

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2

**José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)**

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da
Natureza 2

Athena Editora
2019

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

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di 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
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
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

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

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

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

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrão Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)
A532 Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 2 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 2)
Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-358-3 DOI 10.22533/at.ed.583192705
1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série.
CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422
Atena Editora Ponta Grossa – Paraná - Brasil www.atenaeditora.com.br contato@atenaeditora.com.br
 Ano 2019

APRESENTAÇÃO

A obra “*Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza*” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a “*Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza*” demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AS LIBÉLULAS (ODONATA: INSECTA) DE CONCEIÇÃO DA BARRA, ESPÍRITO SANTO, DEPOSITADAS NA COLEÇÃO ZOOLÓGICA NORTE CAPIXABA / CZNC	
Karina Schmidt Furieri	
Carolini Cavassani	
Arianny Pimentel Storari	
DOI 10.22533/at.ed.5831927051	
CAPÍTULO 2	10
FORMIGAS (Hymenoptera: Formicidae) ASSOCIADAS ÀS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE DE UMA HIDRELÉTRICA DO SUL DO BRASIL	
Junir Antonio Lutinski	
Cladis Juliana Lutinski	
DOI 10.22533/at.ed.5831927052	
CAPÍTULO 3	23
IDENTIFICAÇÃO DA HERPETOFAUNA DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS CERES	
Alexandre Pereira de Oliveira Filho	
Marcos Vitor dos Santos Almada	
Jorge Freitas Cieslak	
DOI 10.22533/at.ed.5831927053	
CAPÍTULO 4	32
CRIAÇÃO DE PACAS (<i>Cuniculus paca</i>) COMO ALTERNATIVA DE DIVERSIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RENDA EM RIO BRANCO - ACRE	
Francisco Cildomar da Silva Correia	
Reginaldo da Silva Francisco	
Valderi Tananta de Souza	
Vania Maria Franca Ribeiro	
Fábio Augusto Gomes	
DOI 10.22533/at.ed.5831927054	
CAPÍTULO 5	46
FISCALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO: AVIFAUNA RESGATADA PELO MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA	
Diego Silva Macedo	
Alanna Barreto dos Santos	
Lucas Gabriel Souza Santos	
DOI 10.22533/at.ed.5831927055	
CAPÍTULO 6	56
LEVANTAMENTO DA AVIFAUNA EM AMBIENTE URBANO E RURAL NO MUNICÍPIO DE NOVO HAMBURGO, RS, BRASIL	
Brenda Silveira de Souza	
Marcelo Pereira de Barros	
DOI 10.22533/at.ed.5831927056	

CAPÍTULO 7 **68**

ASPECTOS PSICOLÓGICOS NO ESPORTE: REFLEXÕES, QUESTIONAMENTOS E INFLUÊNCIAS DO ESTRESSE E ANSIEDADE NOS ATLETAS DE HANDEBOL

Rômulo Dantas Alves
Taís Pelição
Marcos Gabriel Schuindt Acácio
Luan Henrique Roncada
Debora Gambari Freire Batagini
Rubens Venditti Júnior

DOI 10.22533/at.ed.5831927057

CAPÍTULO 8 **81**

FEITO DO TAMANHO DA QUADRA SOBRE AÇÕES TÉCNICAS E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM JOVENS JOGADORES DE FUTSAL

Matheus Luiz Penafiel
Alexsandro Santos da Silva
Dagnou Pessoa de Moura
Osvaldo Tadeu da Silva Junior
Bruno Jacob de Carvalho
Yacco Volpato Munhoz
Julio Wilson Dos-Santos

DOI 10.22533/at.ed.5831927058

CAPÍTULO 9 **90**

EFETOS DO ALONGAMENTO AGUDO SOBRE A FORÇA DE MEMBROS SUPERIORES NO ARREMESSO DO ATLETISMO

Fernando Barbosa Carvalho
Márcio Pereira da Silva

DOI 10.22533/at.ed.5831927059

CAPÍTULO 10 **100**

INFLUÊNCIA DA CARGA TABAGÍSTICA SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL DE TABAGISTAS ATIVOS

Alessandra Mayumi Marques Masuda
Iara Buriola Trevisan
Tamara Gouveia
Caroline Pereira Santos
Guilherme Yassuyuki Tacao
Tamires Veras Soares
Ercy Mara Cipulo Ramos
Dionei Ramos

DOI 10.22533/at.ed.58319270510

CAPÍTULO 11 **110**

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES CRÍTICOS

Lais Maria Bellaver de Almeida
Isabella Gonçalves Pierri
Karina Zanchetta Cardoso Eid
Welder Zamoner
Daniela Ponce
André Balbi

DOI 10.22533/at.ed.58319270511

CAPÍTULO 12 121

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES NÃO CRÍTICOS

Isabella Gonçalves Pierri
Lais Maria