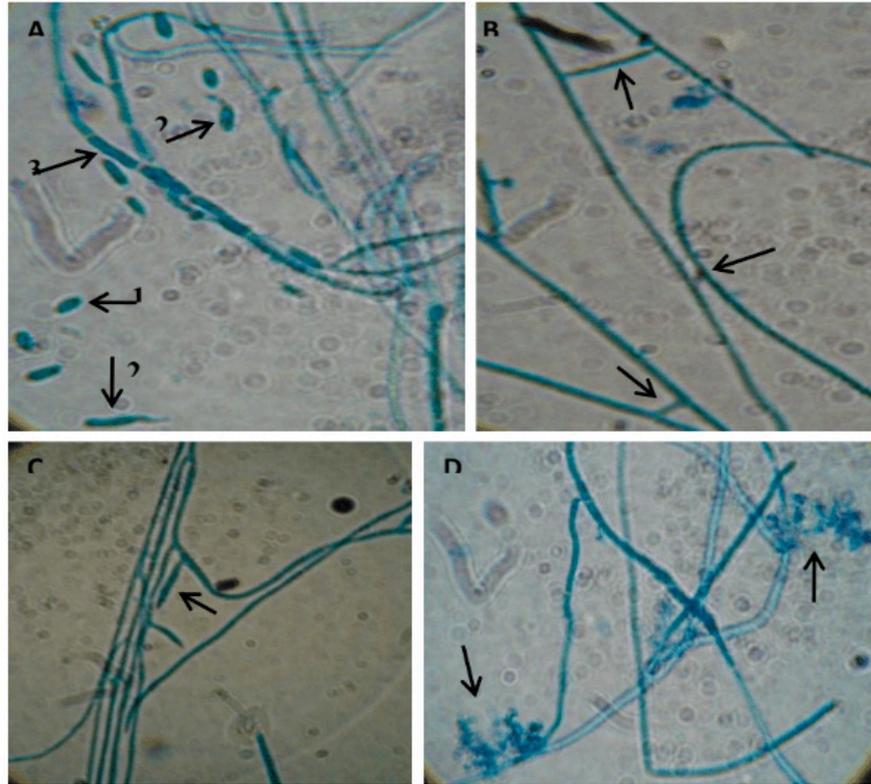


Figura 3 – *Beauveria bassiana*. (A1) Conídios; (A2) Conídios germinando; (A3) Micélio septado – hifa; (B) Anastomose; (C) Fiálides; (D) Conidióforos maduros formando densos cachos com terminações do tipo zigue-zague.

Fonte: Autores

3.3 Análise da atividade proteolítica in vitro de *Beauveria bassiana*

A atividade proteolítica de *B.bassiana* foi detectada pela formação de um halo transparente em torno da colônia, medindo 1,1 cm de largura (Figura 4). O halo foi formado pela degradação da caseína do leite Molico® em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio de cultura. Morfologicamente, a colônia mostrou micélio esbranquiçado com alta produção de conídios hialinos.

A caseína é a mais importante proteína do leite, sendo uma macromolécula, composta por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, incapaz de penetrar na membrana celular dos microrganismos. Para que a caseína seja utilizada pelos microrganismos, precisa ser degradada em peptonas, polipeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos. Este processo é possível porque os microrganismos produzem enzimas proteolíticas (proteases) que catalisam a hidrólise da caseína em aminoácidos, os quais são depois assimilados e catabolizados pelas células (ST LEGER et al., 1988).

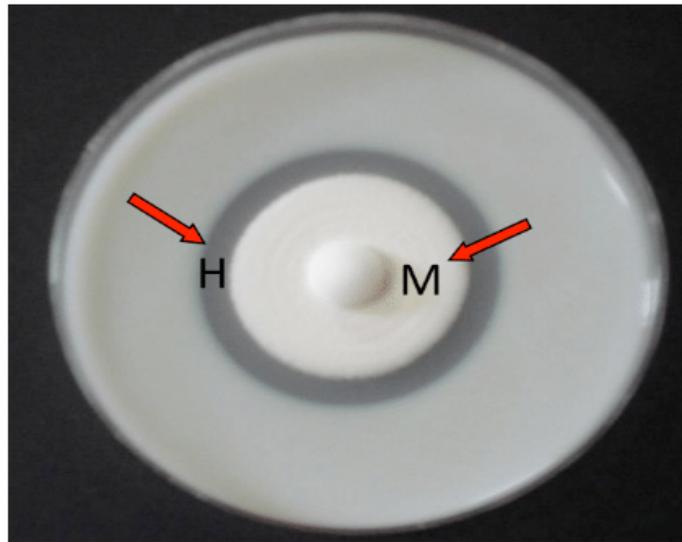


Figura 4 – A atividade proteolítica de *Beauveria bassiana* em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, evidenciado pela formação de halo transparente em torno da colônia. H – halo transparente, M – micélio vegetativo.

Fonte: Autores

A partir dos dados obtidos, o IE foi calculado seguindo a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em relação ao diâmetro da colônia ($\varnothing c$) pela razão do diâmetro da colônia mais o halo ($\varnothing h$). O resultado indicou que *B. bassiana* apresentou IE de 0,81 confirmando que o isolado possui uma atividade enzimática fortemente positiva ($Pz = 3$) em relação à degradação da caseína do leite mólico em pó. O IE é um dos parâmetros semi-quantitativo mais usado para se avaliar a produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. Os microrganismos considerados produtores de enzimas possuem uma correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa (LIN et al., 1991; ARCHER; WOOD, 1995).

A atividade proteolítica, avaliada em meio de cultura sólido, torna o processo de seleção de linhagens bastante simples. Nossos resultados sugerem que o isolado de *B. bassiana* tem potencial para uso no controle biológico de insetos-praga. Em estudos realizados por Smith et al. (2000), não foi observada nenhuma correlação entre produção de exoenzimas e virulência. Porém as linhagens mais virulentas são de *B. bassiana* utilizadas em estudos, foram as que apresentaram índices de atividade proteolítica mais elevados.

Exoenzimas, lipases, proteases, amilases e quitinases são produzidas pelos fungos entomopatogênicos *in vitro*, o que facilita o estudo e a avaliação da correlação entre estas proteínas e outras características envolvidas na virulência. A atividade proteolítica é bastante discutida e sua eficiência na degradação de cutícula pode estar ligada aos inibidores de proteases na hemolinfa das larvas dos insetos em geral (JOSHI et al., 1997; TIAGO; SILVA, 2007). ST LEGER et al. (1992) demonstrou que a protease é a enzima mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas a cutícula dos insetos.

4 | CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os meios de cultura utilizados foram eficazes para induzir tanto o crescimento quanto a esporulação de *B. bassiana*;
- A análise citomorfológica mostrou todas as estruturas características da espécie em diferentes estágios de desenvolvimento;
- A atividade proteolítica em meio sólido foi fortemente positiva;
- *B. bassiana* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando este isolado fúngico como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4ª ed. New York: Journal Wiley, p. 880, 1996.
- ALMEIDA, J. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Viabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. Reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleóptera: Curculionidae) artificialmente infectado**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, p. 473-480, 2005.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos**. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998a.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos**. Editora Malone Ltda, Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998b.
- ARCHER, D. B.; WOOD, D. A. **Fungal exoenzymes**. In: GROW, N. A. R.; GADD, G. M. (Eds.). The growing fungus. London: Chapman e Hall, p. 137-162, 1995.
- AZEVEDO, J. L. **Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998, p. 69-96.
- AZEVEDO, J. L. **O uso dos fungos na biotecnologia**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária. Guiabá, Livraria e Editora Agropecuária Ltda., p. 300, 2001.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ª. ed. vol. 1. São Paulo. Agronômica Ceres, p. 518, 1995.
- BITTENCOURT, V. R. **Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 2, p. 25-42, 2000.
- BURDON, J. J. **The structure of pathogen populations in natural plant communities**. Annual Review of Phytopathology, v. 31, p. 305-323, 1993.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. **Fungal biocontrol of acari**. Biocontrol Science and Technology, v. 10, p. 357-384, 2000.

COSTA, P. M. O.; TIAGO, P. V.; SOUZA, H. M. L.; NASCIMENTO, T. L. **Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticular e não cuticulares.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 4, 2006, Belo Horizonte, MG. Anais. Belo Horizonte, 2006.

ELENA, K.; PAPAS, A. C. **Pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* in alfafa.** Journal of Phytopathology, v. 150, p. 495-499, 2002.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 22, p.18-21, 2001.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. **Biological control. Aspects of biological control with special reference to arthropods, 6 protozoans and helminthes of domesticated animals.** Veterinary Parasitology, v. 64, p. 47-64, 1996.

GUIMARÃES, A. M. T. **Efeitos de carrapaticidas químicos e observações citológicas em *Metarhizium anisopliae*.** 2002. 58f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. **The use of solid media for detection of enzyme production by fungi.** Mycology, v. 67, p. 597-607, 1975.

HOWART, F. G. **Environmental impacts of classical biological control.** Annual Review in Entomology. v. 36, p. 485-509, 1996.

JOSHI, L.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. **Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR.** Gene, v. 197, p. 1-8, 1997.

KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. **The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 74, p. 213-223, 1999.

KUMAR, V.; SINGH, G. P.; BABU, A. M.; AHSAN, M. M.; DATTA, R. K. **Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine.** Italian Journal of Zoology, v. 66, p. 39-43, 1999.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. **Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 5, p. 275-280, 1991.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBIGDE, M.; PARKER, B. L. **Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae).** Journal of Invertebrate Pathology, v. 82, p. 139-147, 2003.

LUNA ALVES-LIMA, E. A.; TIGANO, M. S. **Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera furngiperda*.** Revista de Microbiologia, v. 20, p. 85-94, 1989.

ROCHA, C. L. M. S. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em *Aspergillus nidulans*.** 1997. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

REHNER, S. A. **Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*.** In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Ed). Insect-fungal Association Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, 2005, p. 405-500.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. **Two new *Beauveria* spp from South America.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 39, p. 93-97, 1982.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. **Entomopathogenic fungi as biological control agents.** Applied Microbiology and Biotechnology. v. 61, p. 413-423, 2003.

SMITH, K. E.; WALL, R.; FRENCH, N. P. **The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp.** Veterinary Parasitology, v. 92, p. 97-105, 2000.

ST LEGER, R. J.; DURRANDAS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARLEY, A. K. **Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Archives of Microbiology. v. 41501, p. 413-416, 1988.

ST LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. **Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Journal de Chemical, v. 204, p. 991-1001, 1992.

SCHAMNE, P. A. **Efeito de aditivos e fishfertilquitosana® em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010, 98p.

TIAGO, P. V.; SILVA, R. J. **Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares.** Ciência Rural, v. 37, p. 26-30, 2007.

THOMAS, M. B.; JENKINS, N. E. **Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*.** Mycological Reserach, v. 101, p. 1469-1474, 1997.

VIDOTTO, V. **Manual de micologia médica.** Ribeirão Preto, São Paulo: Tecmed, p. 289, 2004.

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS RADICULARES DE *Allium cepa* L. DO BULBO GRANDE

Vitória Régia Ferreira Lopes

Lyceu Paraibano, João Pessoa/PB

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

RESUMO: A cebola é uma das hortaliças mais importantes do mercado brasileiro e mundial, por ser apreciada como condimento alimentar. Os programas de melhoramento visam à obtenção de variedades de polinização aberta, através de melhoramento populacional ou seleção recorrente. A seleção dos genótipos é realizada inicialmente, em grande parte, do germoplasma nacional já amplamente adaptado. Em 2006 foram lançados dois híbridos (Bella Dura e Bella Vista), os quais podem ser considerados os primeiros híbridos criados e desenvolvidos no Brasil. A partir de todos estes relatos, o estudo citogenético dará suporte aos programas de melhoramento, oferecendo informações que podem auxiliar na seleção de genótipos compatíveis para a hibridação, garantindo o processo de recombinação. Partindo dessas considerações, este estudo teve como objetivo avaliar o núcleo interfásico e o padrão de condensação profásico da cebola de bulbo grande, visando à caracterização. Foram utilizadas células

meristemáticas da raiz tratadas no fixador Carnoy. Após fixação, as raízes foram lavadas em água destilada, hidrolizadas com HCl 5N, posteriormente coradas com carmim acético a 2,0 % e analisadas ao microscópio óptico. Foi possível observar as fases características do ciclo celular da cebola: núcleo interfásico, prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Na metáfase foi possível identificar cromossomos metacêntricos e sub-metacêntricos, e o número cromossômico ($2n = 16$) da cebola. A caracterização do ciclo celular e a definição do nível de ploidia darão suporte aos programas de melhoramento, oferecendo informações que podem auxiliar na seleção de genótipos compatíveis para a hibridação, garantindo o processo de recombinação de forma eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Citogenética vegetal, hortaliça, mitose, *Allium* sp.

ABSTRACT: The onion is one of the most important vegetables of the Brazilian and world market, for being appreciated as a food flavoring. Breeding programs aim to obtain open pollinated varieties through population improvement or recurrent selection. The selection of the genotypes is carried out initially, in great part, of the already widely adapted national germplasm. In 2006, two hybrids were introduced (Bella Dura and Bella Vista), which

can be considered the first hybrids created and developed in Brazil. From all these reports, the cytogenetic study will support the breeding programs, offering information that can help in the selection of compatible genotypes for the hybridization, guaranteeing the recombination process. Based on these considerations, this study aimed to evaluate the interphase nucleus and prophase condensation pattern of the large bulb onion, aiming at the characterization. Root meristematic cells treated in the Carnoy fixative were used. After fixation, the roots were washed in distilled water, hydrolyzed with HCl 5N, then stained with 2 % acetic carmine and analyzed under an optical microscope. It was possible to observe the characteristic phases of the onion cell cycle: interphase nucleus, prophase, prophase, metaphase, anaphase, telophase and cytokinesis. In the metaphase it was possible to identify metacentric and sub-metacentric chromosomes, and the chromosome number ($2n = 16$) of the onion. The cell cycle characterization and definition of the ploidy level will support the breeding programs, offering information that can help in the selection of compatible genotypes for the hybridization, guaranteeing the recombination process efficiently.

KEYWORDS: Plant cytogenetics, vegetable, mitosis, *Allium* sp.

1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Allium* é de grande importância econômica, englobando mais de 600 espécies, incluindo várias hortaliças e espécies ornamentais. O elevado número de espécies indica ter havido uma grande divergência evolutiva desde a origem do gênero, gerando uma marcante variabilidade em inúmeras características da planta (Tavares et al., 1998).

A espécie *Allium cepa* Lineu, conhecida popularmente como cebola, é uma das hortaliças mais importantes do mercado brasileiro e mundial, por ser bastante apreciada como condimento alimentar, principalmente devido ao aroma e ao sabor que conferem aos alimentos, além de ser amplamente usada para fins terapêuticos desde a antiguidade (Coelho et al., 1996).

A cebola é a terceira hortaliça mais produzida no mundo. A produção mundial em 2014 foi de 70 milhões de toneladas, em 2,9 milhões de ha (produtividade média de 19 t/ha). A América do Sul contribuiu com 8,5% e o Brasil participou com 2 % da oferta mundial (1,1 milhão de toneladas) com valor global da produção de US\$ 204 milhões. O Brasil e a Argentina produzem mais de 60 % da cebola da América do Sul e 97 % do Mercosul. No Brasil, a cebola é a terceira hortaliça mais importante economicamente (EPAGRI, 2014).

Morfologicamente, *A. cepa* L. é descrita como uma planta herbácea, cuja parte comercial é um bulbo tunicado, que apresenta variação em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (Menezes, 1978).

No desenvolvimento da planta, as folhas, que podem ser cerosas ou não,

apresentam disposição alternada, formando duas fileiras ao longo do caule. As bainhas foliares, nas quais as folhas se inserem, projetam-se acima da superfície do solo e formam uma estrutura firme, comumente chamada de caule, mas que, na realidade, é um pseudocaule. O caule verdadeiro está localizado abaixo da superfície do solo e é composto por um disco achatado, situado na extremidade inferior do bulbo, que emite raízes fasciculadas, pouco ramificadas, com maior concentração nos primeiros 30 cm do solo, mas que podem alcançar 60 cm de profundidade. De forma geral, as raízes raramente alcançam 25 cm de profundidade, sendo que lateralmente não superam a 15 cm (Smith et al., 1986).

Esta espécie é considerada alógama com uma taxa de polinização cruzada, aproximadamente, de 93 %. A baixa taxa de autofecundação existente dá-se por meio da transferência de pólen entre flores de uma mesma umbela ou entre flores de umbelas diferentes de uma mesma planta, mas é impossível a sua ocorrência dentro de uma flor, individualmente. Os efeitos da depressão por autofecundações sucessivas na cebola são bem acentuados, sendo mais pronunciados na segunda geração. Em condições de cultivo comercial, as plantas autofecundadas são eliminadas devido à menor capacidade de sobrevivência (Muller et al., 2000).

Para *A. cepa* são conhecidas 276 espécies de insetos que visitam suas flores, sendo que destes, Hymenoptera e Diptera são os mais importantes polinizadores. Da ordem Hymenoptera, *Apis mellifera* destaca-se como a mais importante espécie polinizadora, sendo indicada para o manejo na produção comercial de sementes (Menezes, 1978).

Atualmente as formas hortícolas de *A. cepa*, são alocadas em três grupos: *Typicum*, *Aggregatum* e *Proliferum*.

- Grupo *Typicum* (*Regel*) - grupo das cebolas comuns que apresentam bulbos simples e grandes, inflorescência tipicamente sem bulbilhos, plantas quase sempre originárias de sementes verdadeiras e de ciclo bienal. Neste grupo, estão todas as cebolas comercialmente importantes.
- Grupo *Aggregatum* (*G. Don*) (*A. cepa* var. *aggregatum*) - grupo das cebolas com bulbos compostos, inflorescência tipicamente sem bulbilhos, podendo produzir sementes ou ser estéreis, de ciclo anual e multiplicação quase que exclusivamente vegetativa. Este grupo é caracterizado por bulbos que se multiplicam livremente e são comumente usados para a propagação. Possui três formas distintas:

a) Cebola múltipla ou batata (*Potato onion*) - os bulbos são agregados, apresentam coloração externa marrom e a propagação ocorre por meio da formação de numerosos bulbos laterais. Esses, por sua vez, podem originar uma nova planta e, no segundo ano, produzem bulbos que variam de 2 a 20 bulbilhos. Raramente florescem e as sementes são esparsas e de baixa germinação.

b) Cebola sempre-pronta (*Every-Ready onions*) - na Inglaterra, servem para suprir a falta de bulbos comerciais. Este tipo de cebola assemelha-se ao tipo comum; no entanto, é perene e possui poucos bulbos e folhas, a haste floral é curta e a umbela é menor. Raramente florescem e são propagadas por divisão, nunca por sementes. Um bulbo produz de 10 a 12 bulbos.

c) Chalota (*Shalot*) - alguns autores a consideram pertencente à espécie *A. ascolonicum*; no entanto, é uma forma de *A. cepa*. Usualmente, é de pequena altura, mas as flores e inflorescências são tipicamente da cebola comum.

- Grupo *Proliferum* (*A. cepa* var. *proliferum*) - grupo das cebolas com bulbos, às vezes pouco desenvolvidos. As inflorescências apresentam-se carregadas de bulbinhos usualmente sem sementes verdadeiras. A propagação é feita vegetativamente pelos bulbilhos da inflorescência (Kotlinska et al., 1991; Geoffriau et al., 1997b; Klein et al., 1999).

São espécies diploides com número básico de cromossomos é $x=8$ (nas espécies cultivadas) e $x=7$. Em ambas as séries têm evoluído poliploides. As hibridações interespecíficas espontâneas são raras, existindo fortes barreiras de cruzamento que separam inclusive espécies morfologicamente similares. *A. cepa* é conhecida apenas sob cultivo (domesticada), não sendo encontrada na forma silvestre (Campion et al., 1995; Bohanec et al., 1995).

No que se refere à citogenética da cebola, o número básico de cromossomos é $2n = 16$, sendo uma das espécies mais polimórficas, exibindo diferenças quanto ao formato, tamanho, cor, conteúdo de matéria seca, reação a fotoperiodismo e outros caracteres da planta (Austin, 1972). Entretanto há carências em estudos relacionados aos diversos métodos de bandeamento, filogenia e mapeamento físico, principalmente nas espécies cultivadas no Brasil.

A grande variação de características morfológicas e fisiológicas nesta espécie está associada à sua alta taxa de polinização cruzada, bem como ao intenso processo de seleção consciente e inconsciente a que foi submetida ao longo de sua domesticação. As seleções visam, de modo geral, modificar características como: formato; coloração; retenção de escamas e tamanho de bulbos; aumentar a produtividade; melhorar a conservação pós-colheita; adaptar a diferentes condições edafoclimáticas. Como resultado marcante, pode-se ressaltar a adaptação da cebola a diferentes latitudes, cuja produção estende-se desde os trópicos até regiões mais próximas aos círculos polares, regiões estas muito diferentes do seu centro de origem, principalmente em se considerando que o fotoperíodo é fator limitante no processo de bulbificação (Musial et al., 2005).

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução. Em alguns casos,

a simples determinação do número cromossômico, fornece informações importantes para a compreensão da filogenia e evolução dos grupos, deste que associada a outras abordagens como morfologia, características geográfica, entre outras (Stebbins, 1971). Ainda pode se investigar possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo (Guerra, 1998; Guerra e Souza, 2002).

As mutações em geral, podem ser detectadas, citologicamente pela inibição do ciclo celular, interrupção em metáfases, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de trocas entre cromátides irmãs entre outros (Guerra e Souza, 2002).

Em plantas, a maior quantidade de células em divisão mitóticas se encontra no tecido meristemático. Esse tecido pode ser encontrado em diferentes órgãos das plantas e se caracteriza por não apresentar células diferenciadas. Para análise cromossômica mitótica vegetal o melhor meristema é o radicular, devido ao maior volume celular e ao crescimento muito rápido. A obtenção de raízes para a análise cromossômica pode ser feita a partir de diferentes fontes. As mais comuns são sementes, bulbos e caules (Guerra, 1998).

No caso da cebola, o longo ciclo da espécie e a baixa variabilidade genética das linhas A (macho-estéril-MS) e B (linha mantenedora) têm limitado a obtenção de híbridos no Brasil. Utilizando-se a técnica da cultura de tecidos vegetais, especialmente a cultura *in vitro* de óvulos, ovários ou botões florais de cebola, é possível reduzir o tempo de obtenção de linhas “C” (polinizadoras) homocigotas, criar variabilidade e desenvolver novas variedades. A indução de plantas haploides ou duplo-haploides a partir da cultura de óvulos (ginogênese) oferece ao melhoramento convencional a possibilidade de obter linhas puras, derivadas de óvulos oriundos de plantas das gerações F1 ou F2 (Campion et al., 1995).

No Brasil são poucos os programas de melhoramento de cebola. Programas públicos podem ser encontrados na ESALQ/USP, EPAGRI, EMBRAPA e IPA. Esses programas visam à obtenção de variedades polinização aberta, através de melhoramento populacional ou seleção recorrente. A empresa privada SAKATA Seed Sudamerica Ltda vem realizando melhoramento genético no Brasil. O seu programa de melhoramento de cebola utiliza em grande parte germoplasma nacional, já amplamente adaptado (Allan et al., 2003). Em 2006 foram lançados dois híbridos (Bella Dura e Bella Vista), os quais podem ser considerados os primeiros híbridos criados e desenvolvidos no Brasil.

A partir de todos estes relatos, o estudo citogenético dará suporte aos programas de melhoramento, oferecendo informações que podem auxiliar na seleção de genótipos compatíveis para a hibridação, garantindo o processo de recombinação de forma eficiente. Partindo dessas considerações, este estudo teve como objetivo avaliar o núcleo interfásico e o padrão de condensação profásico da cebola de bulbo grande, visando à caracterização.

2 | METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal, Centro de Biotecnologia – CBIOTEC/UFPB.

Foram utilizadas células meristemáticas de bulbos de *A. cepa* para análise do ciclo celular.

As raízes de cebola procedentes do bulbo foram fixadas, coradas com carmim acético a 2,0 % e observadas ao microscópio óptico.

2.1 Obtenção das raízes

Foram tirados dos bulbos os catafilos secos, e em seguida os bulbos foram colocados em contato com água livre de cloro contida em um frasco de vidro. Foi colocado em contato com a água apenas a parte inferior do bulbo.

2.2 Fixação

As raízes foram mergulhadas no fixador Carnoy 3:1 de 2 a 20 horas à temperatura ambiente.

Fixador Carnoy 3:1 – 8,0 mL

a) 6,0 mL de etanol e 2,0 mL de ácido acético glacial;

b) Agitou-se a solução antes e posteriormente acrescentou-se o material a ser fixado (as raízes).

2.3 Estocagem

Após o período de 20h00 as raízes foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

2.4 Lavagem

As raízes foram mergulhadas duas vezes em água destilada (5 minutos cada) para a lavagem.

2.5 Hidrólise

Foi retirado o excesso de água das raízes em papel filtro e em seguida mergulhadas em uma solução de HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos.

2.6 Preparação das lâminas

A ponta da raiz foi transferida para uma lâmina contendo uma gota do corante de carmim acético a 2,0 %. Com o auxílio de um estereomicroscópio, retirou-se a coifa

e as capas mais externas da raiz deixando apenas o meristema. Fragmentou-se o meristema em pedaços pequenos e em seguida a raiz foi coberta com uma lamínula. Foi realizado o esmagamento do tecido com a ponta do bastão de vidro, e em seguida a lâmina foi observada ao microscópio óptico.

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção das células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*

O crescimento das raízes para obtenção dos meristemas radiculares de *A. cepa* foi observado no período de 16 dias, em contato com a água. A Figura 01 ilustra o processo de obtenção das raízes da cebola roxa do bulbo grande.



Figura 01 – Obtenção das raízes de *Allium cepa* para avaliação do ciclo celular.

(Fonte: Autores)

3.2 Caracterização do ciclo celular de *Allium cepa*

O ciclo celular funciona de maneira controlada, de forma a garantir que, a cada ciclo de divisão, duas células idênticas sejam formadas. Os eventos que ocorrem durante esse processo são sequenciais, contínuos e foram identificados em *A. cepa*. Eventos chamados de interfase (Figura 02), prófase (Figura 03 - 1), pró-matáfase (Figura 03 - 2), matáfase (Figura 04), anáfase (Figuras 05 e 06), telófase (Figura 07) e citocinese.

No núcleo interfásico (Figura 02) não foi observado nenhuma diferença morfológica significativa à microscopia óptica. Porém, essa fase é caracterizada como um intervalo de tempo (*G*, do inglês, *gap* = intervalo) entre os eventos da mitose.

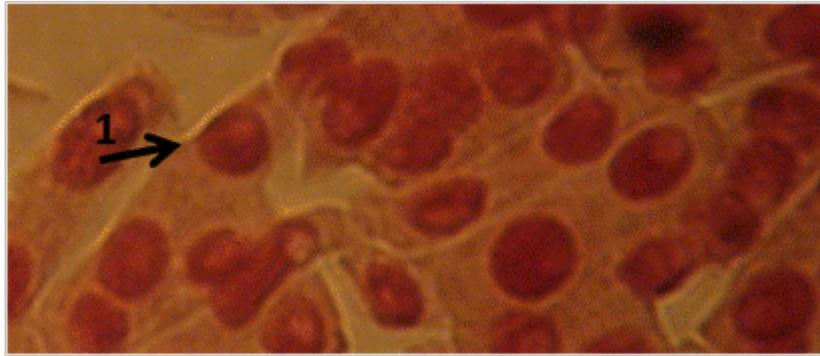


Figura 02 – Núcleo interfásico (1) obtidos por esmagamento da ponta da raiz de *Allium cepa*.

(Fonte: Autores)

A prófase (Figura 03 – 1) se caracteriza pelo início da condensação da cromatina. Pela atuação da condensina é possível visualizar filamentos mais espessos. Cada um dos filamentos é formado por duas cromátides, cada uma com seu próprio centrômero e telômero. As coesinas ativadas durante o processo de divisão celular garantem a coesão entre as cromátides-irmãs até o fim da metáfase. Ainda na prófase ocorre à fragmentação do nucléolo, cujos componentes se dispersam pelo citoplasma na forma de corpúsculo de ribonucleoproteínas. Os dois centrossomos, começam a se mover para os pólos opostos da célula e entre eles, pode-se observar a formação das fibras polares. As fibras originadas nos pólos opostos interagem entre si na região equatorial da célula por proteínas motoras da família das dineínas. A partir da prófase, todas as modificações que ocorrem na célula são desencadeadas por fosforilações nas proteínas histonas, alterando o comportamento da cromatina, nas lâminas e nas proteínas nucleolares, levando à desmontagem do envoltório nuclear e do nucléolo e nas proteínas associadas aos microtúbulos, causando mudanças para a formação do fuso.

Na pró-metáfase (Figura 03 – 2) a cromatina encontra-se mais condensada, mostrando filamentos mais grossos e mais curtos, e o nucléolo não é mais visualizado. O envoltório nuclear, organelas membranosas, complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, fragmentam-se em pequenas vesículas. Os centrossomos migram para os pólos opostos. Forma-se o cinetócoro, estrutura protéica ligada à região do centrômero de cada cromátide-irmã, na qual os microtúbulos do fuso se associam e exercem tensão sobre essas cromátides. No caso de *A. cepa*, na pró-metáfase ocorre a remoção das coesinas presentes entre os braços das cromátides-irmãs, mas não das coesinas da região centromérica. A remoção das coesinas dos braços ocorre por fosforilações que levam à perda da habilidade de sua ligação com a cromatina.

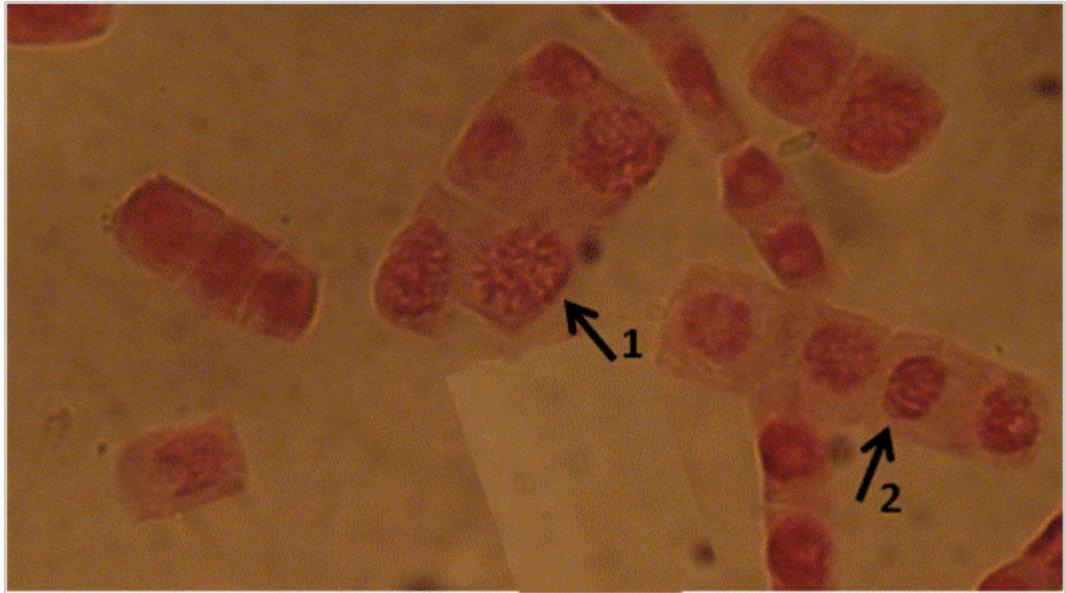


Figura 03 – Fases do ciclo celular de *Allium cepa*. Prófase (1) e pró-metáfase (2).

(Fonte: Autores)

Na metáfase (Figura 04 – 1 e 2) ocorre à condensação máxima da cromatina. A tensão proporcional que os microtúbulos exercem em direções opostas sobre as cromátides-irmãs leva os cromossomos a assumir uma posição de equilíbrio em um plano na região equatorial da célula entre os dois pólos. A coesão presente na região centromérica só é desfeita na transição metáfase-anáfase. Nas células metafásica de *A. cepa*, foi possível identificar cromossomos metacêntricos e sub-metacêntricos, e o número cromossômico ($2n = 16$).

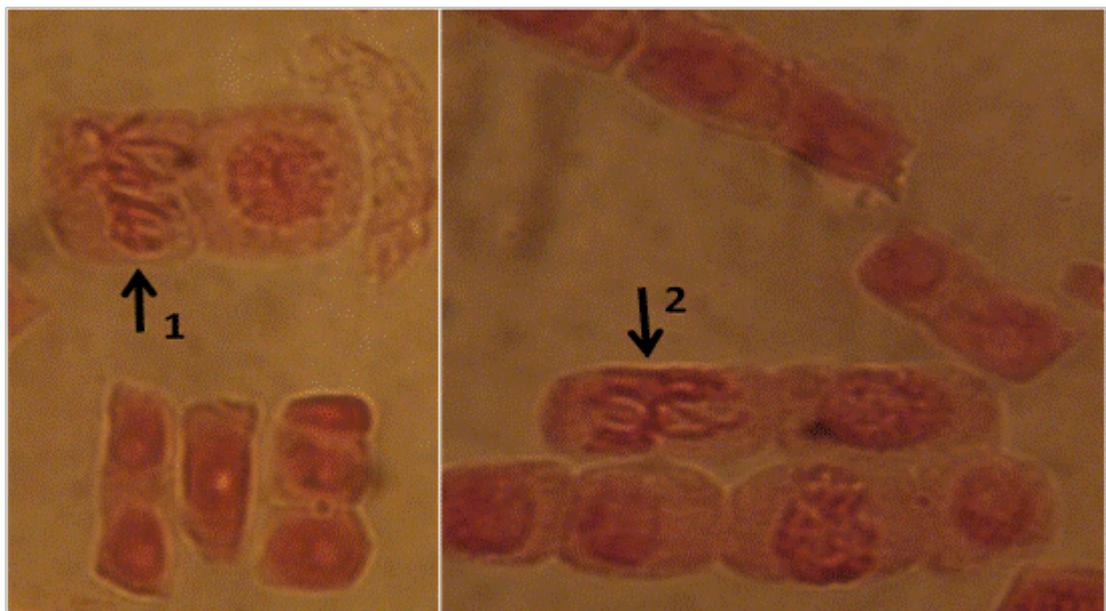


Figura 04 – Fases do ciclo celular de *Allium cepa*. Metáfase (1 e 2).

(Fonte: Autores)

A anáfase (Figuras 05) inicia abruptamente com a separação das cromátides-irmãs, que se movem para os polos. Nesta fase, o posicionamento de cada homólogo do par não depende um do outro no equador da célula permite que, ao separar as cromátides-irmãs, cada célula-filha receba todos os pares de cromossomos, mantendo assim a ploidia.

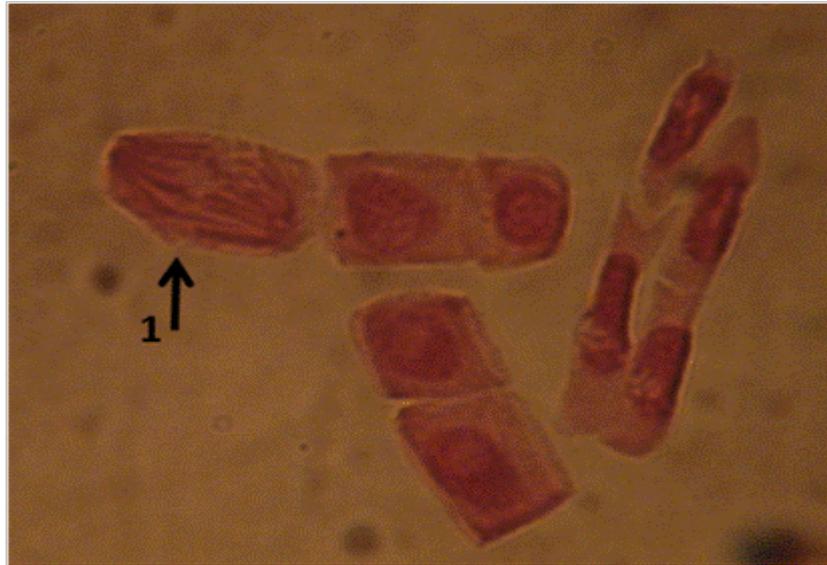


Figura 05 – Fases do ciclo celular de *Allium cepa*. Anáfase (1).

(Fonte: Autores)

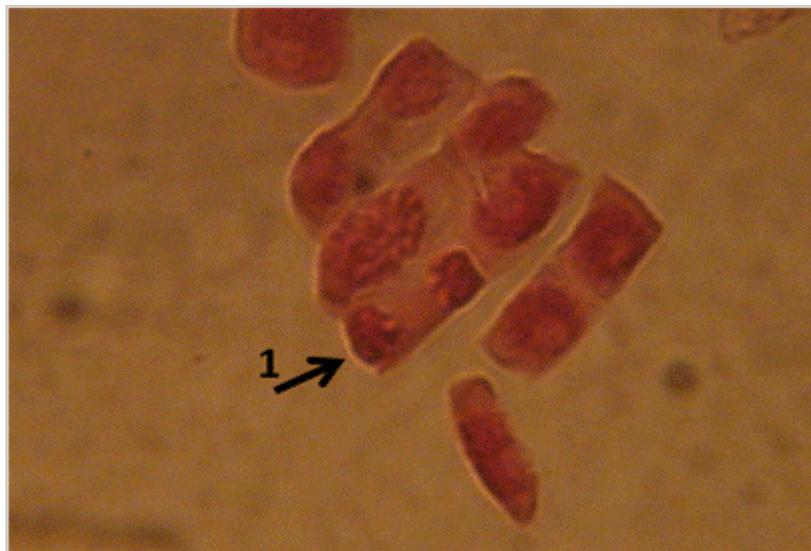


Figura 06 – Fases do ciclo celular de *Allium cepa*. Final da anáfase (1).

(Fonte: Autores)

A telófase (Figura 07) se caracteriza pela reestruturação do envoltório nuclear a partir da reassociação dos componentes dispersos pelo citosol na pró-metáfase. As vesículas das membranas do envoltório nuclear se fundem em torno dos cromossomos, os complexos de poros se inserem nas membranas, a lâmina nuclear se reorganiza e ao final da telófase, o envoltório nuclear está totalmente reconstituído. Os cromossomos

irão se descompactar gradativamente até o final desta fase, assumindo o estado mais distendido da cromatina e característico da intérfase. O nucléolo é reconstituído a partir dos fragmentos dissociados na prófase. Os microtúbulos do cinetócoro desaparecem e os polares permanecem apenas na região equatorial, na qual se dará a citocinese. As organelas membranosas são reconstituídas e juntamente com as demais são distribuídas aleatoriamente entre as duas células-filhas.

Na citocinese ocorre a divisão citoplasmática da célula em duas, de maneira a assegurar que cada célula-filha receba um núcleo e quantidades suficientes dos constituintes celulares. Nas células vegetais, o local onde ocorre a citocinese é definida por uma banda de microtúbulos formada, em forma de anel justaposto à membrana plasmática, marcando o local em que irá se formar a nova parede. No final da anáfase (Figura 06), ocorre uma concentração de material na região equatorial da célula, a partir da fusão de vesículas achatadas produzidas pelo complexo de Golgi, formado uma estrutura chamada de fragmoplasto. O fragmoplasto contém actina e miosina, bem como microtúbulos associados, necessários para a sua formação e função. No interior das vesículas estão presentes os precursores das macromoléculas formadoras da parede celular. A parede se reconstitui do interior em direção à parede celular original e as membranas das vesículas formam a membrana plasmática. A celulose é sintetizada por complexos protéicos enzimáticos presentes na membrana plasmática e depositadas na nova parede, direcionados pelos microtúbulos corticais, que reaparecem na telófase (Carvalho e Recco-Pimentel, 2009).



Figura 07 – Fases do ciclo celular de *Allium cepa*. Telófase (1).

(Fonte: Autores)

A caracterização do nível de ploidia de diferentes genótipos de *A. cepa* auxilia na seleção de genótipos geneticamente compatíveis para cruzamentos, visando o

aumento da variabilidade. A cebola de bulbo roxo grande apresenta um ciclo biológico longo e baixa variabilidade genética entre diferentes linhagens. Essa característica tem limitado a obtenção de híbridos. A partir da caracterização citogenética de diferentes genótipos, de diferentes linhagens de *A. cepa* é possível reduzir o tempo de obtenção de linhagens polinizadoras homozigotas, criar variabilidade e desenvolver novas variedades (Campion et al., 1995). Alguns autores (Campion et al., 1995; Bohanec et al., 1995; Allan et al., 2003; Musial et al., 2005) têm utilizado a citogenética clássica para selecionar genótipo geneticamente compatíveis. Resultados desses estudos levaram a obtenção de linhas puras (Linhagem “C”), polinizadoras homozigotas como fonte essencial de variabilidade genética.

O conhecimento e a manutenção da diversidade genética em espécies cultivadas, como fonte de biodiversidade, é uma alternativa viável e sustentável para a conservação e aumento da produtividade. Isso porque a diversidade genética é o fator responsável pelas diferenças de produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma espécie. Com isto, o agricultor/ produtor poderá ter um aumento na qualidade do produto, aumento da produção e a valorização dos recursos vegetais de sua propriedade.

4 | CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- A metodologia utilizada foi possível isolar as células e caracterizar as diferentes fases do ciclo celular de *A. cepa*: interfase, prófase, pró-matáfase, matáfase, anáfase, telófase e citocinese.
- Na metáfase foi possível definir a morfologia e o número cromossômico;
- O estudo forneceu informações básicas que podem auxiliar no programa de melhoramento da cebola.

REFERÊNCIAS

- ALAN, A.R.; MUTSCHELER, M.A.; BRANTS, A.; COBB, E.; EARLE, E.D. **Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. Royle Stearn***, Plant Science. v. 165, p. 1201-1211, 2003.
- BOHANEK, B.; JAKŠE, M.; IHAN, A.; JAVORNIK, B. **Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants**. Plant Science. v. 104, p. 215-224, 1995.
- CAMPION, B.; BOHANEK, B.; JAVORNIK, J. **Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity**. Theor. Appl. Genet. v. 91, p. 598-602, 1995.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 2ª.edição. 380p. 2009.

- COELHO, E.F.; SOUZA, V.A.B.; CONCEIÇÃO, M.A.F. **Comportamento da cultura da cebola em três regimes de irrigação e cinco espaçamentos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 31, p. 585-591, 1996.
- EPAGRI. **Sistema de produção para cebola: Santa Catarina** (3. Revisão). Florianópolis: 2014. 91 p. (EPAGRU. Sistemas de produção, 16).
- GEOFFRIAU, E.; KAHANE, R.; RANCILLAC, M. **Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.)**. Euphytica. v. 94, p. 37-44, 1997b.
- GUERRA, M. & SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, Editora FUNDECT, 2002.
- GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 1998.
- KLEIN, M.; KORZONEK, D. **The relationship between flower size and development stage of (*Allium cepa* L.) umbels**. Acta Biologica Cracoviensis, series Bot.41, p. 185-192, 1999.
- KOTLINSKA, T.; HAVRANEK, P.; NAVRATILL, M.; GERASIMOVA, L.; PIMAKHOV, A.; NEIKOV, S. **Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in Central Asia, USSR**. Plant Genetic Resources Newsletter. v. 84, p. 31-32, 1991.
- MENEZES SOBRINHO, J.A. **Origem e botânica da cebola**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte. v. 4, p.48-14, 1978.
- MULLER, J.J.V.; CASALI, V.W.D. **Produção de Sementes de Cebola**. Boletim Técnico EMPASC, Florianópolis, n. 16, p. 64, 1982. MIC
- HALIK, B.; ADAMUS, A.; NOWAK, E. **Gynogenesis in Polish onion cultivars**. J. Plant Physiology. v. 156, p. 211–216, 2000.
- MUSIAL, K.; BOHANEK, B.; JAKŠE, M.; PRZYWARA, L. **The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size**. In vitro Cell, Development Biology - Plant. v. 41, p. 446-452, 2005.
- SMITH, B. M.; GODWIN, R. M.; HARVEY, E.; WERNER, C. P. **Gynogenesis from whole flower buds in bulb onions (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.)**. Journal of Genetetic Breeding. v. 45, p. 353–358, 1991.
- STEBBINS, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plant**. Edward Arnold, London, 216p.
- TAVARES, M.; TRANI, P.S.; SIQUEIRA, W.J. **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Boletim Técnico IAC, v. 6, p.175-176, 1998.

CONTROLE BIOLÓGICO E MONITORAMENTO DO MOSQUITO *Aedes* NO CAMPO

Adriano Rodrigues de Paula

Universidade Estadual Norte Fluminense
Darcy Ribeiro. Laboratório de Entomologia e
Fitopatologia.
Campos dos Goytacazes - RJ

Anderson Ribeiro

Universidade Estadual Norte Fluminense
Darcy Ribeiro. Laboratório de Entomologia e
Fitopatologia.
Campos dos Goytacazes - RJ

Leila Eid Imad Silva

Universidade Estadual Norte Fluminense
Darcy Ribeiro. Laboratório de Entomologia e
Fitopatologia.
Campos dos Goytacazes – RJ

Eduardo Rodrigues de Paula

Universidade Estadual Norte Fluminense
Darcy Ribeiro. Laboratório de Entomologia e
Fitopatologia.
Campos dos Goytacazes - RJ

Richard Ian Samuels

Universidade Estadual Norte Fluminense
Darcy Ribeiro. Laboratório de Entomologia e
Fitopatologia.
Campos dos Goytacazes - RJ

Os fungos também são virulentos contra o mosquito *Aedes albopictus*, vetor dos vírus da dengue e chikungunya. Os atuais testes foram realizados no campo em um condomínio da cidade de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro. O objetivo do trabalho foi realizar o controle biológico dos mosquitos do gênero *Aedes* utilizando o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* impregnado em panos pretos pendurados em uma armadilha feita de garrafa PET denominada “armadilha PET”. Os resultados dos testes foram avaliados por um sistema de monitoramento da população de mosquitos utilizando ovitrampas. Vinte apartamentos térreos foram selecionados ao acaso para o estudo. Em 10 apartamentos foram colocados uma armadilha PET com fungo e perto foi colocado uma ovitrampa. Em outros 10 apartamentos foram colocados uma armadilha PET sem o fungo e perto uma ovitrampa (tratamentos controles). As armadilhas foram colocadas no chão das varandas dos apartamentos em lugares protegido de luz solar direta. De junho de 2016 a julho de 2017 foram coletados no total 80.684 ovos de *Aedes*. Em todos os meses do estudo, os apartamentos tratados com fungo tiveram no total menor número de ovos de *Aedes* (19.168 ovos) comparado com o controle (61.516 ovos). Dos mosquitos encontrados no condomínio 11% foi de *A. albopictus* e 89% de *A. aegypti*.

RESUMO: Os fungos entomopatogênicos podem ser utilizados no controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor dos vírus da dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana.

A utilização de fungos entomopatogênicos diminuiu a população do mosquito *Aedes*. Fungos entomopatogênicos poderiam ser utilizados no manejo integrado de vetores.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos, controle, ovos, adultos.

ABSTRACT: Entomopathogenic fungi can be used to control the mosquito *Aedes aegypti*, a vector of the dengue virus, Zika, chikungunya and urban yellow fever. Fungi are also virulent against the mosquito *Aedes albopictus*, vector of dengue and chikungunya. The current tests were carried out in the field in a condominium in the city of Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro. The objective of this work was to carry out the biological control of mosquitoes of the genus *Aedes* using the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* impregnated on black cloths hanging in a trap made from a PET bottle called a "PET trap". The results of the tests were evaluated by using ovitraps to monitor the mosquito population. Twenty ground-floor apartments were selected at random for the study. In each of 10 apartments, a PET trap was placed with fungus and nearby an ovitrap was placed. In another 10 apartments, PET traps without fungus were distributed and nearby, ovitraps were used (control treatments). The traps were placed on the floor of the apartment's balconies in places protected from direct sunlight. From June 2016 to July 2017, a total of 80,684 *Aedes* eggs were collected. In all months of the study, the fungus treated apartments had a lower number of *Aedes* eggs (19,168 eggs) compared to the controls (61,516 eggs). Eleven percent of the mosquitoes found in the condominium were *A. albopictus* and 89% *A. aegypti*. The use of entomopathogenic fungi decreased the *Aedes* mosquito population. Entomopathogenic fungi could be used in the integrated management of vectors.

KEYWORDS: Fungi, control, eggs, adults.

1 | INTRODUÇÃO

Os vírus das doenças dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana são transmitidos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. O mosquito *Aedes albopictus* é vetor secundário dos vírus da dengue sendo encontrado frequentemente no ambiente silvestre (CONSOLI et al., 1998). *A. albopictus* também é potencial transmissor do vírus que causa a doença chikungunya (www.cdc.gov/zika/vector/range.htm).

Diversos métodos de monitoramento das populações dos mosquitos vetores vêm sendo utilizados em programas de controle e vigilância entomológica. Armadilhas ovitrampas foram eficientes para monitoramento de adultos de *Aedes* no município de São João da Barra - Rio de Janeiro (SJB) (PAULA et al., 2017). As ovitrampas são feitas de vasos de plástico preto com palhetas de eucatex Duratree contendo água. Apesar do alto custo financeiro, outras armadilhas também podem ser utilizadas para o monitoramento de mosquitos adultos como a BG-Sentinel® e Mosquitrap® (MACIEL DE FREITAS et al., 2006).

Métodos atuais de controle como remoção de criadouros, tratamento de criadouros

utilizando bactérias entomopatogênicas (*Bacillus thuringiensis*) ou compostos inibidores de síntese de quitina como Diflubenzuron, somado as sucessivas aplicações de inseticidas sintéticos não tem conseguido diminuir a população do mosquito do gênero *Aedes*, e com isso a incidência das doenças transmitidas por esse vetor tem aumentado. Já foram verificadas populações de mosquitos resistentes a inseticidas sintéticos organofosforados, carbamatos e piretróides (MONTELLA et al., 2007, LIMA et al., 2011). Novas abordagens de controle precisam ser urgentemente investigadas.

Vários trabalhos em condição de laboratório ou semicampo mostraram que panos pretos impregnados com fungos entomopatogênicos foram altamente eficazes para diminuir a sobrevivência de adultos de *A. aegypti* (PAULA et al., 2008, PAULA et al., 2013a, PAULA et al., 2013b). Um suporte para o pano preto + fungo foi desenvolvido e denominado armadilha PET. A armadilha PET é feita de garrafa PET com pano preto + *Metarhizium anisopliae*. Esta armadilha foi eficiente para reduzir sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* em uma simulação de um cômodo residencial (SILVA et al., 2017). No campo um estudo em SJB mostrou que a armadilha PET com fungo foi eficiente para redução da população de *A. aegypti*. Os resultados foram avaliados utilizando ovitrampas (artigo em preparação).

O atual trabalho é continuação do estudo de controle biológico utilizando fungos e do monitoramento da população de mosquitos *Aedes*. Os experimentos foram realizados no campo em um condomínio da cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2 | METODOLOGIA

O atual trabalho foi realizado de junho de 2016 a julho de 2017 no Condomínio Mondrian Life situado na Avenida Alberto Lamego 405, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Em assembleia extraordinária realizada no dia 23 de maio de 2016 os proprietários do condomínio aprovaram, por unanimidade, a realização do projeto. O condomínio tem aproximadamente 87.573,26m², 39 blocos, com 16 apartamentos cada bloco, sendo 156 apartamentos térreos. Foram selecionados apartamentos térreos de aproximadamente 60m², todos com varanda de aproximadamente 5m² onde as armadilhas foram colocadas.

Na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (UENF/LEF) foram preparadas as armadilhas e avaliado os resultados dos testes de campo.

Armadilhas PET com fungo foram utilizadas para o controle biológico dos mosquitos. A armadilha PET (Figura 1A) foi feita de garrafa PET de 2L, com um corte lateral de 17 x 8 cm e na parte inferior foi colocado gesso Paris para dar estabilidade. O pano preto de 16 x 7 cm impregnado com *M. anisopliae* (isolado ESALQ 818) foi suspenso no topo da armadilha PET com auxílio um arame de metal. O preparo do

pano preto com fungo foi realizado conforme Paula et al. (2008) banhando o pano numa suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 1×10^8 conídios/mL.

As armadilhas ovitrampas (Figura 1B) foram utilizadas para o monitoramento da população de mosquitos e para avaliação dos resultados dos testes de controle biológico. As ovitrampas foram montadas utilizando vaso de plástico na cor preta de 700 mL com 250 mL de água de torneira e 4 palhetas de eucatex Duratree (10 x 3 cm) presas na borda do vaso por um elástico.

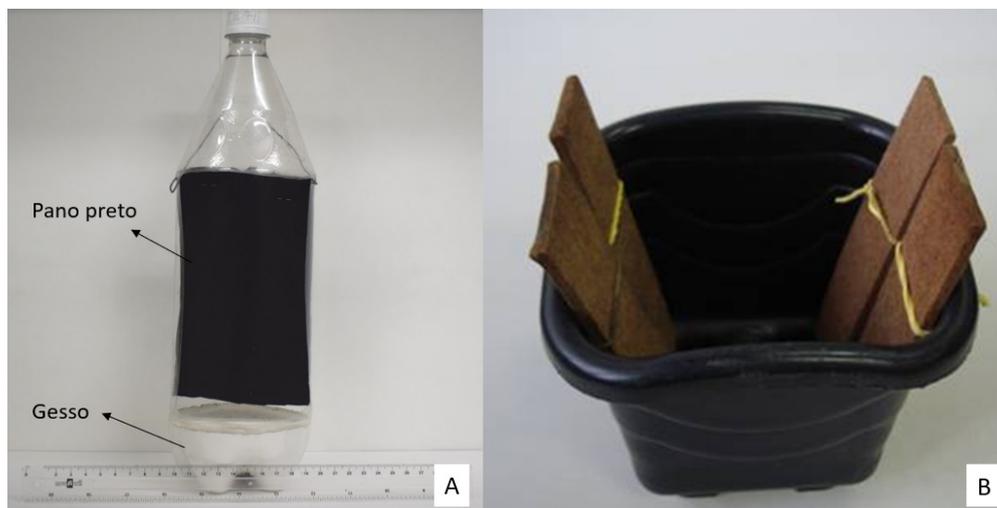


Figura 1 – A) Armadilha PET. B) Armadilha ovitrampa.

Estudos anteriores utilizando ovitrampas na área comum do condomínio comprovaram a presença de mosquito do gênero *Aedes*. No presente trabalho 20 apartamentos térreos do condomínio foram selecionados ao acaso com distancia de aproximadamente 50 m entre os apartamentos. Uma unidade foi selecionada para ser feito o tratamento com fungo e outra para o controle (sem o fungo). No total 10 apartamentos foram tratados com o fungo e 10 apartamentos controles. Os apartamentos com fungo tiveram uma armadilha PET com pano preto + *M. anisopliae* e ao lado uma ovitrampa. Os apartamentos controles tiveram uma armadilha PET com pano preto + água estéril (sem o fungo) e ao lado uma ovitrampa. Todas as armadilhas ficaram nas varandas dos apartamentos no chão protegidas de luz solar direta. Foi avaliado se apartamentos tratados com fungo teriam menores quantidades de ovos de *Aedes* em ovitrampas, comparado com apartamentos controles. Todas as armadilhas PET e ovitrampas foram trocadas quinzenalmente (Figura 2).



Figura 2 – Armadilhas PET e ovitrampas colocadas na varanda.

As quantificações dos ovos de *Aedes* nas palhetas das ovitrampas foram realizadas quinzenalmente no laboratório LEF utilizando uma lupa da marca Labomed® (Figura 3 A). Para avaliar se os ovos foram de *A. aegypti* ou *A. albopictus* 20% das palhetas com ovos foram selecionadas e colocadas em bandejas com água para criação de mosquitos (Figura 3 B) seguindo protocolo de Paula et al., (2008). Depois os adultos foram identificados através de observação visual seguindo Consoli & Oliveira (1998). As demais palhetas foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C, lavadas com água corrente, esfregadas com uma bucha e detergente para destruição dos ovos. Cada morador voluntário do projeto e o síndico foram informados quinzenalmente da quantidade de ovos de *Aedes* coletados e eliminados dos apartamentos. O posicionamento das armadilhas foi feito usando GPS e foi criado um mapa usando “Google Map” e o programa TrackMaker (Figura 3 C).

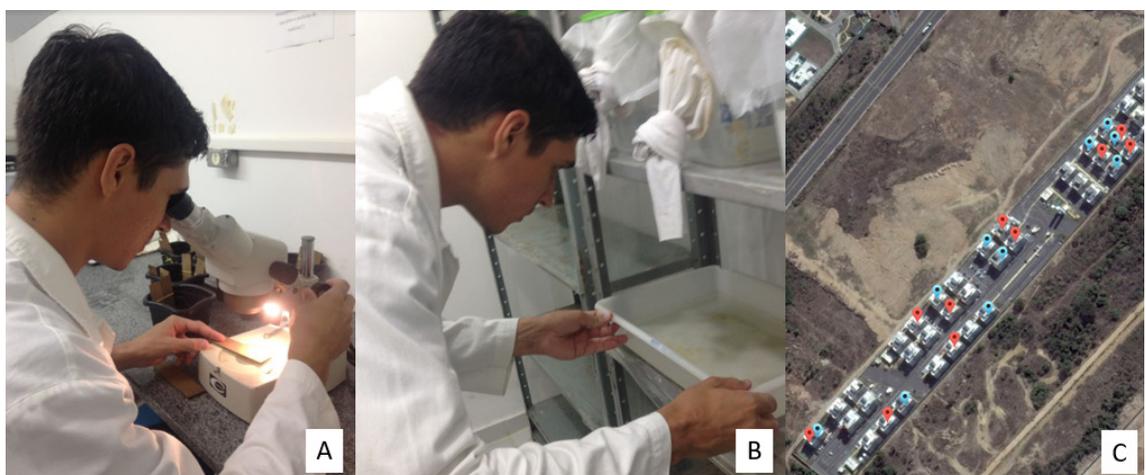


Figura 3 – A) Quantificação de ovos de *Aedes*. B) Criação de *Aedes* para avaliação se eram *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*. C) Posicionamento das armadilhas no condomínio: pontos vermelhos apartamentos tratados com fungo; pontos azuis apartamentos controles.

As comparações das quantidades de ovos coletados entre os tratamentos fungo ou controle no mês estudados foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post-hoc* de Duncan.

3 | RESULTADOS

De junho de 2016 a julho de 2017 foram coletados no condomínio um total de 80.684 ovos de *Aedes*. Na verificação se os ovos eram de *A. aegypti* ou *A. albopictus* foi observado que 11% dos ovos dos mosquitos emergiram em adultos de *A. albopictus*, mostrando a presença dessa espécie na região.

Em todos os meses do estudo os apartamentos tratados com fungo tiveram significativamente menores números de ovos de *Aedes* ($F_{25,259} = 43,4$; $P < 0,01$) comparado com controles (Figura 4). É muito provável que os mosquitos pousaram no pano preto, se infectaram com o fungo e morreram não colocando ovos nas ovitrampas.

Nas ovitrampas dos apartamentos tratados com fungo foram coletados um total de 19.168 ovos de *Aedes*. No mesmo período foram coletados nos apartamentos controles um total de 61.516 ovos de *Aedes*. Todos esses ovos foram retirados do condomínio e eliminados no laboratório, o que provavelmente contribuiu para redução da população de mosquitos na região estudada.

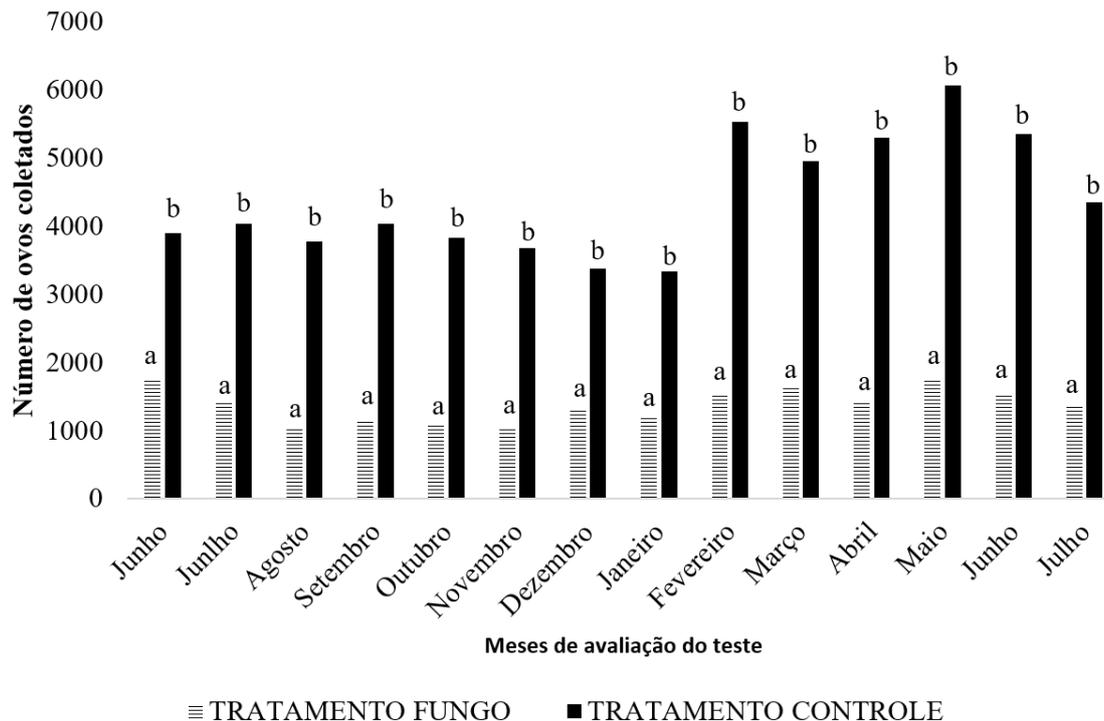


Figura 4 – Número de ovos de *Aedes* coletados no condomínio de junho de 2016 a julho de 2017 em ovitrampas colocadas perto de armadilhas PET com ou sem fungo. Letras diferentes indicam que o número de ovos entre o tratamento fungo e controle do mês estudado foi estatisticamente diferente usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade).

4 | DISCUSSÃO

Na atualidade o mosquito *A. aegypti* é o principal transmissor do vírus da dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana. A incidência dessas doenças tem aumentado com o passar dos anos, talvez pela grave crise nas políticas públicas de saúde que não conseguem controlar os mosquitos utilizando métodos usuais como eliminação de criadouros e utilização de inseticidas sintéticos.

Existe vacina eficiente contra febre amarela e a vacina da dengue está em fase final de testes. Não existe vacina contra Zika e chikungunya. Na maioria das vezes a população só é vacinada quando existe risco de epidemia das doenças, como aconteceu com a epidemia de febre amarela no Brasil no início do ano de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Fungos entomopatogênicos são promissores para o controle da população do mosquito *A. aegypti*. Em um cômodo simulando um quarto de residência humana a armadilha PET com pano preto + fungo foi eficiente para reduzir a sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* (SILVA et al., 2017). Testes no campo em SJB também mostraram a eficiência da armadilha PET com fungo para diminuir a população de *Aedes* (artigo em preparação). Em SJB as armadilhas PET com ou sem fungo foram utilizadas dentro de várias residências, colocadas no chão embaixo de mesas, cadeiras e sofás, o monitoramento da população dos mosquitos foi realizado com ovitrampas e menores números de ovos de *Aedes* foram quantificados nas residências com fungo.

No presente estudo, realizado em um condomínio, as armadilhas PET e as ovitrampas foram colocadas nas varandas do lado de fora dos apartamentos. Em todos os meses de realização dos experimentos foi observado que os apartamentos tratados com o fungo tiveram menores números de ovos de *Aedes*, comparados com controles. Os ovos coletados nas ovitrampas dos tratamentos foram inviabilizados no laboratório. Esses ovos poderiam ter sido colocados em vasos de plantas ou em outros recipientes com água localizados no condomínio aumentando a população de mosquitos adultos que poderiam transmitir doenças para os moradores daquela região.

Os atuais resultados mostraram a eficiência da armadilha PET com pano preto + fungo no campo para reduzir população de mosquitos e também a eficiência da ovitrampa para o monitoramento dos mosquitos. Outros trabalhos têm mostrado a eficácia de armadilhas com fungos para infectar e matar mosquitos. Em condições de laboratório foi verificado que painéis de barro ou panos pretos impregnados com *M. anisopliae* ou *Beauveria bassiana* causaram significativa redução da sobrevivência do mosquito transmissor da malária, *Anopheles gambiae* (MNYONE et al., 2009). Uma caixa em forma de cabana com uma entrada lateral e panos pretos impregnados com *M. anisopliae* colocados internamente resultaram em significativas taxas de infecção de *Anopheles arabiensis* (LWETOIJERA et al., 2010). Em uma simulação de um cômodo residencial panos pretos com *M. anisopliae* fixados com uma fita adesiva em móveis residenciais ou suspensos em garrafa PET resultaram em significativa redução da

sobrevivência de *A. aegypti* (PAULA et al., 2013; SILVA et al., 2017).

No atual estudo foi verificado a presença de *A. albopictus* na região urbana. O condomínio em que o trabalho foi realizado fica na periferia da cidade de Campos dos Goytacazes – RJ. Populações do mosquito *A. albopictus* tem sido mais comumente observado em áreas rurais (LIMA-CAMARA et al., 2006). O aumento da população de *A. albopictus* na área urbana é preocupante visto que este mosquito também é vetor dos vírus da dengue e chikungunya.

A armadilha PET é uma invenção simples, de baixo custo, fácil confecção, fatores importantes considerando a possibilidade de se espalhar armadilhas PET com fungo em várias residências de áreas endêmicas diminuindo a população dos mosquitos vetores de doenças.

5 | CONCLUSÃO

Foi observado a presença do mosquito *A. albopictus* e *A. aegypti* no condomínio em Campos dos Goytacazes – RJ. Nos testes realizados os apartamentos tratados com fungo tiveram menores números de ovos de *Aedes*, comparado com controle. As armadilhas PET com fungo poderiam ser utilizadas no controle de vetores e distribuídas em áreas com altas incidência das doenças transmitidas pelo mosquito *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, p.225, 1998.

LIMA, E.P; PAIVA, M.H.S; DE ARAUJO, A.P; SILVA, E.V.G; SILVA, U.M; OLIVEIRA, L.N; SANTANA, A.E.G; BARBOSA, C.N; PAIVA, C.C.P; GOULART, M.O.F; WILDING, C.S; AYRES, C.F.J; SANTOS, M.A.V.M. **Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara Brazil**. Parasites & Vectors. v.4, p.2-12, 2011.

LIMA-CAMARA, T.N; HONÓRIO, N.A; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil**. Caderno de Saúde Pública. v.22, p.2079-2084, 2006.

LWETOIJERA, D.W; SUMAYE, R.D; MADUMLA, E.P; KAVISHE, D.R; MNYONE, L.L; RUSSELL, T.L; OKUMU, F.O. **An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metharizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis***. Parasites & Vectors. v.3, p.2-6, 2010.

MACIEL-DE-FREITAS, R; BROCKI NETO, R; GONÇALVES, J.M; CODEÇO, C.T; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Movement of dengue vectors between the human modified environment and urban forest in Rio de Janeiro**. Journal of Medical Entomology. v.43, p.1112-1120, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017) <http://portalms.saude.gov.br/>

MNYONE, L.L; KIRBY, M.J; LWETOIJERA, D.W; MPINGWA, M.W; KNOLS, B.G.J; TAKKEN, W; RUSSELL, T.L. **Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and**

persistence. Malaria Journal. v.8, p.309, 2009.

MONTELLA, I.R; MARTINS, A.J; VIANA-MEDEIROS, P.F; LIMA, J.B; BRAGA, I.A; VALLE, D. **Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v.77, p.467-477, 2007.

PAULA, A.R; RIBEIRO, A; IMAD SILVA, L.E; SAMUELS, R.I. **Monitoramento de *Aedes* e ações educacionais integrando a comunidade de São João da Barra - RJ.** Revista de Extensão UENF. v. 3, p. 43-55, 2017.

PAULA, A.R; CAROLINO, A.T; SILVA, C.P; SAMUELS, R.I. **Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions.** Parasites and Vectors. v.35, p.1–7, 2013a.

PAULA, A.R; CAROLINO, A.T; SILVA, C.P; SAMUELS, R.I. **Efficiency of fungus-impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Lerrersin Apllied Microbiology. v.57, p.1–7, 2013b.

PAULA, A.R; BRITO, E.S; PEREIRA, C.R; CARRERA, M.P; SAMUELS, R.I. **Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control.** Biocontrol Science and Technology. v.18, p.1017-1025, 2008.

SILVA, L.E; PAULA, A.R; RIBEIRO, A; BUTT, T; SILVA, C; SAMUELS, R.I. **A new method of deploying entomopathogenic fungi to control adult *Aedes aegypti* mosquitões.** Journal of Applied Entomology. v.3, p.1-8, 2017.

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE BORRACHUDOS (DIPTERA: SIMULIIDAE) DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL: INVENTÁRIO FAUNÍSTICO DA MESORREGIÃO NOROESTE RIO-GRANDENSE

Sirlei Maria Hentges

Universidade Federal da Fronteira Sul
Cerro Largo - Rio Grande do Sul

Tieli Cláudia Menzel

Universidade Federal da Fronteira Sul
Cerro Largo - Rio Grande do Sul

Milton Norberto Strieder

Universidade Federal da Fronteira Sul, Grupo de
Estudos e Pesquisas em Biociências
Cerro Largo - Rio Grande do Sul

RESUMO: Estudos básicos em zoologia são fundamentais para aplicação, a nível regional, das medidas de controle e manejo de espécies com importância sanitária. Neste contexto, este trabalho objetivou reunir informações referentes à taxonomia, diversidade local e bioecologia das espécies de borrachudos (Diptera, Simuliidae) do Noroeste do Rio Grande do Sul (RS), através de estudos bibliográficos e levantamento faunístico em arroios da sub-bacia do rio Ijuí. O levantamento de campo foi realizado no período de agosto a outubro de 2015, abrangendo 13 municípios localizados nas três regiões (alta, média e baixa) da bacia, contemplando 27 pontos de amostragem. A coleta de material biológico foi direcionada nas formas imaturas de borrachudos (larvas e pupas), e efetuada em dois substratos (vegetação e seixos) durante 30 minutos. Por

meio do esforço amostral alcançou-se um total de 47.551 indivíduos imaturos; destes, 9.038 exemplares (larvas de último estágio e pupas) foram examinados para efeito de identificação. A diversidade de simulídeos encontrada foi de 10 espécies do gênero *Simulium*, conforme segue: *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum*, *Simulium (Psaroniocompsa) jujuyense*, *Simulium (Psaroniocompsa) inaequale*, *Simulium (Psaroniocompsa) travassosi*, *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, *Simulium (Chirostilbia) subpallidum*, *Simulium (Psilopelmia) perflavum*, *Simulium (Psilopelmia) lutzianum*, *Simulium (Trichodagmia) orbitale* e *Simulium (Trichodagmia) rubrithorax*. *Simulium pertinax* foi a mais abundante e corresponde a principal espécie responsável pelos agravos causados por borrachudos no sul do Brasil. Os resultados obtidos permitiram ampliar o conhecimento acerca da Família Simuliidae no RS, especialmente no que se refere à Região Noroeste, onde ocorrem 23 espécies das 31 registradas para o Estado.

PALAVRAS-CHAVE: Simulídeos; Região Noroeste; Bacia do rio Ijuí.

ABSTRACT: Basic studies in zoology are fundamental for the application, at a regional level, of the control and management of species with sanitary importance. In this context, the main objective of this work was to collect

information on taxonomy, local diversity and bioecology of the black flies (Diptera Simuliidae) species from northwestern Rio Grande do Sul (RS), through bibliographical studies and survey of fauna in streams of the sub-basin of the Ijuí River. The field survey was performed from August to October 2015, including 13 cities, localized in the main regions (high, medium and low) of the basin, contemplating 27 points of sampling. The collection of the biological material was directed in the black flies underdeveloped form (larvae and pupa), and performed in two substrates (vegetation and pebbles), during thirty minutes. Through this sampling effort it was gotten a total of 47.551 underdeveloped individuals; these 9.038 specimen (last stage larva and pupa) were examined to identification effect. The black flies diversity found in Ijuí river basin, were of 10 species of *Simulium*, as follow: *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum*, *Simulium (Psaroniocompsa) jujuyense*, *Simulium (Psaroniocompsa) inaequale*, *Simulium (Psaroniocompsa) travassosi*, *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, *Simulium (Chirostilbia) subpallidum*, *Simulium (Psilopelmia) perflavum*, *Simulium (Psilopelmia) lutzianum*, *Simulium (Trichodagmia) orbitale* e *Simulium (Trichodagmia) rubrithorax*. *Simulium pertinax* was the larger and it corresponds to the main responsible specie to the grievance caused by black flies in the south of Brazil. The obtained results high improve the knowledge al about the Simuliidae Family in the Rio Grande do Sul state, especially about the Northwest region, which has 23 species of the 31 registered in the state.

KEYWORDS: Black flies; Northwest Region; Ijuí river basin.

1 | INTRODUÇÃO

Os borrachudos são insetos da Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Simuliidae e Superfamília Culicoidea (COSCARÓN, 1981). São popularmente conhecidos como “borrachudos” na maioria das regiões brasileiras, e mais ao norte e nordeste do Brasil como “piuns”; já na língua inglesa são denominados “blackflies”, e na linguagem espanhola como “jejenes” ou “moscas negras” (HAMADA; PEPINELLI; MARDINI, 2006B).

Em termos de biodiversidade, a revisão taxonômica oficial de Adler e Crosskey (2016) apontou como sendo válidas 2.219 espécies em todo planeta. Destas, 2.204 existem atualmente e outras 15 são fósseis. Os registros para a região Neotropical sugerem a presença de 359 espécies, das quais 91 estão assinaladas para o Brasil e 31 para o Rio Grande do Sul (STRIEDER, 2004; HAMADA; PEPINELLI; MARDINI, 2006B; ADLER; CROSSKEY, 2016).

De acordo com Coscarón (1981) e Couceiro et al. (2014), o estudo da fauna de Simuliidae da região Neotropical tem obtido ênfase nas últimas décadas e seguirá avançando, devido ao interesse pelo conhecimento das doenças transmitidas por algumas espécies antropofílicas. Para o Brasil, a grande maioria dos trabalhos que tem contribuído com o conhecimento da biologia de simúlídeos têm se concentrado,

basicamente, nos estados do Rio Grande do Sul (RS), de São Paulo (SP), e na região Amazônica (SANTOS; LOPES; SANTOS, 2010).

Os simulídeos têm sido objeto de estudo no sul do Brasil, principalmente desde os anos 70. São insetos de hábito hematófago, com várias espécies de importância sanitária, muitas vezes abundantes em áreas rurais. No RS, as atividades do “Programa Estadual de Controle de Borrachudos” abrangem cerca de 170 municípios do Estado (MARDINI et al., 2000). Entretanto, algumas regiões ainda reúnem levantamentos escassos sobre a fauna de simulídeos; dentre elas pode ser citada a região Noroeste Rio-Grandense.

O presente trabalho caracteriza-se como um estudo taxonômico e levantamento da diversidade de simulídeos ocorrentes na Mesorregião do Noroeste do RS, reunindo informações referentes à distribuição local das espécies no sul do Brasil. O objetivo principal foi reunir informações referentes à taxonomia, diversidade local e bioecologia das espécies de borrachudos (Diptera, Simuliidae) do Noroeste do estado do RS, através de estudos bibliográficos e levantamento faunístico em diferentes microbacias hidrográficas da região.

2 | METODOLOGIA

O trabalho teve início com a revisão bibliográfica sobre as espécies de Simuliidae válidas no cenário científico atual, tomando como principal referência a revisão oficial de Adler e Crosskey (2015). Adicionalmente, foram analisados registros feitos por Strieder (2004) quanto à ocorrência de Simuliidae em diferentes municípios da região Noroeste do RS.

O Noroeste Sul-Riograndense compreende a região hidrográfica do Rio Uruguai, em suas diferentes sub-bacias e estas, por sua vez, são divididas em sub-regiões. A fim de padronizar o procedimento de levantamento em campo previsto no presente estudo, bem como abranger regiões hidrográficas ainda desprovidas de dados sobre a ocorrência de simulídeos, foi executado um plano de amostragem direcionado a várias microbacias, sendo as coletas feitas pelo método estratificado, abrangendo os diferentes biótopos (unidades de paisagem) da bacia hidrográfica do rio Ijuí.

O levantamento regional das espécies foi executado no período de agosto a outubro de 2015, abrangendo 13 municípios, localizados nas três principais regiões (alta, média e baixa) da bacia do rio Ijuí, contemplando 27 pontos de amostragem. O tempo de coleta foi de 30 minutos de dedicação para cada tipo de substrato investigado em todos os pontos amostrais.

Concomitantemente ao trabalho de campo, todo o material biológico coletado foi analisado durante a triagem, por meio de estereomicroscópios. As pupas e larvas do último ínstar foram separadas das larvas em estádios iniciais de desenvolvimento, para posterior identificação das espécies. Como material de apoio, foram utilizadas

as chaves dicotômicas e pictóricas de Coscarón (1991), Strieder; Corseuil; Py-Daniel (1992), Strieder e Py-Daniel (1999) e Hamada; Pepinelli; Mardini (2006a).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento taxonômico das espécies de Simuliidae ocorrentes na mesorregião do Noroeste Sul-Riograndense realizado com base na revisão oficial de Adler e Crosskey (2015, 2016) e ainda, considerando os registros feitos por Strieder (2004), resultou em uma lista de 23 espécies para a região, incluídas em dois gêneros e quatro subgêneros, conforme segue: *Lutzsimulium hirticosta*, *Simulium (Psaroniocompsa) botulibranchium*, *Simulium (Psaroniocompsa) inaequale*, *Simulium (Psaroniocompsa) clavibranchium*, *Simulium (Psaroniocompsa) subnigrum*, *Simulium (Psaroniocompsa) travassosi*, *Simulium (Psaroniocompsa) anamariae*, *Simulium (Psaroniocompsa) brevifurcatum*, *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum*, *Simulium (Psaroniocompsa) jujuyense*, *Simulium (Psaroniocompsa) minusculum*, *Simulium (Chirostilbia) distinctum*, *Simulium (Chirostilbia) pertinax*, *Simulium (Chirostilbia) riograndense*, *Simulium (Chirostilbia) spinibranchium*, *Simulium (Chirostilbia) subpallidum*, *Simulium (Psilopelmia) dinellii*, *Simulium (Psilopelmia) perflavum*, *Simulium (Psilopelmia) lutzianum*, *Simulium (Trichodagmia) itaunense*, *Simulium (Trichodagmia) jeteri*, *Simulium (Trichodagmia) orbitale* e *Simulium (Trichodagmia) rubrithorax*.

Quanto aos dados obtidos por meio das coletas, partindo da contagem de indivíduos triados, obteve-se um total de 47.551 exemplares, incluindo larvas e pupas de ambos os substratos investigados (vegetação e seixos). Conforme já mencionado, a identificação em nível de espécie não incluiu as larvas de estádios iniciais, por não possuírem histoblasto branquial bem desenvolvido. Estas, por sua vez, apareceram em um padrão bastante numeroso, mais precisamente 38.513 indivíduos.

Em suma, a identificação de exemplares de simúlídeos resultou em um total de 9.038 indivíduos, possibilitando o registro de 10 espécies para a bacia hidrográfica do rio Ijuí, pertencentes ao gênero *Simulium* Latreille, 1802. As espécies estão incluídas em quatro (4) subgêneros distintos, conforme a relação elaborada. A seguir, são apresentados os subgêneros e as respectivas espécies identificadas:

(Psaroniocompsa) Enderlein, 1934.

Simulium incrustatum Lutz, 1910.

Simulium jujuyense Paterson & Shannon, 1927.

Simulium inaequale Paterson & Shannon, 1927.

Simulium travassosi d'Andretta & d'Andretta, 1947.

(Chirostilbia) Enderlein, 1921.

Simulium pertinax Kollar, 1832.

Simulium subpallidum Lutz, 1910.

(*Psilopelmia*) Enderlein, 1934.
Simulium perflavum Roubaud, 1906.
Simulium lutzianum Pinto, 1932.
(*Trichodagmia*) Enderlein, 1934.
Simulium orbitale Lutz, 1910.
Simulium rubrithorax Lutz, 1909.

A relação de espécies e dos respectivos subgêneros segue o padrão da revisão oficial de Adler e Crosskey (2016). Dessa forma, o **número** total e subtotal tem se restringido em razão das sinonímias empregadas no cenário científico atual, que determina as denominações válidas no momento.

Adicionalmente, a curva de acumulação de espécies (Gráfico 1) permite evidenciar um padrão de levantamento suficiente para a bacia do rio Ijuí, considerando as três principais regiões amostradas (Ijuí Alto, Médio e Baixo). Os pontos amostrais relacionados no gráfico representam a inclusão de uma espécie adicional ao estudo, ou ainda, uma estabilização nesse subtotal/total de espécies. As coletas foram realizadas aleatoriamente nas três referidas regiões, entretanto, conhecida a distribuição dos pontos, pode-se observar uma estabilização na curva de acumulação ao final de cada uma delas, bem como no levantamento como um todo.

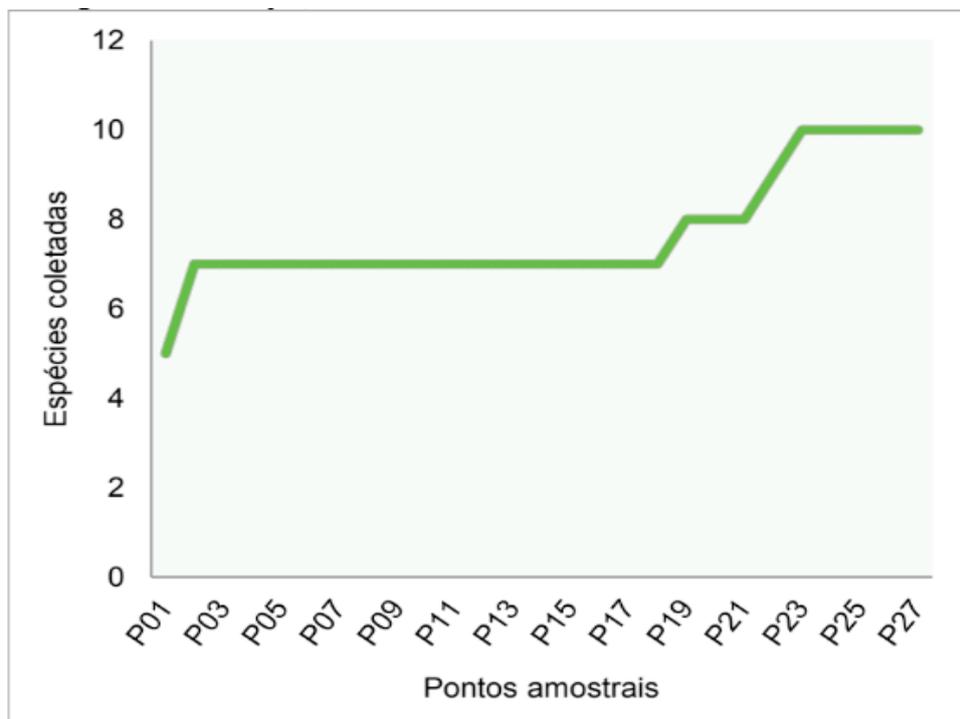


Gráfico 1 – Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral de simúlideos na bacia hidrográfica do rio Ijuí, RS

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Quanto à riqueza e abundância de espécies, apresentadas no Gráfico 2, obteve-se um padrão bastante significativo para a espécie *Simulium* (*Chirostilbia*)

pertinax, correspondendo a 60,6% do total de indivíduos. *Simulium (Psaroniocompsa) incrustatum* aparece como a segunda espécie mais abundante, seguida por *Simulium (Trichodagmia) orbitale*.

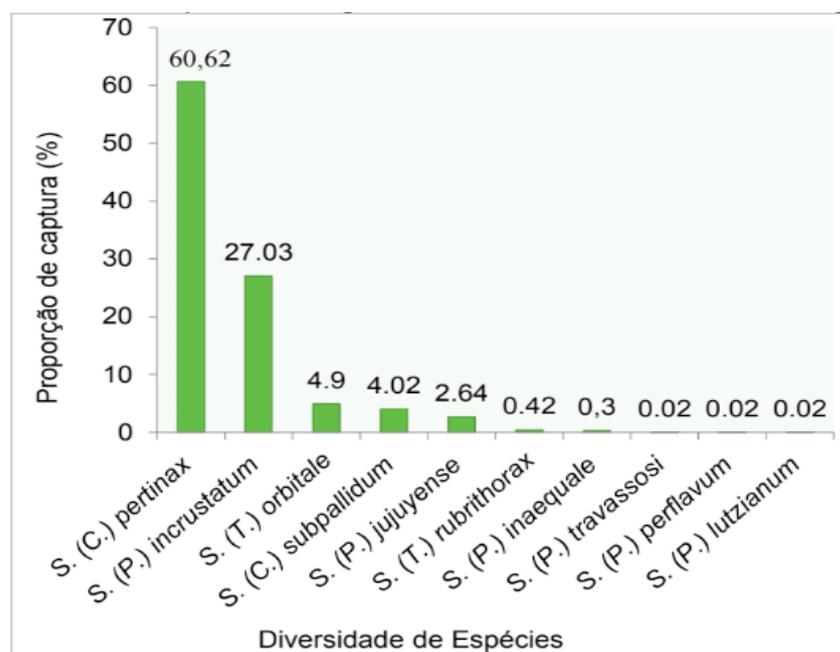


Gráfico 2 – Proporção de captura das diferentes espécies de Simuliidae obtidas nas coletas realizadas no período de agosto a outubro de 2015, na bacia hidrográfica do rio Ijuí, RS

Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

De forma complementar, durante o estudo bibliográfico comparou-se a lista oficial de Adler e Crosskey (2015) com outros estudos disponíveis. Verificou-se que a mesma ainda não incluía a espécie *Simulium (Psilopelmia) dinellii* para o estado do RS. Esta, por sua vez, já foi registrada por outros autores no meio científico, como na Revista Brasileira de Entomologia, onde Strieder; Santos; Vieira (2006) a indicam como espécie válida para nosso estado.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram ampliar o conhecimento já consolidado acerca da Família Simuliidae no estado do RS, especialmente no que se refere à Região Noroeste, onde ocorrem 23 espécies das 31 registradas para o Estado. Entre as dez espécies encontradas na bacia do rio Ijuí, *Simulium pertinax* foi a mais abundante. Esta espécie é a principal responsável pelos agravos causados por borrachudos no sul do Brasil e têm seu nível populacional aumentado em consequência da poluição orgânica dos arroios, principalmente devido ao tratamento inadequado dos dejetos de animais no meio rural. A publicação da lista de espécies ocorrentes na mesorregião Noroeste pode servir como subsídio ao “Programa Estadual de Controle de Borrachudos”, que abrange cerca de 170 municípios no RS.

REFERÊNCIAS

- ADLER, P.; CROSSKEY, R. **World blackflies (Diptera: Simuliidae)**: a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. Inventory Revision, p. 1-123, 2015.
- ADLER, P.; CROSSKEY, R. **World blackflies (Diptera: Simuliidae)**: a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. Inventory Revision, p. 1-126, 2016.
- COSCARÓN, S. **Fauna de agua dulce de la Republica Argentina**. (Insecta: Diptera) Fascículo 1 Simuliidae. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura – FECIC. Buenos Aires, p. 1-76 [+ 29 p. figuras e legendas), 1981.
- COSCARÓN, S. **Fauna de agua dulce de la Republica Argentina**. (Insecta: Diptera) Fascículo 2 Simuliidae. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura – FECIC. Buenos Aires, 1991.
- COUCEIRO, S. R. M. et al. **Black-fly assemblage distribution patterns in streams in disturbed areas in southern Brazil**. Acta Tropica, v. 140, p. 26-33, jul./ag. 2014.
- HAMADA, N.; PEPINELLI, M.; MARDINI, L. B. Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Simulídeos: Programa Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil**: chave de identificação de pupas da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) para apoio às equipes regionais e municipais na determinação das espécies. Porto Alegre: CEVS, 2006a.
- HAMADA, N.; PEPINELLI, M.; MARDINI, L. B. L. F. Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Simulídeos: Programa Estadual do Rio Grande do Sul, Brasil**: guia para orientação aos municípios sobre manejo integrado, controle e gestão de insetos da família Simuliidae (Diptera, Nematocera) no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CEVS, 2006b.
- MARDINI, L. B. L. F. et al. **Simulium spp. Control Program in Rio Grande do Sul, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, p. 211-214, 2000.
- SANTOS, R. B. D.; LOPES, J.; SANTOS, K. B. D. **Distribuição Espacial e Variação Temporal da Composição de Espécies de Borrachudos (Diptera: Simuliidae) em uma Microbacia Situada no Norte do Paraná**. Neotropical Entomology. Paraná, v. 39, n. 2, p. 289-298, mar./abr. 2010.
- STRIEDER, M. N.; CORSEUIL, E.; PY-DANIEL, V. **Espécies do gênero Simulium (Diptera, Simuliidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul – Brasil, com chaves para sua identificação**. Acta Biologica Leopoldensia. São Leopoldo, v. 14, n. 2, p. 53-74, jul./dez. 1992.
- STRIEDER, M. N.; PY-DANIEL, V. **Espécies de Inaequalium (Diptera, Simuliidae): dados bionômicos e chaves para sua identificação**. Biociências. Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 43-72, dez. 1999.
- STRIEDER, M. N. **Espécies de Simulídeos (Diptera, Nematocera, Simuliidae) no Rio Grande do Sul, Brasil**: Distribuição Geográfica. Entomologia y Vectores. Rio de Janeiro, v. 11, n.1, p. 113-143, 2004.
- STRIEDER, M. N.; SANTOS, J. E. D.; VIEIRA, E. M. **Distribuição, abundância e diversidade de Simuliidae (Diptera) em uma bacia hidrográfica impactada no sul do Brasil**. Revista Brasileira de Entomologia. São Paulo, v. 50, n. 1, p. 119-124, 2006.

IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptococcus sp.* EM EXCRETAS DE POMBOS – REGIÃO CENTRAL DE SÃO PAULO

Karen Dias Costa

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP. kareencosta@yahoo.com

Jorge Luís Freire Pinto

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP. jorgelpinto@gmail.com.

Alípio Carmo

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP. alipio@unip.br

Rildo Yamaguty Lima

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP. rildoylima@gmail.com.

Marília Patrão

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP. marilia.patrao@gmail.com

Sandra Nunes Messias

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP.

Fernando Luis Affonso Fonseca

Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de
Medicina do ABC, Av. Príncipe de Gales, 821 –
Santo André, SP. profferfonseca@gmail.com.

Flávia de Sousa Gehrke

Universidade Paulista, Rua Cancioneiro Popular,
210 - Chácara Santo Antônio - São Paulo - SP,
São Paulo, SP.

Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de
Medicina do ABC, Av. Príncipe de Gales, 821 –
Santo André, SP.

Pós Graduação em Ciências da Saúde, Hospital
do Servidor Público, Av. Ibirapuera, 981 - 2o
andar, São Paulo flaviagehrke@hotmail.com

* Autora correspondente

RESUMO: O *Cryptococcus sp.* é um fungo oportunista que pode ser encontrado em fezes de aves, especialmente em pombos. A Praça da Sé é um ponto turístico e histórico por localizar o marco zero da cidade, os visitantes e transeuntes podem ser contaminados e desenvolver criptococose. Objetivo: Detectar a presença de *Cryptococcus sp.* em fezes de pombos na praça da Sé. Material e métodos: Foram coletadas 20 amostras de excretas envelhecidas e secas, inoculadas em ágar Sabouraud e incubadas à 25 °C. Após as colônias sugestivas foram coradas e observadas. Resultados: Foi constatado o crescimento de colônias mucóides, brilhantes de coloração branca à bege em oito placas (40%). Com identificação de morfologia compatível através da microscopia. Conclusão: Neste estudo isolamos colônias fúngicas com características compatíveis com o gênero *Cryptococcus* indicando um risco eminente para transeuntes e moradores de ruas. Desta forma, é importante que autoridades sanitárias

reforcem a necessidade de limpeza e conservação de áreas públicas e conscientizem da população sobre medidas de educação sanitária.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus sp.*, fungos, pombos, saúde pública, imunodeprimidos.

INTRODUÇÃO

Fungos são organismos heterotróficos, eucariontes e anaeróbicos facultativos. São os principais decompositores, realizam simbiose com bactérias, plantas e insetos e também participam de diversos processos de transformação¹. Dentre a diversidade de espécies encontra-se o *Cryptococcus neoformans*, um saprófita pertencente da classe Basidiomycetes, família dos Filobasidiaceae^{2,3}. Tem distribuição cosmopolita, presente em vários lugares do mundo⁴. Foi isolado pela primeira vez em 1894 em frutas na Itália. No decorrer dos anos esses fungos possuíram diferentes denominações, até que Beham, em 1935, propôs um consenso na adequação do nome e caracterização da espécie.³ Causador da Criptococose, infecção fatal em imunodeprimidos que ocorre por inalação de esporos que acometem a cavidade nasal e os pulmões⁵. Pode-se disseminar sistemicamente por via hematogênica ou linfática. A evolução da doença está diretamente ligada ao grau de imunidade do hospedeiro². Apresenta papel relevante dentre as infecções fúngicas oportunistas, sendo considerada como uma das micoses mais comuns em indivíduos imunodeprimidos⁶. A doença pode evoluir para o sistema nervoso central, causando meningite criptocócica em indivíduos imunodeprimidos, portadores de HIV e transplantados^{2,3}. Em casos graves, ocorre disseminação da infecção para a pele, órgãos parenquimatosos e ossos. Em imunocompetentes ocorre, na maioria dos casos, apenas uma infecção primária, por apresentar baixa patogenicidade, ser essencialmente oportunista e possuir pouca capacidade de sobrevivência no hospedeiro².

O *Cryptococcus sp* está associado com solo contaminado por fezes de psitacíformes, passeríformes, columbíformes e falconíformes. Os excrementos secos das aves são ricos em nitrogênio, como creatinina e ureia, substâncias utilizadas como fonte de energia, por esses fungos. Pode estar presente também em frutas, árvores, mucosa oronasal, pele de animais, excrementos de morcegos, excrementos de baratas e em pessoas saudáveis (QUEIROZ, 2008).

Epidemiologicamente as variedades e os sorotipos do *Cryptococcus sp.* possuem distribuição heterogênea em diferentes países e até mesmo diferenças de regiões de um mesmo país (COSTA, 2007). O controle e diminuição da população de pombos são medidas profiláticas cabíveis. Os pombos estão diretamente relacionados aos fungos por sua forma de limpeza e hábitos do seu ciclo de vida. O *C. neoformans* coloniza estas aves comportando-se como endosaprófito natural. A colonização ocorre pelo hábito de raspar e fragmentar pedaços de madeira (PEREIRA; BARROS, 2012).

A cidade de São Paulo a mais populosa do país, concentra cerca de 21% da

população brasileira, estimada em 44.678.146 habitantes dados fornecidos pelo IBGE às 14h30 do dia 26 de março de 2016. Na região central, segundo alguns dados do metrô circulam na estação Sé 78 mil pessoas diariamente. Todas estas indivíduos que utilizam essas áreas estão expostas a infecção por *C. neoformans* que oferece risco letal para portadores de HIV e imunodeprimidos (PEREIRA; BARROS, 2012; QUEIROZ, 2008). Moradores de rua por alimentação inadequada, condições precárias de higiene e contágio de outras patologias são pessoas classificadas como imunodeprimidos. A região central de São Paulo concentra cerca de 64% da população de moradores de rua da capital de São Paulo (Censo da prefeitura, 2011). É evidente que a população que utiliza as áreas centrais da cidade e a população em situação de rua da região, está exposta ao risco que poderia ser minimizado com medidas de controle da população de pombos, por parte da prefeitura de São Paulo.

OBJETIVOS

Verificar a presença *Cryptococcus* sp. na região central de São Paulo, especialmente em locais que apresentam condições ideais para proliferação do fungo com grande população de pombos. Locais com higiene precária e de uso da maioria da população da cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Com auxílio de EPI's foram coletadas excretas envelhecidas e secas, por serem substrato favorável para o crescimento do fungo. Foi utilizada espátula, luvas e frascos para acondicionamento de fezes de pombos. Para otimizar coleta à área da praça foi dividida em quatro quadrantes (figura 1). Após coleta transportou-se imediatamente amostras para laboratório.

Em cada quadrante foram coletadas cinco amostras, priorizando locais de maior uso populacional (figura 2). As amostras foram homogeneizadas em solução fisiológica e o sobrenadante foi aspirado e semeado em placas de Petri contendo o meio de cultura de Ágar Sabouraud. As placas foram encubadas em estufa, por cinco dias, a temperatura de 25°C. Para a confirmação do crescimento, as amostras positivas foram submetidas a confecção de lâminas coradas com tinta da China para análise microscópica do fungo.

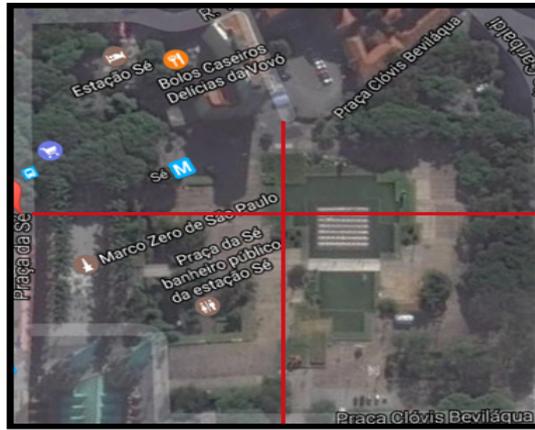


Figura 1- Imagem de satélite da Praça da Sé, modificada. Nesta versão apresenta-se os quatro quadrantes das coletas

Fonte: Google Maps



Figura 2 – Imagens de excretas de pombo na Praça da Sé. **A)** Área comum do metro. **B)** Marco zero. **C)** Local social com presença pombos e excretas. **D)** Banco da praça.

Fonte: Arquivo pessoal

RESULTADOS

Foi realizada coleta de 20 amostras de excretas de pombo na praça da Sé. A área foi dividida em quatro quadrantes e em cada destes foram coletadas cinco amostras. Após a coleta foram transportadas imediatamente para laboratório de Saúde UNIP Chácara Santo Antônio. As 20 amostras foram inoculadas em placas com o meio de cultura ágar Sabouraud. Em seguida as placas foram incubadas em estufa à 25 oC e observadas diariamente por cinco dias. Após este período realizou-se identificação presuntiva de colônias com aspecto brilhante, mucóide e de coloração branca a bege (figura 3). Dentre as 20 amostras coletadas e semeadas, oito placas de Ágar Sabouraud apresentaram crescimento sugestivo para *Cryptococcus sp* (tabela 1). As oito amostras com crescimento positivo foram submetidas à coloração de tinta da china para pesquisa de cápsula de polissacarídeos.

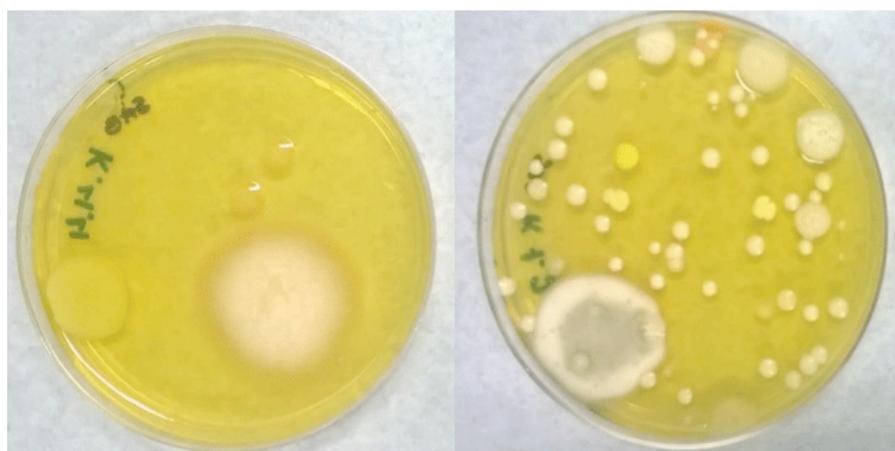


Figura 3. Meio Sabouraud.

Fonte: Arquivo pessoal

Amostras	Ágar Saburaud	Amostras	Ágar Saburaud
1.1	+	3.1	+
1.2	+	3.2	-
1.3	-	3.3	-
1.4	-	3.4	-
1.5	-	3.5	-
2.1	+	4.1	-
2.2	-	4.2	-
2.3	+	4.3	-
2.4	+	4.4	+
2.5	+	4.5	-
		TOTAL	08

+: crescimento de colônias; - : sem crescimento de colônias.

Tabela 1- Presença de crescimento indicativo de *Cryptococcus sp*.

DISCUSSÃO

Cryptococcus sp. gênero fungos que podem ser isolados em cascas de árvores em decomposição e principalmente em excretas de pombo de regiões metropolitana (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; QUEIROZ, 2008). Apresenta capacidade de utilização

das purinas em fezes de aves para obtenção de energia. E tendo espécies causadoras de infecções graves em portadores de HIV e imunodeprimidos (COSTA, 2007; SILVA, 2008).

Diversas espécies de *Cryptococcus sp.* já foram descritas, porém apenas as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* são consideradas patogênicas. Staib em 1962, foi o primeiro a analisar fezes em meio de cultura para detecção de *C. neoformans* e observar coloração marrom em presença de semente de *Guizotia abyssinica* (SCAIN, 2012).

Araújo (2014) em seu estudo relatou a presença de *Cryptococcus sp.* em 34% das amostras em Araçatuba/SP. Dentre as amostras positivas 18% de *C. gatti* e 16% de *C. neoformans* (ARAÚJO, 2014). Também em São Paulo, Soares, et al (2005) na cidade de Santos relatou 13,9% de *C. neoformans* percentual próximo ao de Araújo (2014). Silva e Capuano (2012), no entanto em Ribeirão Preto encontraram *Cryptococcus sp.* em 75% das amostras. Contudo, não isolaram *C. neoformans* e *C. gatti* em estudo.

Menezes, et al (2014) em Santa Catarina estimou o valor de 7.69% de *Cryptococcus sp.* em suas amostras. No Paraná, Yamamura, et al. (2013), relatou 84% da espécie *C. neoformans* em excretas de pombo. Já Garcia (2008) apresentou presença de *C. neoformans* apenas em 10% da amostra coletas em Santa Catarina.

Yamamura, et al. (2013) e Pereira e Barros (2012) afirmam que este fungo apresenta melhor desenvolvimento em locais protegidos das condições climáticas. Pereira e Barros (2012) ainda destacam que as torres de igreja oferecem proteção para população de pombos e possui características favoráveis ao desenvolvimento do fungo.

Condições ambientais, incidência solar direta e umidade são fatores influentes no desenvolvimento do fungo (SILVA, 2008). Locais com alta umidade favorecem a alcalinização das excretas por bactérias, inibindo crescimento do *Cryptococcus sp.* O acúmulo de fezes também é ponto importante para desenvolvimento do fungo. Ambientes fechados estão mais sujeitos a esse acúmulo e também podem oferecer proteção a luz solar direta tornando-se habitat ideal. (PEREIRA; BARROS, 2012; SILVA, 2008; YAMAMURA, 2013).

Em nosso estudo, obtivemos crescimento de *Cryptococcus sp.* em 40% das amostras. No entanto, não foi observada a presença da espécie *C. neoformans* situação também descrita por Silva e Capuano (2012). Por meio da literatura foi verificado que o patógeno é diretamente influenciado por questões locais e diversas outras variáveis, não solidamente descritas.

Dentre os estudos apresentados podemos observar que o *Cryptococcus sp.* apresenta difícil detecção e estabelece diferentes interações com o ambiente. Tornando a comparação entre os estudos imprecisa. Embora possa ser fragilmente observado, que as regiões do sul apresentam maior prevalência que as demais regiões.

CONCLUSÕES

A competência de adaptação do *Cryptococcus sp.* é notável, a predileção do fungo por ambientes protegidos de luz solar direta é característica preocupante para locais de uso público, como escolas, bibliotecas, rodoviárias, entre outros. A grande população de pombos na maioria desse locais é de conhecimento comum de todos, aumentando a possibilidade de acúmulo de fezes.

Neste estudo isolamos colônias fúngicas com características compatíveis com o gênero *Cryptococcus sp.* A praça da Sé é um local propício para o acúmulo de excretas, além de algumas áreas apresentarem pouca luminosidade. Sendo, desta forma um ambiente apropriado para a manutenção desta espécie. Outra situação preocupante é a população de rua existente naquele local, onde há risco eminente de contaminação. Desta forma, é importante que as autoridades sanitárias realizem medidas de limpeza e conservação de áreas públicas, além de conscientizar a população em relação às medidas de educação sanitária, como por exemplo, a lavagem das mãos. Mais estudos são necessários para se comprovar qual (is) espécie (ies) de *Cryptococcus* estão naquela região.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO JEC. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. Dissertação - Universidade Estadual de São Paulo, Araçatuba, 2014.
- BALTAZAR LM, RIBEIRO MA. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no estado do espírito santo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(5):449-453 2008. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n5/a03v41n5.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2017.
- COSTA A. K. F. Leveduras associadas à cloaca e a excrementos de pombos (*Columba livia*): um enfoque especial para os aspectos micológicos de *Cryptococcus spp.* Dissertação (Faculdade de Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.
- GARCIA, L. C. Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina. Florianópolis, 2008. Disponível em: < <http://www.cienciasbiologicas.ufsc.br/TCC-BIOLOGIA-UFSC/TCCLarissaCGarciaBioUFSC-08-2.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2017.
- MENEZES; T. et al. *Cryptococcus spp.* em excretas de pombos (*Columba livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. *Science and Animal Health*, v.2 n.2, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.15210/sah.v2i2.4109>
- PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco- epidemiologia e novos nichos ecológicos. *FACIDER- Revista Científica*, Mato Grosso, v. 1, n. 1, 2012.
- QUEIROZ, JPAF. et al. *Criptococose-uma revisão bibliográfica*. *Acta Veterinaria Brasilica*, Rio Grande do Norte, v.2, n. 2, 2008.
- SANTOS, E. R. D.; JUNIOR, P. A. H. *Material Complementar ao livro Sistemática vegetal: Fungos*. Florianópolis, 2015. Disponível em <<https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1311301/course/>>

section/972329/Drechsler- Santos%202015%20material%20did%C3%A1tico%20fungos%20encarte%20EAD.pdf>. Acesso em 10 de mar 2016.

SCAIN, G. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columbalivia*) nas praças públicas da cidade de Lages, Santa Catarina. Monografia (Universidade do Extremo Sul Catarinense), Lages, 2012.

SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 67, n. 2, 2008. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/7176/7401>>. Acesso em: 10 maio 2017.

SOARES, M. C. B. et al. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo São Paulo, v.47, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652005000100006>>. Acesso em: 10 maio 2017.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 2, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n2p793

O USO DE JOGOS PEDAGÓGICOS NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA

Márcia Regina Terra

Instituto de Ensino Superior de Londrina –
INESUL Londrina – Paraná

Rafaela Sterza da Silva

Mestre em Enfermagem

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu – São Paulo

Elisa Barbosa Leite da Freiria Estevão

Mestre em Ensino de Ciências e Educação
Matemática

Universidade Estadual de Londrina - Paraná

Dayanna Saeko Martins Matias da Silva

Mestre em Enfermagem

Universidade Estadual de Londrina – Paraná

Fernanda Gianelli Quintana

Especialista em Saúde Coletiva

Centro Universitário Filadélfia - Londrina – Paraná

Ednalva de Oliveira Miranda Guizi

Especialização em Educação Profissional na Área
de Saúde: Enfermagem -Fundação Osvaldo Cruz

RESUMO: Estamos em contato com os micro-organismos constantemente e esses fazem parte de nossas vidas trazendo benefícios por meio de alimentos probióticos, fármacos, entre outros, mas também são agentes etiológicos de patologias, inclusive transmitidas por alimentos. Assim, é essencial que estudantes das áreas de saúde trabalhem a importância e o impacto dos micro-organismos no mundo,

pois irão se deparar com os micro-organismos e suas implicações no ambiente profissional. Para isso, está incluso na grade curricular destes cursos a disciplina de Microbiologia, no entanto, diversos fatores como a falta de estrutura das instituições de ensino no que diz respeito a equipamentos e vidrarias, a linguagem científica, concepções equivocadas dos alunos, problemas para acompanhar o raciocínio do professor e dificuldades para o desenvolvimento de estratégias de ensino-aprendizagem mais dinâmicas e atraentes para os alunos dificultam a aprendizagem. Vários autores vêm descrevendo resultados positivos com a utilização de jogos pedagógicos como forma de reforçar conteúdo colocando em prática os conhecimentos adquiridos. No entanto, em nossa busca não foram encontrados jogos pedagógicos para serem aplicados para alunos do ensino técnico e graduação, com isso em nosso plano de ação sugerimos a adaptação de alguns jogos em relação ao grau de dificuldade para que esses possam ser aplicados para adultos como, por exemplo, o jogo “Microvilões”. Desta forma esperamos mitigar possíveis dúvidas e erros conceituais por meio da utilização de conceitos básicos ao inserir o jogo pedagógico em sala de aula.

PALAVRAS-CHAVE: educação; microbiologia; jogos educativos.

ABSTRACT: We are in contact with the micro-organisms constantly and these are part of our lives by bringing the benefits of probiotic foods, pharmaceuticals among others, but are also etiologic agents of pathogens, including foodborne. Thus it is essential that students in the areas of health study the importance and impact of micro-organisms in the world, because they will be faced with the micro-organisms and its implications in the professional environment. For this is included in the curriculum of these courses the discipline of Microbiology, however several factors such as the lack of infrastructure of educational institutions with regard to equipment and glassware, the scientific language, misconceptions of students, to track problems teacher and reasoning difficulties for the development of teaching strategies and learning more dynamic and appealing to students hinder learning. Several authors have described positive results with the use of educational games as a way of enhancing content putting into practice the knowledge acquired. However, in our quest educational games were not found to be applicable to students of technical education and graduate with that in our action plan we suggest the adaptation of some games in the degree of difficulty that these can be applied to adults as for example, the game “Microvilões”. This way we hope to mitigate possible doubts and misconceptions through the use of basic concepts to enter the game teaching in the classroom.

KEYWORDS: education; microbiology; educational games.

1 | INTRODUÇÃO

O ensino de microbiologia para os cursos de saúde é fundamental, haja visto que os micro-organismos fazem parte de nosso cotidiano seja por seus aspectos benéficos como, por exemplo, o uso de micro-organismo como probióticos, como repositores da microbiota intestinal, na produção de fármacos, na produção de alimentos fermentados como iogurtes, bebidas alcoólicas entre outros ou também devido a seus aspectos maléficos como agentes etiológicos de inúmeras patogêneses e na biossegurança. Aspectos com os quais estes profissionais, enfermeiros, irão se deparar constantemente em sua profissão.

A maior parte destes micro-organismos trata-se de seres microscópicos, sendo impossível a visualização a olho nu, também podem tratar-se de seres complexos, o que causa certa dificuldade nos educandos de perceberem a diversidade de micro-organismos que os cercam e contextualizarem a influência destes em suas vidas. Outro motivo preponderante que causa dificuldade no ensino de microbiologia é que, muitas vezes, a instituição não está totalmente preparada para a prática de procedimentos laboratoriais, pois este tem custo elevado, haja visto a necessidade de materiais como vidrarias, meios de cultura e equipamentos, inviabilizando devido a falta de recursos financeiros o ensino prático de microbiologia.

Desta forma faz-se necessário buscar alternativas metodológicas para o ensino, de forma que este seja ministrado de maneira dinâmica e atraente a fim de tornar

a aprendizagem prazerosa e significativa. No entanto, um grande desafio para os educadores é buscar meios para facilitar o processo de ensino-aprendizagem, pois este apresenta extensa nomenclatura científica e termos técnicos, como por exemplo, os nomes dos gêneros e espécies que são em latim e o nome de vidrarias.

Um dos métodos utilizados com sucesso são os jogos pedagógicos ou jogos didáticos que podem auxiliar o professor no processo de ensino e aprendizagem (JANN e LEITE 2010).

Os jogos caracterizam-se pela capacidade de absorver o participante de maneira intensa e total, em uma atmosfera de espontaneidade (CANDEIAS *et al.*, s.d.). Segundo Piaget (CANDEIAS *et al.*, s.d.) a atividade lúdica contribui para o desenvolvimento, pois propicia a descontração do indivíduo, a aquisição de regras, a expressão do imaginário e a apropriação do conhecimento.

Perante a problemática exposta, o presente estudo tem como objetivo propor a inserção de jogos pedagógicos como facilitador do processo de ensino-aprendizagem viabilizando a fixação de conhecimento e como modo de observar as dificuldades dos alunos frente ao estudo da microbiologia.

2 | PRESSUPOSTO TEÓRICO

2.1 Microbiologia e Enfermagem

Atualmente sabemos que os micro-organismos podem ser encontrados em quase todos os lugares. Há pouco tempo, antes da invenção do microscópio, os vírus, bactérias, fungos e outras formas de micro-organismos eram desconhecidas pelos cientistas. Isso acarretou epidemias devastadoras gerando milhares de mortes cujas causas não eram conhecidas (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). Por esse motivo tendemos associar os micróbios somente com situações desagradáveis, como por exemplo, a Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), tuberculose e outras doenças infectocontagiosas que eles causam. Porém esses micro-organismos que acarretam tantas infecções ao homem contribuem também de modo essencial para a manutenção e equilíbrio da saúde humana, como por exemplo, na síntese de vitaminas.

Os profissionais de enfermagem realizam suas atividades em ambientes de trabalho que concentram uma série de riscos que podem trazer diversos problemas de saúde. Silva (1996) discorre sobre o perfil de morbidade dos trabalhadores de enfermagem onde se destacam: ferimentos perfurocortantes, doenças do aparelho ósteo-músculo-articular, doenças infecciosas ou infectocontagiosas e parasitárias. Ainda sobre os riscos que os profissionais de enfermagem são submetidos, Silva (1996) classifica os riscos ocupacionais em: cargas biológicas, físicas, químicas, mecânica, fisiológicas e psíquicas. As cargas biológicas são evidenciadas pelo contato do trabalhador com pacientes portadores de doenças infecciosas, infectocontagiosas

e parasitárias; pela manipulação de material contaminado e pela presença de insetos nocivos, além do grande número de microrganismos presentes em seu ambiente de trabalho.

O ensino da microbiologia vem para fomentar o conhecimento do enfermeiro de estabelecer as relações de causa-efeito entre as situações vivenciadas no ambiente de trabalho, a exposição aos riscos biológicos que essas situações proporcionam, os problemas de saúde gerados a partir dessa exposição e promover a partir disso ações de biossegurança.

Outra situação em que se faz extremamente necessário o uso da microbiologia na atividade profissional do enfermeiro é no controle de infecções hospitalares. O Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) preconiza que o enfermeiro seja membro da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Assim é competência do enfermeiro enquanto integrante da CCIH elaborar, implementar e supervisionar a aplicação de normas e rotinas técnico-operacionais, visando limitar a disseminação de agentes presentes nas infecções em curso no hospital, por meio de medidas de precaução e de isolamento; gerenciar o uso racional de antimicrobianos, germicidas e diagnosticar e intervir no processo de infecção hospitalar (BRASIL, 1998).

Todas essas funções do enfermeiro exigem o conhecimento e domínio sobre micro-organismos e sua patogenicidade.

2.2 O ensino de Microbiologia

Os micro-organismos são seres invisíveis a olho nu e o estudo destes é tratado pela Microbiologia, área das Ciências Biológicas que tem por objeto o estudo do papel dos micro-organismos no mundo, principalmente em relação à sociedade humana, ao corpo humano e outros. A Microbiologia pode abordar dois grandes temas como os aspectos de natureza básica e aqueles de natureza prática ou aplicada, tendo esses, emergido como novas fontes de produtos e processos para o benefício da sociedade (MADIGAN et al., 2010; PELCZAR et al., 1997).

Há muito tempo a Microbiologia deixou de ser tema restrito a laboratórios para ser um tema relacionado a questões básicas de cidadania, envolvendo o meio ambiente, o cotidiano, a higiene, a maternidade, a empregada, o faxineiro, o engenheiro, o político, etc. (PRADO et al., 2004). Segundo Cassanti et al. (2008), o conhecimento da microbiologia ajuda o estudante a descobrir a influência e as funções essenciais dos micro-organismos no ambiente.

O ensino de Microbiologia tem uma peculiaridade no que se refere à necessidade de atividades que permitam a percepção de um universo totalmente novo, o universo dos micro-organismos (BARBOSA et al., 2010) estudando as bactérias (Bacteriologia), os fungos (Micologia) e os vírus (Virologia) (MALNIC; SAMPAIO, 1994).

Diversos fatores podem dificultar o ensino-aprendizagem de Microbiologia,

alguns deles são:

- A falta de equipamentos e materiais devido ao custo elevado que inviabiliza a realização de aulas práticas, sendo ministradas aulas teóricas e com pouca experimentação (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; LIMBERGER; SILVA; ROSITO, 2009; BARBOSA et al., 2010).
- Concepções equivocadas dos educandos em relação aos micro-organismos, relacionando-os somente a problemas como, por exemplo, que todos os fungos e bactérias são nocivos para os seres humanos causando doenças. Isto se deve ao fato de que, no Brasil, a mídia televisiva e impressa ressaltam informações sobre micro-organismos patogênicos (JACOBUCCI et al., 2009);
- O negligenciamento, em muitos casos, da Microbiologia pelos educadores devido a dificuldades para o desenvolvimento de estratégias de ensino-aprendizagem mais dinâmicas e atraentes aos educandos (CASSANTI et al., 2008);
- A linguagem científica utilizada pelo educador para ensinar e, em particular, o grande número de conceitos próprios das Ciências Biológicas que tem agravado o cenário de desinteresse dos educandos e aumentado a desmotivação dos educadores (PEDROSO et al., 2009);
- a dificuldade dos alunos em acompanharem o raciocínio do expositor durante o discurso, o que propicia a baixa retenção de informação levando os alunos a não formularem perguntas (KRASILCHIK, 1986 *apud* PEDROSO et al., 2009), esta dificuldade talvez esteja associada ao item acima, pois sem compreender a linguagem e os conceitos dificilmente os educandos irão reter alguma informação.

Estudos nas áreas de metodologia de ensino e de didática das ciências evidenciam a necessidade de se repensar os modos de abordagem dos conteúdos escolares, proporcionando ao aluno condições de utilizar diferentes estratégias de aprendizagem. Uma das finalidades do sistema educacional é oferecer aos futuros cidadãos capacidades de aprender, para que sejam aprendizes mais flexíveis, eficazes e autônomos (POZO et al., 2003).

Em seu estudo Freire (2004) propõe a construção de um material de ensino que dialogue com os estudantes e suas realidades para que esses estudantes apresentem pensamento e aprendizagem autônomos.

Uma das ferramentas viáveis para facilitar o processo de ensino-aprendizagem por meio de atividades lúdicas é o uso de jogos educativos, onde estudos como os de CAMPOS et al., (2003) e CANDEIAS et al., (s.d.) observaram resultados positivos.

2.3 Os Jogos

O jogo está presente no contexto social desde a antiguidade e apresentava uma forma de expressão cultural, estando inserido na civilização até mesmo nos ritos sagrados (MODESTO, 2009).

A Igreja desconhecia o seu caráter e o associava a instrumentos delituosos e sem finalidade, por esta razão, em tempos passados o jogo era visto como algo não-sério.

O jogo possui uma característica comum segundo os estudos de Huizinga (1990), Caillois (1990) e Kishimoto (1997) que é a presença ou a existência de um sistema de regras. Por meio delas é possível controlar a atuação dos participantes e criar um espaço de interação, aprendizagem e motivação, desta forma é possível contrapor a ideia equívoca de que o jogo não é uma atividade educativa e de trabalho (SANTOS; GUIMARÃES, 2010).

De acordo com as Orientações Curriculares para o Ensino Médio (BRASIL, 2006, p. 28):

“o jogo oferece o estímulo e o ambiente propícios que favorecem o desenvolvimento espontâneo e criativo dos alunos e permite ao professor ampliar seu conhecimento de técnicas ativas de ensino, desenvolver capacidades pessoais e profissionais para estimular nos alunos a capacidade de comunicação e expressão, mostrando-lhes uma nova maneira, lúdica, prazerosa e participativa de relacionar-se com o conteúdo escolar, levando a uma maior apropriação dos conhecimentos envolvidos.”

2.3.1 Tipos de Jogos

Segundo Piaget (1971) existe três tipos de jogos:

a) Jogos de exercício (nascimento a dois anos de idade): é exercitado na fase sensório-motora do desenvolvimento, tendo como função “ exercitar as condutas por simples prazer funcional ou prazer de tomar consciência de seus novos poderes. ”

b) Jogos simbólicos (dois a seis anos): fase pré-operatória com o desenvolvimento e a aquisição da linguagem e predomínio da imaginação. Nesse período que estas têm uma preferência exacerbada pelos contos de fadas, pela a imitação e pela fantasia. Por exemplo, uma cesta pode tornar-se vários artifícios da fantasia, como um cavalo, um carro, um ônibus entre outros. Assim, elas assemelham o mundo exterior ao interior, provocando o processo de assimilação.

c) Jogo de regras (seis/sete anos até o resto da vida): o jogo de regras é considerado “a atividade lúdica do ser socializado” que escapa da regressão e auxilia no auto-desenvolvimento e na construção da inteligência (xadrez, futebol, pedagógico e outros).

Em 1995 foi proposto por Grando uma classificação para os jogos de acordo com a função que estes podem exercer no contexto social e didático-metodológico. São

eles:

a) Jogos de azar – são os que envolvem propriamente a sorte, não sendo possível alterar o resultado final. São exemplos: ímpar ou par, lançamento de dados, loteria, baralho, bingo e outros.

b) Jogos de quebra-cabeça – são aqueles em que o jogador deve procurar a solução do jogo sozinho. São exemplos: probleminhas, quebra-cabeças, enigmas, caça-palavras, charadas e outros.

c) Jogos de estratégia – este não envolve a sorte e está intimamente ligado a capacidade do jogador traçar estratégias para a resolução dos problemas. São exemplos: xadrez e damas.

d) Jogos de fixação – estes são utilizados para fixar os conceitos relativos a algum conteúdo anterior. É como se fosse um substituto das cansativas listas de exercício.

e) Jogos computacionais – são os que despertam maior interesse das crianças e adolescentes por acontecerem em um ambiente computacional.

f) Jogos pedagógicos – são aqueles que podem ser utilizados durante o processo de ensino aprendizagem e envolvem todos os outros discutidos anteriormente, os jogos de azar, quebra-cabeça, estratégia e fixação.

2.3.2 Jogos Pedagógicos

O jogo antes mesmo ao século XVIII já era figurado como um processo natural que auxiliava no desenvolvimento da criança como instrumento formativo. Além de exercitar a mente, os sentidos e as aptidões, também preparavam para a vida em comum e para as relações sociais (ROBAINA, 2008, p. 15).

No entanto, segundo Kishimoto (1997), somente no período do Renascimento que o jogo começou a conquistar um diminuto espaço na educação, sendo utilizado para instaurar os princípios básicos de moral, ética e alguns conteúdos escolares. Mas, somente no Romantismo este recurso ganhou um caráter sério, onde teve seu papel destinado a educação.

No Brasil, em 1932, ocorreu o movimento denominado Manifesto da Escola Nova e os educadores apoiaram a Didactica Magna (1632) de Comenius, que aconselhava o exercício de jogos pelo seu valor informativo e com isso a utilização de jogos na educação deu-se de maneira efetiva (1932). Este movimento lutava por um sistema estatal de ensino público, livre e aberto, como único meio efetivo de combate às desigualdades sociais da nação (GUIMARÃES, 2010).

Segundo Lima (2008), Comenius foi um dos precursores da utilização de jogos pedagógicos. Em seu levantamento Miranda (2001) cita autores que propuseram unir jogo e prática educativa, tais como Rousseau, Pestalozzi, Froebel, Decroly e Claparède.

Como ferramenta pedagógica que incita e facilita o processo de ensino, o jogo

constitui uma relação afetiva entre o aluno, o professor e o conteúdo que se deseja ensinar e aprender (LIMA, 2008), possuindo o poder de modificar para os educandos aulas comuns em momentos de um ensino eficiente, criativo e prazeroso e, para os educadores propicia a diversificação de suas aulas, tornando-as mais interessantes, criativas e desafiadoras (ROBAINA, 2008).

Segundo Robaina (2008):

O ser que brinca e joga é também o ser que age, sente, pensa, aprende e se desenvolve, dessa forma podemos compreender os jogos pedagógicos como meio para se adquirir determinados conhecimentos, praticar certas habilidades cognitivas e para aplicar algumas operações mentais ao conteúdo fixado.

Propiciar o envolvimento do educando e garantir sua concentração em atividades de sala e extraclasse é um desafio para educadores. Os jogos educativos se destacam como eficientes ferramentas envolventes e estimulantes, promotores de aquisição/reforço de conceitos e de situações desafiantes, que exigem criatividade, estratégia e aquisição/utilização de conhecimento para alcançar um objetivo lúdico, como ganhar o jogo, cumprir tarefas, construir alguma coisa, resolver um mistério, entre outros (MORIN, 2005a; MORIN, 2005b; TOSCANI et al., 2007). Eles vêm sendo empregados com sucesso dentro e fora da sala de aula, com públicos de qualquer idade e escolaridade (SCHALL et al., 1999).

Alguns autores defendem o uso do jogo na escola, justificando que o jogo favorece o aprendizado pelo erro e estimula a exploração e resolução de problemas, pois como é livre de pressões e avaliações, cria um clima adequado para a investigação e a busca de soluções (KISHIMOTO, 2017), observado como uma das atividades dentro de uma sequência definida de aprendizagens e como instrumento para se alcançar determinados objetivos educacionais, sendo uma alternativa viável e promissora, podendo ser sintetizados com materiais que fazem parte do ambiente de sala de aula ou que recicláveis e de fácil execução, já que não necessitam de uma estrutura especial para sua aplicação, pois a própria sala de aula presta-se muito bem a esse fim (ROBAINA, 2008).

Deve-se considerar “o aprendizado do educando durante a atividade, apesar de um desempenho insatisfatório durante a aplicação do jogo, haja visto que o jogo não tem o peso de uma avaliação “formal” o educando tem a liberdade de arriscar as respostas, o que pode confirmar sua suspeita ou esclarecer alguma dúvida sobre o conteúdo” (ROBAINA, 2008).

Fialho (s.d., p. 1) afirma que:

Uma aula mais dinâmica e elaborada requer também mais trabalho por parte do professor; por outro lado, o retorno pode ser bastante significativo quando o docente se dispõe a criar novas maneiras de ensinar, deixando de lado a “mesmice” das aulas rotineiras e ressalta a importância da utilização dos jogos no processo de ensino e aprendizagem, como instrumentos motivadores de imenso potencial de

2.3.3 O Uso de Jogos didáticos para o ensino de microbiologia

Segundo Skinner (1980), a aprendizagem é uma mudança de comportamento (desenvolvimento de habilidades ou mudanças de atitudes) que decorre como resposta a estímulos externos, controlados por meio de reforços. A microbiologia, nesta perspectiva, é vista, muitas vezes, como um conjunto de conceitos, técnicas e regras que os acadêmicos têm de dominar para compreender a microbiologia e assim aplicá-la no processo saúde-doença.

Neste sentido, os jogos pedagógicos, seriam mais valorizados que os materiais concretos. Eles podem ser usados com a finalidade de despertar o interesse do acadêmico, neste caso deve ser aplicado no início ou final de um novo conteúdo, com o objetivo de fixar a aprendizagem e reforçar o desenvolvimento de atitudes e habilidades.

Para Irene Albuquerque (1953) o jogo didático "... serve para fixação ou treino da aprendizagem. É uma variedade de exercício que apresenta motivação em si mesma, pelo seu objetivo lúdico... Ao fim do jogo, o aluno deve ter treinado algumas noções, tendo melhorado sua aprendizagem" (p. 33).

Foi pesquisado na *web* a existência de jogos educativos voltados para o estudo de microbiologia disponíveis para *download* gratuito. Para isso, a metodologia utilizada foi a de pesquisa documental e por entender o jogo didático como uma mídia impressa e também como ferramenta midiática.

Foi analisado quais destes jogos possuem maior potencial para serem adaptados de forma a serem utilizados como ferramentas para o superior. Assim foi observado:

- o tipo do jogo conforme estabelecido por Piaget (1971);
- o tipo de jogo conforme estabelecido por Grandó (1995); e
- o conteúdo do jogo.

Durante a pesquisa foram selecionados os seguintes jogos:

- "MicroMundo" disponível em http://www.icb.usp.br/~bmm/jogos/intro_mm.html
- "MicroZoom" disponível em http://www.icb.usp.br/~bmm/jogos/intro_mz.html
- "Microvilões" disponível em http://www.icb.usp.br/~bmm/jogos/intro_mv.html
- "Ponto Crítico" disponível em http://genoma.ib.usp.br/educacao/materiais_didaticos_jogos_Ponto_Critico.html

A figura 1, ilustrativa do jogo didático “MicroMundo”, traz o conceito de célula microbiana e suas correspondentes organelas e estruturas em cartas tipo baralho. Nesse jogo são feitas perguntas de forma a classificar os micro-organismos conforme suas características morfológicas, estruturais e fisiológicas a fim de enquadrá-los nos reinos: Monera, Fungi e Protista, contemplando também os vírus. Quando a equipe ou jogador entende que já sabe o nome do micro-organismo, diz este nome; vence o jogo a equipe ou o jogador que descobrir o nome da figura que esta na mão do opositor.



Figura 1: Ilustração do Jogo MicroMundo. 2018.

Fonte: Projeto MicroTodos: microbiologia a serviço da cidadania.

A figura 2, ilustrativa do jogo “MicroZoom”, trata de um jogo de memória onde as figuras trazem algumas doenças como, por exemplo, o tétano e a raiva. Por meio de um texto de apoio, os jogadores podem obter respostas para perguntas que emergem do ato de jogar. Este tem como objetivo completar a sequência de cartas para se conhecer a doença sobre a qual esta trata e completar o maior número de sequências conhecendo assim as doenças abordadas pelo jogo.



Figura 2: Ilustração do Jogo MicroZoom. 2018.

Fonte: Projeto MicroTodos: microbiologia a serviço da cidadania.

A figura 3 é ilustrativa do jogo “Microvilões” que visa introduzir conceitos acerca dos micro-organismos patogênicos e respectivas doenças, formas de transmissão dos agentes etiológicos e medidas de prevenção das doenças. Assim, esse jogo propicia o trabalho dos conceitos de higiene, saneamento, poluição, vacinas, infecção hospitalar, saúde, doenças sexualmente transmissíveis, mecanismos de defesa do organismo e preservação do ambiente como forma de prevenção de doenças emergentes.



Figura 3: Ilustração do Jogo MicroVilões. 2018.

Fonte: Projeto MicroTodos: microbiologia a serviço da cidadania.



Ponto Crítico

Um jogo
de
Investigação Alimentar

A figura 4, por sua vez, ilustra o jogo “Ponto Crítico”. Esse jogo estratégico de tabuleiro objetiva descobrir o responsável pela contaminação alimentar, onde ela ocorreu e qual a ação que a ocasionou. Cada aluno é um investigador cuja missão é desvendar um caso de contaminação alimentar ocorrida na cidade fictícia de Sievi. Desta forma, o jogo conscientiza os educandos sobre a importância da contaminação dos alimentos durante seu preparo e/ou seu consumo e a responsabilidade do indivíduo nesta relação. A investigação é realizada ao longo da partida com indagações e palpites emitidos pelos jogadores. As respostas aos palpites permitem, por um processo de

eliminação de possibilidades, que cada jogador descubra as incógnitas propostas pelo jogo. Ganha o jogo o quem primeiro descobrir as três incógnitas: o responsável pela contaminação (QUEM), o local onde ela ocorreu (ONDE) e a ação que levou à contaminação (PORQUÊ).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho, ao pesquisar jogos didáticos sobre microbiologia para ser aplicado na graduação, não encontrou disponível nenhum jogo voltado para essa clientela. Desta forma o jogo deveria ser criado, inspirado ou adaptado a partir de outros.

Mesmo perante as dificuldades encontradas, é válido que em um contexto inserimos o jogo pedagógico como forma de reforço do conteúdo e também de observar as dificuldades dos alunos, tornando as aulas mais dinâmicas e motivando os alunos a estudarem Microbiologia por meio da contextualização do conteúdo com sua área de estudo.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Irene de. Metodologia da Matemática. Rio de Janeiro: Ed. Conquista, 1953, p.33.

BARBOSA, Flávio Henrique Ferreira; BARBOSA, L. P. J. L. Alternativas Metodológicas em Microbiologia: viabilizando atividades práticas. Revista de Biologia e Ciências da Terra. v. 10, n. 2 – 2º semestre 2010.

BRASIL - Portaria nº 2616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616-98.htm>. Acesso em: 29 junho 2016.

CAILLOIS, Roger. Os jogos e os homens: a máscara e a vertigem. Tradução de José Garcez Palha. Lisboa: Cotovia, 1990. Disponível em: <http://www.luckesi.com.br/artigoseducacaoludicidade.htm>. Acesso em: 15 junho 2016.

CAMPOS, Luciana Maria Lunardi; BORTOLOTO, Tânia Mara; FELÍCIO, Ana Karina C. A produção de jogos didáticos para o ensino de ciências e biologia: uma proposta para favorecer a aprendizagem. Caderno dos núcleos de Ensino, v. 3548, 2003.

CANDEIAS, João Manuel Grisi; HIROKI, Kátia Aparecida Nunes; CAMPOS, Luciana Maria Lunardi. A utilização do jogo didático no ensino de microbiologia no ensino fundamental e médio. São Paulo, 2007.

CASSANTI, Ana Cláudia et al. Microbiologia democrática: estratégias de ensino-aprendizagem e formação de professores. Enciclopédia Biosfera, v. 8, p. 1-23, 2008.

FIALHO, Neusa Nogueira. Os jogos pedagógicos como ferramentas de ensino. Disponível em: www.pucpr.br/eventos/educere2008/anais/pdf/293_114.pdf Acesso em 20 junho 2016.

FREIRE, Paulo. Pedagogia da Autonomia: saberes necessários à prática educativa. 29. ed. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 2004.

- GRANDO, Regina Celia. O jogo e suas possibilidades metodológicas no processo ensino-aprendizagem da matemática, 1995. Dissertação (Mestrado em Educação, subárea: Matemática). UNICAMP-Campinas.
- HUIZINGA, Johan. Homo Ludens. Tradução de João Paulo Monteiro. 4. ed. São Paulo: Ed. Perspectiva, 2000.
- JACOBUCCI, Daniela Franco Carvalho; JACOBUCCI, Giuliano Buzá; MEGID NETO, Jorge. Experiências de formação de professores em centros e museus de ciências no Brasil. Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias, v. 8, n. 1, p. 118-136, 2009.
- KISHIMOTO, Tizuco Morchida Cortez. Jogo, brinquedo, brincadeira e a educação. São Paulo: Cortez, 2017.
- KRASILCHIK, Myriam. Prática de Ensino de Biologia. 2 ed. São Paulo: Harper e How do Brasil, 1986.
- LIMA, José Milton. O jogo como recurso pedagógico no contexto educacional. – São Paulo : Cultura Acadêmica : Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 2008.
- LIMBERGER, Karen Martins; SILVA, Renata Medina da; ROSITO, B. A. Investigando a contribuição de atividades experimentais nas concepções sobre microbiologia de alunos do ensino fundamental. SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PUCRS, v. 10, 2009.
- MICHAEL, T. Mandingan; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. Microbiologia de Brock. Tradução e revisão técnica Cynthia Maria Kiaw. 2004.
- MALNIC, Gerhard; SAMPAIO, Magda Carneiro. O ensino das ciências básicas na área da Saúde. *Estud. av.*, v.8, no.22, 1994.
- BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Básica. Orientações Curriculares para o Ensino Médio: Ciências da natureza, matemática e suas tecnologias. Brasília: MEC/SEB, 2006. p 25.
- MIRANDA, Simão de. Do fascínio do jogo à alegria do aprender nas séries iniciais.1. ed., Campinas: Papirus, 2001, 110p.
- MODESTO, Roberta Duarte de Lima. O lúdico como processo de influência na aprendizagem da Educação Física. 2009. 56f. Infantil (Monografia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- MORIN, Edgar. A cabeça bem-feita: repensar a reforma, reformar o pensamento. 11ª edição. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2005a, 128p.
- MORIN, Edgar. Os sete saberes necessários à educação do futuro. 10ª edição. São Paulo: Cortez Editora, 2005b, 116p.
- JANN, Priscila Nowaski; LEITE, Maria de Fátima. Jogo do DNA: um instrumento pedagógico para o ensino de ciências e biologia. *Ciências & Cognição*. v. 15, p. 282-293, 2010.
- PEDROSO, Carla Vargas. Jogos didáticos no ensino de biologia: uma proposta metodológica baseada em módulo didático. In: ANALES DE IX CONGRESSO NACIONAL DE EDUCAÇÃO (EDUCERE) & III ENCONTRO SUL BRASILEIRO DE PSICOPEDAGOGIA. 2009. p. 3182-3190.
- PELCZAR, Michael J. et al. Microbiologia: conceitos e aplicações. v. 2. São: Makron Books, 1997.
- PIAGET, Jean. A formação do símbolo na criança: imitação, jogo e sonho, imagem e representação. Zahar, 1971.

POZO, Juan I. Aprendizagem de conteúdos e desenvolvimento de capacidades no ensino médio. In: Coll, César et.al. Psicologia da aprendizagem no Ensino Médio. Rio de Janeiro: Editora. 2003.

DO PRADO, Izabela A. de Carvalho; TEODORO, Guilherme Rodrigues; KHOURI, Sonia. Metodologia do ensino de microbiologia para ensino Fundamental e Médio. In: VII encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV encontro Latino Americano de Pós-graduação. Universidade do Vale do Paraíba. 2004. 127-129p.

ROBAINA, José Vicente Lima. Química através do lúdico: brincando e aprendendo, Canoas: Ed. Ulbra, 2008, 480p.

DOS SANTOS, Aline Borba; GUIMARÃES, Carmen Regina Parissoto. A utilização de jogos como recurso didático no ensino de zoologia. Revista electrónica de investigación en educación en ciencias, v. 5, n. 2, p. 52-57, 2010.

SCHALL, Virgínia T. et al. Evaluation of the ZIG-ZAIDS game: an entertaining educational tool for HIV/ Aids prevention. Cadernos de Saúde Pública, v. 15, p. S107-S119, 1999.

SILVA, Vanda Elisa Felli da. O desgaste do trabalhador de enfermagem:- relação trabalho de enfermagem e saúde do trabalhador. [Tese] São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 1996.

SKINNER, Burrhus Frederic. (1980). *Contingências do reforço: uma análise teórica* - Coleção Os Pensadores (R. Moreno, Trad.). São Paulo: Abril Cultural. (Trabalho original publicado em 1969).

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

TOSCANI, Nadima Vieira et al. Fantastic animals as na experimental model to teach animal adaptation. BMC Evolutionary Biology, 7 (Supl. 2): S13. 2007. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/S2/S13>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

Bruno Oliveira de Veras

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Antióbticos, Recife-
Pernambuco.

Katharina Marques Diniz

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento Bioquímica, Recife-Pernambuco.

Fernanda Granja da Silva Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento Bioquímica, Recife-Pernambuco.

Maria Betânia Melo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento Bioquímica, Recife-Pernambuco.

Alexandre Gomes da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento Bioquímica, Recife-Pernambuco.

Márcia Vanusa da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento Bioquímica, Recife-Pernambuco.

RESUMO: Presente nas políticas públicas nacionais, o controle de infecção nosocomial é foco dentro do programa nacional de segurança do paciente, sendo crescente a preocupação com o bem-estar e a saúde. No entanto, a alta prevalência e incidência de infecções associadas a hospitais que pode acometer estes indivíduos, tem se tornando cada vez mais frequente e crescente. Diversos estudos realizados, mostram que é preocupante o

número de isolados clínicos associados a infecções nosocomial que apresentam genes de resistência a multidrogas, sendo responsáveis por um alto índice de mortalidade. No entanto, é escasso as informações quanto ao perfil epidemiológico das infecções adquiridas, limitando a implementação de políticas públicas de controle destas infecções. Sendo assim, faz-se necessário a realização de estudos de investigação molecular epidemiológica da disseminação clonal de patógenos multirresistentes para obtenção de dados cruciais na identificação e caracterização de genótipos prevalentes, direcionando a realização de condutas para diminuição da incidência de infecções associadas e contribuindo para vigilância à saúde e clínica.

PALAVRAS-CHAVE: Infecção, Perfil Epidemiológico, Câncer.

ABSTRACT: Present in national public policies, nosocomial infection control is a focus within the national patient safety program, with increasing concern for well-being and health. However, the high prevalence and incidence of hospital-associated infections that can affect these individuals has become increasingly frequent and increasing. Several studies have shown that the number of clinical isolates associated with nosocomial infections that present multidrug resistance genes is of concern and

are responsible for a high mortality rate. However, there is little information on the epidemiological profile of acquired infections, limiting the implementation of public policies to control these infections. Thus, it is necessary to carry out epidemiological molecular investigation studies of the clonal dissemination of multiresistant pathogens to obtain crucial data in the identification and characterization of prevalent genotypes, directing the conduct of ducts to reduce the incidence of associated infections and contributing to surveillance health and clinical practice.

KEYWORDS: Infection, Epidemiological Profile, Cancer.

1 | INTRODUÇÃO

O Câncer é uma doença crônico-degenerativa, caracterizada pelo crescimento celular anormal, que pode invadir tecidos adjacentes e tecidos distintos, sendo responsável pela segunda causa de morte no Brasil e no mundo. Dados levantados pela International Agency for Research on Cancer (IARC), apontam que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, e que seu impacto na população mundial corresponda a mais de 29 milhões de casos novos estimados para 2040, sendo aproximadamente 1 milhão só no Brasil (Figura 1) (WHO, 2018). No país, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima a ocorrência de cerca de 600 mil casos de câncer em 2018, tendo como maior prevalência o câncer de próstata (INCA, 2018).

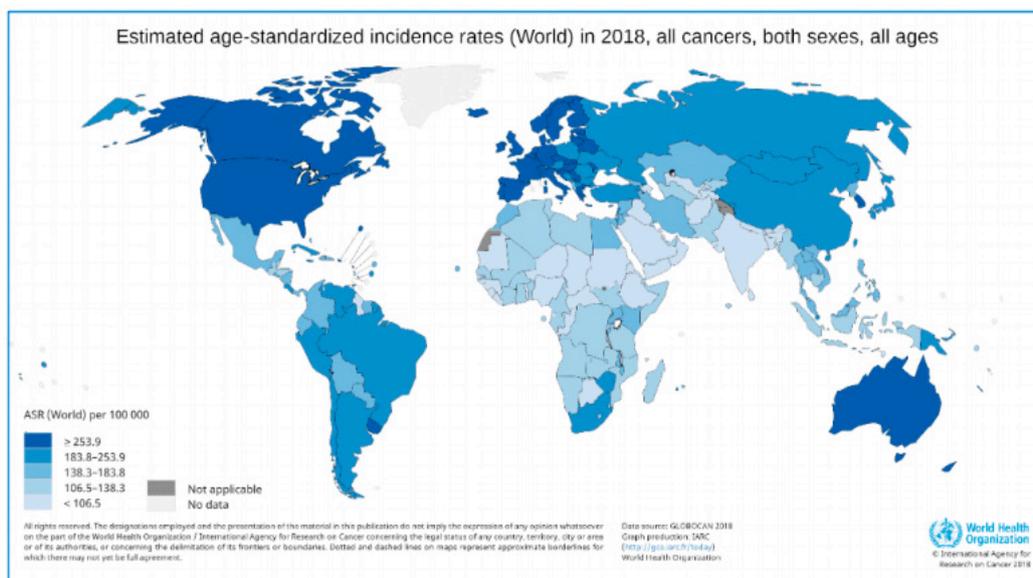


Figura 1. Estimativas de incidência de câncer no mundo em 2018.

Após a confirmação do diagnóstico do câncer, os pacientes acometidos pela neoplasia necessitam de cuidados especializados, em alguns casos por um período prolongado em ambiente hospitalar, utilizando diversas formas de tratamentos, como cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico, entretanto, estes podem atuar induzindo

na redução dos mecanismos de defesa do paciente, como a contagem de neutrófilos (neutropenia), por exemplo. Diante desta vulnerabilidade, os pacientes com câncer apresentam uma maior susceptibilidade às infecções relacionadas à assistência em saúde, denomina IRAS (MASCHMEYER; HAAS, 2008).

As IRAS, também cognominada de infecção nosocomial ou hospitalar, são reconhecidas como um evento contraditório, frequente a realização aos cuidados em saúde, gerando impactos negativos pelos elevados números de mortes, impactos sociais e econômicos, atingindo diversos sistemas de saúde, populações e países, sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma epidemia silenciosa, emergindo como um dos maiores desafios da medicina atual, checando a uma prevalência de 15,5 % em países em desenvolvimento e entre 4,5 e 7,1% em países desenvolvidos dos casos de infecções (PINA et al., 2010; DAVIN-REGLI; PAGÃO, 2015).

2 | INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)

A obtenção das IRAS é influenciada por diversos fatores, tais como: *status* imunológico, idade, procedimentos invasivos, uso abusivo de antibióticos e falhas nos procedimentos de controle (PELEG; HOOPER, 2010; ROSENTHAL et al., 2012). No ambiente hospitalar, infecções provocadas por microrganismos multirresistentes a drogas, apresentam notoriamente um sério desafio terapêutico e um grave problema de saúde pública, sendo essencial a seleção do antimicrobiano apropriado para iniciar o tratamento dessas infecções e medidas de controle, a fim de minimizar ou extinguir estas infecções (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

As bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae estão entre os principais causadores de infecções nosocomial, sendo relatado o surgimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes (GISKE et al., 2011; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). A alta incidência de infecções nosocomiais por Enterobactérias, vem despertando grande atenção nos órgãos governamentais de diversos países. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ressaltou que a equipe multidisciplinar deve estar mais atenta às ações de prevenção e controle desses microrganismos para redução de agravos à saúde, sendo necessário que os profissionais tenham conhecimento sobre as diversas condições que favorecem o desenvolvimento de infecções nosocomiais por esses microrganismos, reduzindo as taxas de mortalidade e disseminação dos patógenos (ANVISA, 2013).

3 | PERFIL DE BÁCTERIAS ASSOCIADAS A IRAS EM PACIÊNTES ONCOLÓGICOS

De acordo com o “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” infecções relacionadas à assistência em saúde por *Enterobacter* spp. correspondem a mais de 75% dos casos relatados, destacando-se: *Enterobacter cloacae* (7%), *Acinetobacter baumannii* (8%), *Klebsiella pneumoniae* (17%), *Escherichia coli* (19%) e *Pseudomonas aeruginosa* (30%) (RIBEIRO et al., 2013; TUON et al., 2015). Um fator determinante nas infecções nosocomiais por *Enterobacter*, está na capacidade de resistência a mais de um grupo de antibióticos como a produção de metalo- β -lactamases (M β L), β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases do tipo KPC, sendo crescente o número de relatos de surgimento de novas bactérias com características de resistência a esta classe de antibióticos (Figura 2) (WHO, 2014; JÁCOME et al., 2016; SILVA JÚNIOR et al., 2017). *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. are three of the pathogens most frequently involved in infections of cancer patients, and the production of β -lactamases is a major mechanism of resistance due to its wide diversity of existing enzymes. Therefore, the aim of the present study was to investigate the microbiological profile and data related to patients and infections, and to search for β -lactamase genes in bacterial isolates from hospitalized cancer patients in a hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. A total of 169 isolates were recovered between 2012 and 2014, of which 58 were *P. aeruginosa*, 36 were *Acinetobacter* spp. and 75 were *Klebsiella* spp. A high percentage of carbapenem resistance was observed in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Among the carbapenem-resistant bacteria, the bla_NSPM-1 gene was detected in *P. aeruginosa* (35.5%).

O surgimento de cepas resistentes a beta-lactamases causando infecção nosocomial, tem se tornado uma séria preocupação, especialmente em pacientes com câncer, sendo conduzidos diversos estudos afim de elucidar um perfil epidemiológico desta, no entanto, estes focalizam apenas alguns tipos de infecções que acometem pacientes neoplásicos, como as infecções da corrente sanguínea, infecções do trato respiratório e infecções do trato urinário, não analisando a prevalência geral de infecções em pacientes com câncer (KAMBOJ; SEPKOWITZ, 2009; CUSTOVIC et al., 2014).

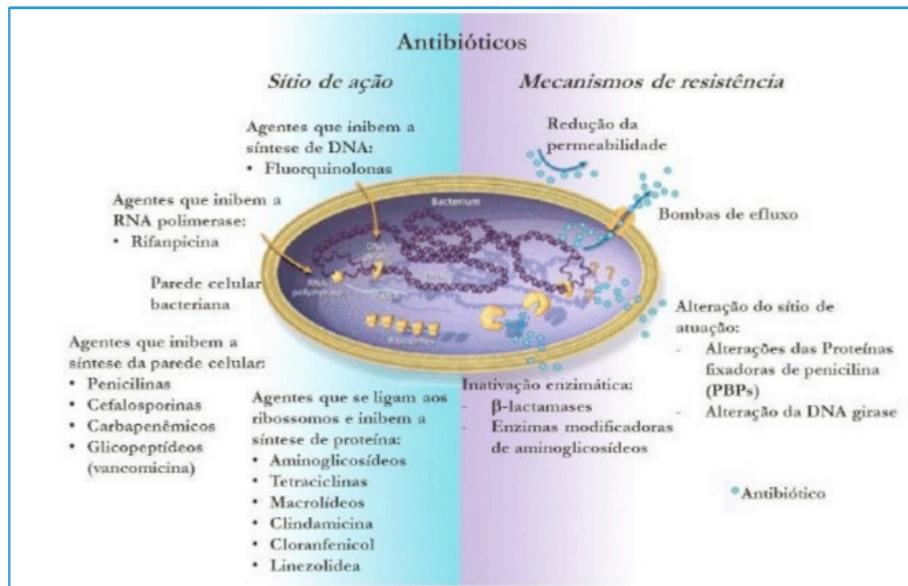


Figura 2. Possíveis mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Fonte: Mulvey; Simor, 2009.

A bacteremia nosocomial é uma das principais causas de fatalidades em pacientes oncológicos, sendo observado alterações significativas no espectro de microrganismos isolados de pacientes com câncer nos últimos anos, em sua maioria devido à presença de bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., beta-lactamases (IRFAN et al., 2008; WU et al., 2012; HCP, 2016; CHANG-PAN et al., 2018), no entanto, é necessário observar os fatores de risco associados a agentes infecciosos específicos e a compreensão de cada fator de risco individual, sendo o monitoramento antimicrobiano essencial para o tratamento das infecções em cada hospital e a condição do paciente ligada ao potencial patogênico do microrganismo (AREGA et al., 2017).

Nurain" id: "ITEM-1", "issue": "12", "issued": {"date-parts": [{"2015", "12"}]}, "page": "1055-1059", "title": "The frequency and antimicrobial resistance patterns of nosocomial pathogens recovered from cancer patients and hospital environments", "type": "article-journal", "volume": "5", "uris": [{"http://www.mendeley.com/documents/?uuid=e9bd2c35-023d-3d3a-ab08-2d6ca85b132d"}], "mendeley": {"formattedCitation": "(NURAIN; BILAL; IBRAHIM, 2015 et al. (2015) analisando infecções em pacientes oncológicos e não oncológicos, concluíram que a incidência de infecções nosocomiais em pacientes oncológicos é de 48%, sendo verificado a prevalência de infecção por *P. aeruginosa* (21%) nesses pacientes, e 11,5% em pacientes não oncológicos, respectivamente. No entanto, foi verificado uma sobreposição de genes de resistência a beta-lactâmicos em pacientes não neoplásicos por *P. aeruginosa* (37,5%), quando comparado aos isolados de pacientes neoplásicos (32,9%), respectivamente. Wang et al. (2017) avaliaram isolados de pacientes oncológicos neutropenicos e concluíram que este grupo apresenta uma taxa de infecção de 54,4% por bactérias Gram-negativa, sendo prevalentemente *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Jácome et al. (2016) concluíram que

pacientes com tumores sólidos apresentam uma maior taxa de infecção nosocomial por *K. pneumoniae* (44%), no entanto, o perfil de sensibilidade dos isolados demonstrou que o maior índice de resistência a antibióticos foi de *P. aeruginosa* (53,4%), sendo detectado em 35% destes isolados, genes que conferem resistência a beta-lactâmicos. Arega et al. (2017) encontraram bactérias saprófitas como causadoras de infecções nosocomiais, consistindo predominantemente *Aeromonas hydrophilia* (30,8%) e *Pseudomonas fluorescens* (15,4%), sendo 89% dos isolados resistentes a beta-lactâmicos. Fan et al (2018) concluíram que a maior taxa de infecção nosocomial em pacientes oncológicos tem como causa principal *E. coli* (22%), *K. pneumoniae* (16%) e *A. baumannii* (10%), entretanto, apesar apresentar uma baixa taxa em relação aos demais, *A. baumannii* vem apresentando crescente ameaça, sendo duplicado número de casos acometidos por este patógeno nas ultimas cinco décadas.

Os diversos estudos apontam que o perfil epidemiológico de infecções nosocomiais em pacientes com câncer pode apresentar divergências entre os patógenos causadores, estando relacionado a múltiplos fatores, como diferença entre hospitais, regiões, perfil das neoplasias, tipos de procedimentos, ala de internação (COSTA et al., 2015).

4 | CONCLUSÕES

Apesar de serem encontrados divergência das infecções nosocomiais em pacientes oncológicos sobre os patógenos causadores, ocorre uma prevalência de espécies bacterianas pertencentes a família Enterobacteriaceae, representadas majoritariamente pelos gêneros *Klebsiella* sp. e *Acinetobacter* sp., multirresistente a antibióticos, sendo necessário a realização de estudos que associe a prevalência destes gêneros por esse público.

REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. NOTA TÉCNICA Nº 01/2013 – **Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multirresistentes**. Brasília, 2013.

AREGA, B.; WOLDE-AMANUEL, Y.; ADANE, K.; BELAY, E.; ABUBEKER, A.; ASRAT, D. Rare bacterial isolates causing bloodstream infections in Ethiopian patients with cancer. **Infectious Agents and Cancer**. v.12, p.40, 2017.

CHANG-PAN, L.; TSUNG-TA, C.; YUAG-MENG, L.; SHU-CHEN, K.; YA-SUNG, Y.; YI-TZU, L.; TE-LI, C.; SHOU-CHUAN, S.; YEAYUAN, C.; YUAG-MENG, L.; SHU-CHEN, K. CHANG-PAN, L.; TE-LI, C.; YI-TZU, L.; YA-SUNG, Y.; A multicenter study on clinical characteristics of *Acinetobacter* bacteremia in patients with liver cirrhosis. **Journal of Microbiology**. v.18, p. 30070-7, 2018.

CUSTOVIC, A.; SMAJLOVIC, J.; HADZIC, S.; AHMETAGIC, S.; TIHIC, N.; HADZAGIC, H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. **Materia socio-medica**, v. 26, n. 1, p. 7–11, 2014.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*: versatile bacterial

pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. v.6, p. 392, 2015.

FAN, L.; WANG, Z.; WANG, Q.; XIONG, Z.; XU, Y.; LI, D.; ZOU, S. Increasing rates of *Acinetobacter baumannii* infection and resistance in an oncology department. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. v.14, p.68-71, 2018.

GISKE, C.G.; GEZELIUS, L.; SAMUELSEN, Ø.; WARNER, M.; SUNDSFJORD, A.; WOODFORD, N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*. v.17, n.4, p.552-560, 2011.

HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO. Relatório de Atividades, 2016. [acessado em 26 de outubro de 2018]. Disponível em: <<http://hcp.org.br/images/publicacoes-oficiais/HCP/relatorio-2016-hcp-revisado.pdf>>

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 6 out. 2018.

IRFAN, S.; IDREES, F.; MEHRAJ, V.; HABIB, F.; ADIL, S.; HASAN, R. Emergence of Carbapenem resistant Gram negative and vancomycin resistant Gram-positive organisms in bacteremic isolates of febrile neutropenic patients: a descriptive study. *BMC Infectious Diseases*. v.8, p.80, 2008.

JÁCOME, P.R.L.A.; ALVES, L.R.; JÁCOME-JÚNIOR, A.T. SILVA, M.J.B.; LIMA, J.L.C.; ARAÚJO, P.S.R.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Detection of bla SPM-1, bla KPC, bla TEM and bla CTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 7, p. 658–665, 2016.

KAMBOJ, M.; SEPKOWITZ, K. A. Nosocomial infections in patients with cancer. *The Lancet Oncology*.v. 10, n. 6, p. 589–97, 2009.

KHALILZADEGAN, S.; KHALILZADEGAN, S.; SADE, M.; GODARZI, H.; ESLAMI, G.; HALLAJZADE, M.; FALLAH, F.; YADEGARNIA, D. Beta-Lactamase Encoded Genes blaTEM and blaCTX Among *Acinetobacter baumannii* Species Isolated From Medical Devices of Intensive Care Units in Tehran Hospitals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 9, n. 5, p. e14990, 2016.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 31, n. (3), p: 193-197, 2008.

NURAIN, A. M.; BILAL, N. E.; IBRAHIM, M. E. The frequency and antimicrobial resistance patterns of nosocomial pathogens recovered from cancer patients and hospital environments. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v. 5, n. 12, p. 1055–1059, 2015.

PATEL, J. B.; RASHEED, J. K.; KITCHEL, B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 31, n. 8, p. 55–62, 2009.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of medicine*, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2010.

PINA, E.; FERREIRA, E.; MARQUES, A.; MATOS, B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. v. 10, p. 27–39, 2010.

RIBEIRO, V.B.; ANDRADE, L.N.; LINHARES, A.R.; BARIN, J.; DARINI, A.L.; C.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.1721-1727, 2013.

ROSENTHAL, V.D.; BIJIE, H.; MAKI, D.G.; MEHTA, Y.; APISARNTHANARAK, A.; MEDEIROS, E.A. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American Journal of Infection Control**. v. 40, n.5, p.396-407, 2012.

SILVA JÚNIOR, V.V.; FERREIRA, L.D.; ALVES, L.R.; CABRAL, A.B.; JÁCOME, P.R.L.A.; ARAÚJO, P.S.R.; LOPES, A.C.S.; MACIEL, M.A.V. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla GES-1 and bla GES-11 in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764–768, 2017.

TUON, F.; SCHARF, C.; ROCHA, J.; CIESLINSK, J.; BECKER, G.; AREND, L. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 324–327, 2015.

WANG, C.; CAI, P.; CHANG, D.; MI Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, n. 6, p. 1261–1262, 2006.

WANG, L.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, H. Characteristics of nosocomial infection and its effects on the survival of chemotherapy patients with advanced non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**. v. 14, p.7379-7383, 2017.

WEISBURG, W.; BARNES, S.; PELLETIER, D.; LANE, D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva. 2014**. Disponível em: <<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

WU, H.S.; KUO, S.C.; LEE, Y.T.; YANG, Y.S.; CHENG, S.S.; CHEN, T.L.; FUNG, C.P. Clinical characteristics and prognostic factors of *Acinetobacter* nosocomialis bacteraemia in patients with solid tumours. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. E373–E376, 2012.

PERSISTÊNCIA DE BLASTOSPOROS DE *Metarhizium anisopliae* VISANDO O CONTROLE DE LARVAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Simone Azevedo Gomes

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro/ Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ.

Aline Teixeira Carolino

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro/ Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ.

Josiane Pessanha Ribeiro

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro/ Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ.

Thais Berçot Pontes Teodoro

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro/ Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ.

Richard Ian Samuels

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro/ Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, Campos dos Goytacazes-RJ.

RESUMO: O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é transmissor de vírus que causam a febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika. Conídios e blastosporos de fungos entomopatogênicos podem ser utilizados para o controle do mosquito. Blastosporos são esporos infectivos normalmente produzidos na hemolinfa de insetos após a penetração do fungo pelo tegumento. Os blastosporos também podem ser produzidos em laboratório

a partir de conídios utilizando meio de cultura específico. O objetivo desse trabalho foi investigar a persistência da virulência de blastosporos do fungo *Metarhizium anisopliae* (Isolado LEF 2000) contra larvas oriundas do campo, adicionadas a uma suspensão do fungo imediatamente após o preparo da formulação de blastosporos (0 horas) e após 3, 6, 9 e 12 dias. Os resultados demonstraram a ação infectiva dos blastosporos por um período de 12 dias com 46,2% de sobrevivência das larvas tratadas. Após o sexto dia foi possível verificar a presença de conídios na água originados dos blastosporos, o que poderia ter contribuído para a mortalidade das larvas.

PALAVRAS-CHAVE:

Fungos entomopatogênicos, vírus, dengue e Zika.

ABSTRACT: The mosquito *Aedes aegypti* is the vector of viruses that cause urban yellow fever, dengue, chikungunya and Zika. Conidia and blastospores of entomopathogenic fungi can be used in vector control programs. Blastospores are infective cells that are normally produced in insect hemolymph after fungi penetration of the integument. In the laboratory, blastospores can also be produced using specific culture media. The propose of this study was to investigate the persistence and virulence of blastospores of the fungus *Metarhizium anisopliae* (isolate LEF 2000) against larvae from natural populations.

The larvae were exposed to fresh prepared blastospores suspensions (0 hour) and after 3, 6, 9 and 12 days. The results showed that blastospores maintained infectiveness for over 12 days, with 46.2% larvae survival at that time. After six days, the presence of conidia produced by the blastospores could be observed. This fact may have contributed to larvae mortality.

KEYWORDS: Entomopathogenic fungi, virus, dengue and Zika.

1 | INTRODUÇÃO

A diminuição da população de vetores é o método mais eficaz para reduzir doenças transmitidas por mosquitos (LUZ et al., 2008), e produtos naturais derivados de plantas e microrganismos têm sido utilizados como alternativa aos inseticidas convencionais (QUESADA-MORAGA et al., 2006). Trabalho realizado por Gomes et al. (2015) demonstrou a virulência do óleo vegetal de Nim (*Azadirachta indica*) contra larvas de *A. aegypti*. Fungos entomopatogênicos também são eficientes no controle de larvas (PEREIRA et al., 2009) e mosquitos adultos (CAROLINO et al., 2014; PAULA et al., 2008) da espécie *A. aegypti*.

A infecção de insetos com fungos entomopatogênicos ocorre através de uma série de eventos que vão desde a adesão dos conídios, germinação, penetração, crescimento e proliferação dentro do corpo do hospedeiro, a interação com mecanismos de defesa do inseto e, finalmente morte do hospedeiro (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1995). Após a penetração do fungo através do tegumento do inseto, as hifas crescem e ao atingirem a hemolinfa dão origem a hifas do tipo levedura unicelular (blastosporos) que tem a capacidade de circular livremente dentro da hemolinfa e explorar rapidamente os tecidos do hospedeiro (WANCHOO et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi investigar a persistência da virulência de blastosporos do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (Isolado LEF 2000), contra larvas de *A. aegypti* provenientes de ovos coletados no campo.

2 | METODOLOGIA

Os ovos do mosquito da espécie *A. aegypti* foram coletados com a utilização de armadilhas de coleta (ovitampas) conforme metodologia desenvolvida por Fay e Perry (1965) e Fay e Eliason (1966). As palhetas contendo os ovos do mosquito foram secas em temperatura ambiente e colocadas em água para eclosão das larvas.

Para a produção de blastosporos do fungo *M. anisopliae* (Isolado LEF 2000) foi feito utilizando meio de cultura líquido contendo 3% de água de maceração de milho, 4% de glucose e 4% de extrato de levedura. Para cada 100 mL de meio foram adicionados 1 mL de conídios na concentração de 1×10^7 conídios mL^{-1} previamente

cultivado em BDA. A solução foi incubada em Shaker Orbital a 27°C e 152 rpm por três dias, filtrada em tecido Whatman n° 105 e centrifugada a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os blastosporos foram formulados em água destilada na concentração de 1×10^7 blastosporos mL^{-1} . Os controles foram feitos com água destilada.

O experimento foi montado em laboratório em copos plásticos contendo 50 mL da suspensão de blastosporos para cada parcela, totalizando quatro parcelas e três repetições. A formulação foi distribuída nos copos logo após o preparo. Dez larvas (L_{3-4}) foram adicionadas em cada parcela. No tempo zero hora, as larvas foram adicionadas em cada parcela logo após o preparo da formulação. Para verificar a persistência da virulência dos blastosporos, larvas foram adicionadas após três, seis, nove e doze dias do preparo da formulação. O experimento foi avaliado durante sete dias após a adição das larvas. Para a comparação das curvas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (S_{50}), foi utilizado o método de Kaplan-Meier pelo programa *Graph Pad Prism 5.0*.

3 | RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstraram que as larvas adicionadas logo após o preparo da suspensão fungica tiveram a sobrevivência reduzida e apresentaram tempo médio de sobrevivência (S_{50}) de um dia. As larvas adicionadas após 3 dias apresentaram 6,2% de sobrevivência e S_{50} de 4 dias. Os tratamentos 6 e 9 dias apresentaram 2,5% e 17,5% de sobrevivência, respectivamente e S_{50} de 2 dias. No tratamento de 12 dias, as larvas apresentaram 46,2% de sobrevivência, e S_{50} de 6 dias. No tratamento controle 97,5% das larvas sobreviveram.

Aos 6 e 9 dias foi possível verificar na superfície da suspensão fungica a presença de conídios oriundos da germinação dos blastosporos, o que pode ter influenciado na mortalidade das larvas (Figura 1).

Tratamentos	% Sobrevivência \pm Desv.Pad.	S_{50}
0 hora	0	1
3 dias	6,2 \pm 2.7	4
6 dias	2,5 \pm 1.7	2
9 dias	17,5 \pm 4.2	2
12 dias	46,2 \pm 5.5	6
Controle	97,5 \pm 1.7	Não determinado

Tabela 1- Porcentagem de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com blastosporos do fungo *M. anisopliae* (Isolado LEF 2000).

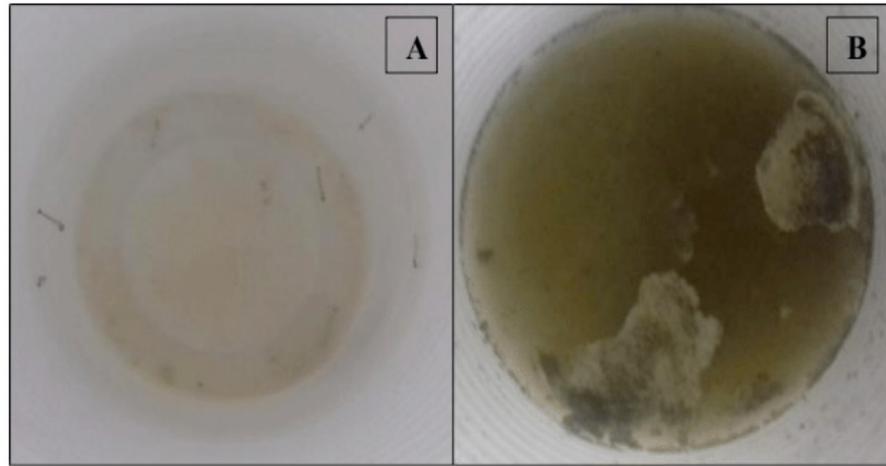


Figura 1- Blastosporos de *M. anisopliae* durante o experimento com larvas de *A. aegypti* (A) e que deram origem a conídios (B).

4 | DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível constatar a persistência de blastosporos em água o que acarretou na mortalidade das larvas de *A. aegypti* ao longo dos dias. Os blastosporos presentes na água deram origem a conídios que também contribuiu para a mortalidade das larvas.

A determinação da persistência de agentes inseticidas é essencial para definir a concentração e o tempo necessário para infectar e matar os mosquitos (MNYONE et al., 2009). Segundo Scholte et al. (2004), conídios de *M. anisopliae* são eficientes no controle de larvas e adultos de mosquitos, mas tem como fator limitante a falta de persistência dos esporos no ambiente. Entretanto, na literatura não existem trabalhos que relatam a persistência de blastosporos de fungos entomopatogênicos no controle de larvas de mosquitos. Riaz et al. (2013) demonstraram, em trabalho de laboratório, que conídios do fungo *M. anisopliae* dão origem a blastosporos quando os conídios são adicionados em meio de cultura líquido. Porém não há relato na literatura da capacidade de blastosporos originar conídios, especialmente em água sem meio de cultura. Segundo Alkhaibari et al. (2016) os blastosporos, ao contrário dos conídios, aderem e penetram facilmente a cutícula das larvas de mosquitos e são facilmente ingeridos pelas larvas e podem infectar o inseto através do intestino, invadindo a hemocele rapidamente.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a persistência da virulência de blastosporos visando o controle de larvas de *A. aegypti*. Foi observado a capacidade desse tipo de esporo em originar conídios que também foram infectivos às larvas.

5 | CONCLUSÃO

Blastosporos de *M. anisopliae* são eficientes no controle de larvas de campo do mosquito *A. aegypti*. A germinação e penetração rápida dos blastosporos e a observação de conídios formados na água, tornam blastosporos de *M. anisopliae* promissores para controle de larvas. Esta capacidade permite que o fungo atue por mais tempo no ambiente.

REFERÊNCIAS

ALKHAIBARI, A. M; CAROLINO, A.T; YAVASOGLU, S.I; MAFFEIS, T; MATTOSO, T.C; BULL, J,C; SAMUELS, R,I; BUTT, T.M. *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. **Plos Pathogens**. V.12, n.7, p.1-19, 2016.

CAROLINO, A.T; PAULA, A. R; SILVA, C. P; BUTT, T. M; SAMUELS, R. I. Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasit Vectors**. V.7, n.198, p.1-7, 2014.

FAY, R.W; ELIASON, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. V.26, p.531-535, 1966.

FAY, R.W; PERRY, A.S. Laboratory studies of ovipositional preference of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. V.24, p.276-281, 1965.

GOMES, S. A; PAULA, A. R; RIBEIRO, A; MORAES, C. O. P; SANTOS, J. W. A. B; SILVA, C. P; SAMUELS, R. I. Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & Vectors**. V.8, n.669, p.1-8, 2015.

HEGEDUS, D. D; KHACHATOURIANS, G. G. The Impact Of Biotechnology On Hyphomycetous Fungal Insect Biocontrol Agents. **Biotechnology Advances**. V.13, n.3, p.455-490, 1995.

LUZ, C; TAI, M. H. H; SANTOS, A.H; SILVA, H.H.G. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. V.103, n.2, p.214-215, 2008.

MNYONE, L. L; KIRBY, M. J; LWETOIJERA, D. W; MPINGWA, M. W; KNOL, B. G. J; TAKKEN, W., RUSSELL, T. L. Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. **Malaria Journal**. V.8, n.309, p.1-12, 2009.

PAULA, A.R; BRITO, E; PEREIRA, C.R; CARRERA, M.P; SAMUELS, R.I. Suscetibilidade do adulto de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) à infecção por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*: perspectivas para o controle de vetores da dengue. **Biocontrol Science and Technology**. V.18, n.10, p.1017-1025, 2008.

PEREIRA, C. R; PAULA, A. R; GOMES, S. A; PEDRA JR; P. C. O; SAMUELS, R. I. Short Communication: The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**. V.19, n.8, p.881-886, 2009.

QUESADA-MORAGA, E; CARRASCO-DIAZ, J. A; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **J Appl Entomol**. V.130, n.8, p.442-452, 2006.

RIAZ, A; SHAH, F. A; BUTT, T. M. Intra-specific variability among *Metarhizium anisopliae* strains In

Their ability to produce blastospores in liquid culture media. **Pak. J. Bot.** V.45, n.3, p.1099-1103, 2013.

SCHOLTE, E.J; KNOLS, B.G.J; SAMSON, R. A; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of insect science.** V.4, n.1, p.1-19, 2004.

WANCHOO, A; LEWIS, M. W; KEYHANI, N. O. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology.** V. 155, n.9, p.3121-3133, 2009.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS DA CIDADE DE CAMPOS DO JORDÃO – SP

Daniela Rodrigues Norberto

Centro Universitário de Itajubá
Campos do Jordão – São Paulo

Alexandre Magno Batista Machado

Centro Universitário de Itajubá
Itajubá – Minas Gerais

RESUMO: É comum em cidades turísticas onde há abundância de mananciais em locais públicos a canalização de águas para bicas para que fiquem disponíveis à população, o que pode colocar em risco a saúde pública quando não há qualidade adequada para o consumo. Foram analisadas amostras de 10 fontes de água mineral da cidade de Campos do Jordão-SP para avaliar sua qualidade microbiológica em relação a coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Considerando o fato de que as águas das fontes são canalizadas para distribuição livre ao público, em bicas, e que não recebem qualquer tratamento, o potencial de contaminação por microrganismos patogênicos é grande, fazendo-se necessárias análises microbiológicas de amostras para avaliar sua qualidade. Foi constatado que apenas 30% das amostras das fontes analisadas estavam adequadas para consumo humano. A maior parte das fontes (70%) apresentou contaminação por coliformes termotolerantes e *Escherichia*

coli, com isso impróprias ao consumo humano.

PALAVRAS-CHAVE: Fontes Minerais, Coliformes Termotolerantes, Substrato cromogênico.

ABSTRACT: It is common in tourist towns where there are plenty of springs in public places to channel water to spouts so that they become available to the population, which can endanger public health when there is no adequate quality for consumption. Samples from 10 mineral water sources from the city of Campos do Jordão-SP were analyzed to evaluate their microbiological quality in relation to thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*. Considering the fact that the waters of the sources are channeled for free distribution to the public, in spouts, and that do not receive any treatment, the potential of contamination by pathogenic microorganisms is great, making microbiological analyzes of samples necessary to evaluate their quality. It was found that only 30% of the samples from the analyzed sources were suitable for human consumption. Most of the sources (70%) presented contamination by thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*, thus unfit for human consumption.

KEYWORDS: Mineral Sources, Thermotolerant Coliforms, Chromogenic Substrate

1 | INTRODUÇÃO

O planeta Terra é composto de setenta por cento de água na sua superfície, no entanto noventa e sete por cento é água salgada, sendo imprópria para o consumo humano. Portanto, menos de três por cento da água do planeta é doce e cerca de trinta por cento da água doce do planeta é encontrada nos aquíferos subterrâneos, segundo dados do Ministério do Meio Ambiente. Apesar de serem aparentemente mais protegidas que as águas superficiais, as águas subterrâneas estão sujeitas a contaminações. A atividade agropecuária na zona rural, por exemplo, proporciona uma série de fontes contaminantes tais como despejo de efluentes domésticos *in natura* em corpos d'água e esterqueiras, cujos produtos de decomposição (chorume) percolam no solo e atingem o lençol freático podendo carrear microrganismos patogênicos, além de outras substâncias nocivas. Várias são as doenças de veiculação hídrica que podem ser adquiridas pelo consumo de água contaminada tais como diarreia, esquistossomose, cólera e Hepatite A e que frequentemente ocasionam problemas de saúde pública. Para fins de controle de qualidade microbiológica da água, a legislação em vigor, especificamente a Portaria 2914/11 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011) estabeleceu a utilização de microrganismos bioindicadores cuja presença em amostras condena o consumo da água, tais como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. Em cidades turísticas ricas em mananciais a disponibilização de água em fontes canalizadas a partir de nascentes é apreciada pela população, como é o caso da cidade de Campos do Jordão. Por se tratarem de águas de origem subterrânea são consideradas erroneamente em grande parte dos casos como águas naturalmente potáveis pelo senso comum. Entretanto, como não recebem qualquer tratamento, o consumo desse tipo de água oferece risco potencial de contaminação por patógenos, o que torna importante por questões de saúde pública, avaliar a qualidade microbiológica das águas disponibilizadas em fontes às pessoas. O presente artigo teve como intuito principal, analisar amostras de diferentes fontes de água provenientes de mananciais da cidade de Campos do Jordão-SP e disponibilizada em fontes de acesso livre aos transeuntes, com a finalidade de produzir informação de utilidade pública, uma vez que não se conhece a qualidade da água consumida.

2 | METODOLOGIA

Foram realizadas coletas em 10 fontes públicas existentes nos arredores da cidade. As amostras foram coletadas em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave da marca FABBE PRIMAR, mantidos em temperatura de 121°Celsius por 15 minutos, as coletas foram realizadas diretamente das fontes, onde foram previamente desinfetadas com algodão e álcool 70°. A coleta foi realizada de modo a preencher até 2/3 do volume dos frascos que foram lacrados, identificados e acondicionados em gelo

e transportados ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Itajubá – FEPI. O tempo entre a coleta e a análise não excedeu 7 horas. Para as análises, foi utilizado o método do substrato cromogênico de presença/ausência de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, evidenciados pela cor amarela da amostra ou por fluorescência à luz ultravioleta de 360 nm, respectivamente. Nesses casos a água é considerada imprópria para consumo humano. Para a realização das análises, foram utilizados 11 frascos Erlenmeyer, previamente esterilizados em autoclave. Foi utilizado um frasco testemunha contendo água destilada estéril. No laboratório os recipientes com as amostras foram higienizados antes de análise e posteriormente todo o material usado para a análise das amostras foi exposto à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 10 minutos. Feito isso foram adicionadas assepticamente 100ml de cada amostra nos frascos Erlenmeyer. Foi adicionado a cada amostra uma ampola de substrato cromogênico, realizando movimentos circulares para a homogeneização. Posteriormente todas as amostras foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por aproximadamente 24 horas no laboratório. Após o período de incubação foram analisadas as colorações das amostras e posteriormente foram submetidas a luz de lâmpada ultravioleta de 360 nm.

3 | RESULTADOS

As dez amostras coletadas em diferentes fontes da cidade foram denominadas respectivamente pelo nome da fonte ou o nome de cada bairro de origem da fonte e obtiveram os seguintes resultados conforme a Tabela 1.

Fontes	Coliformes termotolerantes	Escherichia coli
Convento	Sim	Não
Dom Bosco	Não	Não
Euclides Ramos	Sim	Não
Vila Britânia	Sim	Sim
Matadouro	Sim	Sim
Amizade	Sim	Não
Simão	Não	Não
Horto	Não	Não
Nossa Senhora das Graças	Sim	Não
Umuarama	Sim	Sim
Testemunha	Não	Não

Tabela 1- Análises das Fontes da cidade de Campos do Jordão

Fonte: o autor

4 | DISCUSSÃO

O experimento demonstrou que, das dez amostras analisadas, sete apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes, sendo consideradas impróprias para consumo humano correspondendo às fontes Convento, Euclides Ramos, Vila Britânia, Matadouro, Amizade, Nossa Senhora das Graças e a Umuarama, apresentando como característica uma coloração amarela escura, sendo duas amostras de fontes com grande uso da população, as fontes da Amizade e a Euclides Ramos.

Os resultados podem ser devido a infiltrações de água contaminada provenientes de propriedades rurais com criação animal nas proximidades dessas fontes. Das sete amostras contaminadas, três apresentaram fluorescência azul sob luz ultravioleta de 360 nm, indicando a presença de *Escherichia coli*, essas amostras são de fontes localizadas dentro de bairros onde essas podem sofrer contaminações provindas de redes de esgoto. As amostras das fontes Vila Britânia, Matadouro e Umuarama, apresentam resultados positivos para *Escherichia coli*, demonstrando contaminação fecal humana também impróprias para consumo humano.

5 | CONCLUSÃO

Conforme os resultados encontrados pode se concluir que apenas 30% das amostras das fontes analisadas atendem aos parâmetros estabelecidos pela legislação. Entretanto 70% das amostras apresentaram presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, consideradas impróprias ao consumo humano.

REFERENCIAS

ALMEIDA, RAS de. **Índice de qualidade de águas subterrâneas destinadas ao uso na produção de água potável (IQUAS)**. 2007.

BRASIL, Portaria MS n. 2914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 DEZ.

Associação Brasileira de Água Subterrânea. "**Águas subterrâneas o que são**"; ABAS. Disponível em <<http://www.abas.org/educacao.php>>. Acesso em 29 de Agosto de 2017.

COELHO, D.L.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; Uso de métodos do substrato cromogênico para quantificação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme em águas minerais envasadas; B. CEPPA, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 45 - 54. Jan. jun. 1998.

FREITAS, Marcelo Bessa; FREITAS, CM de. A vigilância da qualidade da água para consumo humano: desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 993 - 1004, 2005.

HENRIQUE. K.R.S; Detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em água de consumo humano pelo método colilert, 1º experimento, da segunda unidade 2010. 2 do componente de microbiologia experimental, Campina Grande – PB. Outubro de 2010.

SCREENING OF L-ASPARAGINASE THE SALT-TOLERANT AND THERMOSTABLE MARINE BACILLUS SUBTILIS STRAIN SR61

Bruno Oliveira de Veras

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Antióbticos, Recife-
Pernambuco.

Yago Queiroz dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Departamento Bioquímica, Natal-Rio Grande do
Norte.

Anderson Felipe Jácome de França

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Departamento Bioquímica, Natal-Rio Grande do
Norte.

Penha Patricia Cabral Ribeiro

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Departamento de Nutrição, Recife-Pernambuco.

Elaine Costa Almeida Barbosa

Universidade Federal da Paraíba, Departamento
de Energias Renováveis, João Pessoa-Paraíba.

Krystyna Gorch-Lira

Universidade Federal da Paraíba, Departamento
de Biologia Celular e Molecular, João Pessoa-
Paraíba.

RESUMO: O ambiente marinho abriga diferentes microorganismos que habitam nichos com condições adversas, como variação de temperatura, pressão e salinidade. Para sobreviver a essas condições particulares, as bactérias marinhas usam características metabólicas e bioquímicas únicas, produzindo enzimas que possuem elevado valor industrial.

O objetivo deste estudo foi observar a produção de L-asparaginase termoestável e halotolerante por bactérias marinhas isolado dos recifes de coral do Cabo Branco, Estado da Paraíba, Brasil. Foi obtido um isolado bacteriano produtor de L-asparaginase, sendo identificado identificada por análise filogenética como sendo *Bacillus subtilis* SR61, através de um ensaio de RNA ribossômico 16S. Para a triagem de L-asparaginase por SR61, foi inoculado em meio diferencial para induzir a produção de enzima termoestável extracelular tolerante ao sal com a adição de concentrações crescentes de sal (0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 M NaCl) em 55 ° C por 24 horas. A triagem mostrou capacidade de produção de L-asparaginase halotolerante e termoestável pelo isolado identificado como *Bacillus subtilis*, sendo a produção limitada a 1,0 M de sal, tendo como atividade total (UI / mL) $231,4 \pm 3,57$ e específica IU/ μg 8,39. *Bacillus subtilis* SR61 mostrou-se capaz de produzir L-asparaginase quando submetido a um ambiente de alta salinidade, demonstrando a natureza halofítica do isolado, tendo diversas aplicações em diversos ramos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: L-Asparaginase, Bactérias, Atividade enzimática.

ABSTRACT: The marine environment harbors different microorganisms that inhabit niches with adverse conditions, such as variation

of temperature, pressure and salinity. To survive these particular conditions, marine bacteria use unique metabolic and biochemical characteristics, producing enzymes that have high industrial value. The objective of this study was to observe the production of thermostable and halotolerant L-asparaginase by marine bacteria isolated from the coral reefs of Cabo Branco, State of Paraíba, Brazil. An L-asparaginase-producing bacterial isolate was identified and identified by phylogenetic analysis as *Bacillus subtilis* SR61, via a 16S ribosomal RNA assay. For screening of L-asparaginase by SR61, it was inoculated in a differential medium to induce the production of salt tolerant extracellular thermostable enzyme with the addition of increasing salt concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 M NaCl) by 55 °C for 24 hours. The screening showed a capacity of halotolerant and thermostable L-asparaginase production by the isolate identified as *Bacillus subtilis*, the production being limited to 1.0 M salt, having a total activity (IU / mL) 231.4 ± 3.57 and specifying IU / μg 8.39. *Bacillus subtilis* SR61 was able to produce L-asparaginase when submitted to a high salinity environment, demonstrating the halophytic nature of the isolate, having several applications in several industrial branches.

KEYWORDS: L-Asparaginase, Bactéria, Enzyme activity.

1 | INTRODUCTION

Covering large surface of the Earth's surface, the marine environment is a rich source of biological and chemical diversity; it contains endless habitats that may present adverse conditions of survival. However, these conditions favour the establishment of microorganisms able to produce enzymes that have extraordinary properties, such as salt tolerance, thermostability, pH and temperature variations. These enzymes have many industrial applications, such as the production of detergents, food, feed, pharmaceuticals, leather and biofuel (HU ET AL., 2015; FATEMEH ET AL., 2018).

The conditions of the industrial scale activities are related to the maintenance of its activity in environments with temperature variation (55°C to 121°C and -2°C to 20°C), pressure (> 500 atmospheres), alkalinity or acidity pH (pH > 8, pH < 4), salinity (1-5 M NaCl or KCl) (DUMORNÉ et al., 2017).

The enzyme L-Asparaginase (ASNase) catalyses the hydrolysis of the amino acid L-asparagine (Asn) in L-aspartic acid (Asp) and ammonia (EC 3.5.1.1) and can be produced by various organisms such as plants, bacteria and fungi (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006). L-Asparaginase (ASNase) is an important therapeutic agent used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and other hematopoietic disorders. Unlike normal cells, leukemic cells have a serious depletion in the activity of the enzyme Asparagine Synthase, being unable to perform asparagine synthesis by de novo pathways. Given the high requirement of exogenous asparagine, a deprivation of this amino acid for leukemic cells results in inhibition of protein synthesis and subsequent death of tumor cells (CHEN, 2015). Although several microorganisms have the capacity

to produce L-asparaginase, the main sources of the enzyme for therapeutic use are *E. coli* and *E. carotovora* (KUMAR; SOBHA, 2012)

Besides this, the food industry has been showing increasing attention by L-asparaginase as a promising agent for acrylamide mitigation, considering that the thermal treatment of foods rich in carbohydrates mainly the amino acid asparagine culminates in several chemical reactions, among them the Maillard Reaction (PEDRESCHI et al., 2006; HENDRIKSEN et al., 2013). Various microorganisms of L-asparaginase producers have been described as potential candidates for use in foods as a mitigation of acrylamide formation since up to 99% reduction in the formation of acrylamide in cold potatoes was obtained using the enzyme from microbial sources (ONISHI et al., 2015).

However, the production of L-asparaginase in the various microorganisms can be influenced by several factors, and studies are needed to optimize production, besides the search for new microorganisms producing L-asparaginase with different biochemical characteristics (SILVA et al., 2016).

The work aimed at the production of L-asparaginase thermostable produced by bacteria symbiont isolated of *Siderastrea stellate* (Verrill, 1868) in a Brazilian coral reefs ecosystem (7°08'50" S; 34°47'51" W).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolation of thermophilic bacterial strains

The bacterial strains were obtained from aseptically collected tissue of *Siderastrea stellate* Verrill, 1868 (Cnidaria, Scleractinia) colonies at Cabo Branco coral reefs, Paraíba State, Brazil (7°08'50" S; 34°47'51" W). For bacterial isolation from the anthozoan, sample were suspended in sterile saline solution, agitated until homogenization was achieved and then spread over marine agar plates (pH 8.0± 0.3) containing 5 g/l peptone; 1 g/l yeast extract; 15 g/l agar diluted in sterile marine water and incubated at 55°C until adequate growth was achieved (DUSTAN, 1969). Twelve bacterial isolates were obtained, which were analysed for L-asparaginase production capacity, only the one with the production capacity of enzyme was selected.

2.2 Qualitative Screening of L-asparaginase Bacteria

The detection of L-asparaginase-producing bacteria was performed using the Czapek Dox agar medium at different pHs (4.5, 5.5, 6.5, 7.5) (GULATI et al. 1997). The media will be supplemented separately with the indicators Bromocresol Green, Bromothymol Blue, Phenol Red, Bromocresol Purple, Neutral Red, plates with the bacterial cultures will be incubated at 55°C for 48 hours. For analysis of the production

of halotolerant L-asparaginase, the positive isolates in the qualitative analysis were grown on plates containing the Czapek Dox agar medium and the red phenol indicator in increasing molarities NaCl (0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 M).

2.3 Quantitative Screening of L-asparaginase Bacteria

An enzymatic assay was performed using the positive isolates in qualitative analysis using Czapek Dox containing 1.0 M NaCl, cultures being maintained at 55°C for 24 hours at 150 rpm. The enzyme activity of L-asparaginase was determined by measuring the amount of ammonia formed, using direct nesslerization method based (MASHBURN; WRISTON 1963). The quantification of total proteins was performed using a standard protein curve constructed using dilutions and quantification of bovine serum albumin (BSA) (BRADFORD, 1976; LOWRY et al.1951).

2.4 Bacterial identification

In order to identify the isolate, morphophysiological and molecular data were evaluated (HOGG, 1999). The obtained 16S rRNA gene was sequenced by ATCGene (UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automated sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. The sequence was compared to sequences deposited in the Genbank database (NCBI). For the local alignment, the BLASTn tool (NCBI) was used. The MEGA 6.0 software was used for monitoring multiple sequences and for construction of a dendrogram by the Neighbor-Joining method.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Qualitative and Quantative Screening

In the present study, 12 bacteria strains were investigated for the production of the enzyme L-asparaginase using the test method in plate. In Czapek Dox medium containing different indicators it was possible to verify that one of the Twelve isolates have the capacity to produce L-asparaginase. It was possible to easily verify the presence of halo hydrolysis in the medium containing the indicators red phenol, bromocresol purple and neutral red (Figure 1). In the detection of halotolerant L-asparaginase in medium containing phenol red indicator it was possible to verify the presence of halos up to the maximum limit of 1.0 M NaCl (Figure 2).

Although several microorganisms have the ability to produce L-asparaginase with application in tumor therapy, the main sources of the enzyme for therapeutic use are *E. coli* and *E. carotovora*, for which further studies are needed to obtain new microorganisms producing this type with new biochemical characteristics (GODFRIN;

BERTRAND, 2006; HUSAIN et al. 2016).

The activity of L-asparaginase by isolated was estimated by the Nesslerization method, presenting total enzymatic activity varying from $231,4 \pm 3,57$ IU/mL and specific activity from $8,39$ IU/ μ g (Table 1), whose data indicates a high enzymatic activity in medium containing 1.0 M NaCl. Dharmaraj (2011) was able to obtain a total activity of 331.0 IU/ml in *Streptomyces noursei* MTCC 10469 marine in medium in the absence of salt.



Figure 1. Qualitative screening of L-asparaginase by bacterial isolate using the Czapek Dox agar medium and different indicators.

Legend: Halos around bacterial colonie are indicative of hydrolysis L-asparagine.

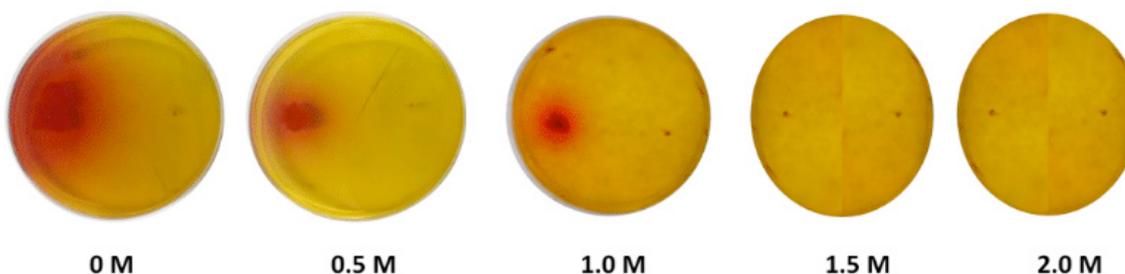


Figure 2. Qualitative screening of L-asparaginase by bacterial isolate using Czapek Dox agar medium with red phenol indicator at different molarities NaCl.

Legend: Halos around bacterial colonie are indicative of hydrolysis L-asparagine.

Isolated	Total activity (IU/mL)	Protein (μ g/mL)	Specific activity (IU/ μ g)
SR61	$231,4 \pm 3,57$	$27,55 \pm 2,98$	8,39

Table 1. Quantitative screening production of L-asparaginase for isolated *Bacillus subtilis* sp. SR61.

3.2 Bacterial identification

The SR60 isolate was revealed to be a Gram-positive spore-forming bacillus, facultative anaerobe, catalase-positive; it was negative for indole, H₂S production and citrate utilization bacterium (Table 2). Those findings led us to consider the isolate

belonging to the genus *Bacillus* which was posteriorly confirmed by the phylogenetic analysis which revealed that the SR60 strain formed a clade with *Bacillus subtilis* (Figure 3). The nucleotide sequence was deposited in GenBank under accession number MH700947.1.

Parameter	Result
Gram staining	Positive
Morphology	Bacillus
Arrangement	Ausent
Endospore	Positive
Catalase	Positive
Urease	Negative
Citrate Utilization	Negative
H ₂ S Production	Negative
Indole Production	Negative

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of isolated *Bacillus subtilis* sp. SR61.

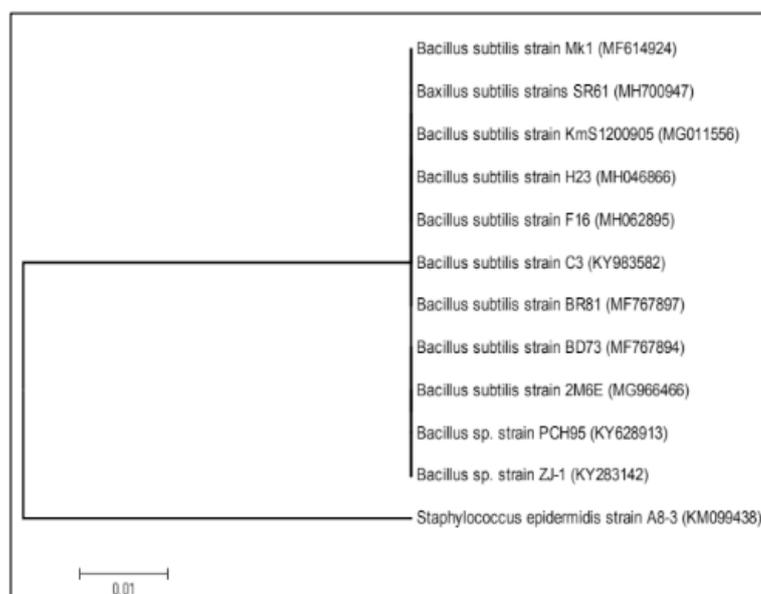


Figure 3. Phylogenetic tree of isolated SR61 and other related species based on 16S rRNA sequences. The scale bar represents 0.01 substitutions per site. GenBank accession numbers of the sequences are given in parentheses.

4 | CONCLUSIONS

The obtained data indicate that the isolate obtained in the present work has the potential to produce greater enzymatic activity after the optimization to meet the needs of pharmaceutical and other industries.

REFERENCES

BRADFORD, M.M.A. **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities**

of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. v.72, p. 248-254, 1976.

CACHUMBA, J.J.M.; ANTUNES, F.A.F.; PERES, G.F.D.; BRUMANO, L.P.; DOS SANTOS, J.C.; DA SILVA, S.S. **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production.** Brazilian Journal of Microbiology. v.47, p.77–85, 2016.

CHEN, S.H. **Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance.** Pediatrics & Neonatology. v.56, n.5, p.1–7, 2015.

DHARMARAJ, S. **Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*.** Iran. J. Biotechnol. v.9, n.2, p.102–108, 2011.

DUMORNÉ K, CÓRDOVA D, CAMACHO A MRP. **Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications.** J Microbiol Biotechnol. v.27, n.4, p. 649–659, 2017.

DUSTAN, P. **Distribution of zooxanthella and photosynthetic chloroplast pigment of the reef building coral *Montastrea annularis* Ellis and Solander in relation to depth on a West Indian coral reef.** Bull Mar Sci. v.29, p.79-95, 1979.

FATEMEH, I.Q.; AHMAD, H.; PEDRO, F. S.J.; **Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry.** Microbiol Res. v.208, p.99-112, 2018.

GODFRIN, Y.; BERTRAND, Y. **L-asparaginase Introduced into Erythrocytes for the Treatment of Leukaemia (ALL).** BioMedES. v,1, n.1, p.10–13, 2006.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. **A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms.** Letters in Applied Microbiology. v.24, p.23-26, 1997.

HENDRIKSEN, H.V.; BUDOLFSEN, G.; BAUMANN, M.J. **Asparaginase for acrylamide mitigation in food.** Aspects of Applied Biology. v.116, p.41–50, 2013.

HOGG, J.C.L.M. **Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA.** Appl Environ Microbiol. v.65, p.4227-4229, 1999.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.Y.J. **Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012.** Mar Drugs. v.13, p.202–221, 2015.

HUSAIN, I.; SHARMA, A.; KUMAR, S.; MALIK, F. **Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells.** PLoS ONE. 11(2):e 0148877, 2016.

KUMAR, D.S.; SOBHA, K. **L-asparaginase from microbes: a comprehensive review.** Advances in Bioresearch. v.3, n.4, p.137-157, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the folin-phenol reagent.** Journal of Biological Chemistry. v.48, p.17-25, 1951.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, J.C. **Tumor inhibitory effect of L-asparaginase.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v.12, n.1, p. 50-55, 1963.

MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. **Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations.** Acta Biochimica Polonica. v. 53, n.4, p. 627–40, 2006.

ONISHI, Y.; PRIHANTO, A.A.; YANO, S.; TAKAGI, K.; UMEKAWA, M. Wakayama, M. **Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis***. 3 Biotech. v.5, n.5, p.783–789, 2015.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. **Acrylamide contented and colour development in fried potato strips**. Food Research International. v. 39, p.40–46, 2006.

SOBRE A ORGANIZADORA

Patrícia Michele da Luz - Estudante de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Tecnológica do Paraná, Campus Ponta Grossa. Mestre em Botânica pela Universidade Federal do Paraná (concluído em 2014) e formada em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (concluído em 2012). Linha de pesquisa com foco em Ecologia dos Campos Gerais do Paraná, fenologia, biologia floral, genética populacional.

Participação em projetos de pesquisa (concluídos):

- Diagnóstico Ambiental e Conservação na Bacia do Rio São João, Carambeí-PR
Descrição: Esse projeto foi realizado em parceria entre a Prefeitura Municipal de Carambeí e a Universidade Estadual de Ponta Grossa. O meu subprojeto está intitulado como “A Vegetação Rupestre da Bacia do rio São João”.
- Regeneração natural em uma área anteriormente ocupada por floresta de Eucalyptus no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, PR.
Descrição: Esse projeto teve objetivo de levantar dados sobre a composição florística e a estrutura fitossociológica das espécies regenerantes para a compreensão da estratégia adaptativa-evolutiva das mesmas; Subsidiar e fundamentar a escolha dos métodos de manejo das áreas onde houve a retirada de exóticas do Parque Estadual de Vila Velha; Analisar o processo de regeneração natural em uma área anteriormente ocupadas por plantios de Eucalyptus nos limites do Parque Estadual de Vila Velha.

Artigos publicados:

- ECOLOGIA TRÓFICA DO LOBO-GUARÁ, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811), NO PARQUE ESTADUAL DO GUARATELÁ, TIBAGI, PR, BRASIL. Revista Brasileira de Zoociências, v. 15, p. 107-122, 2013.
- A coleta seletiva de resíduos sólidos: uma ação aplicada no Projeto Rondon com as crianças de Santa Luzia do Itanhi - SE. Revista Conexão UEPG, v. 7, p. 254-259, 2011.

Endereço para acessar este CV de Patrícia Michele da Luz: <http://lattes.cnpq.br/6180982604460534>

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-7247-173-2



9 788572 471732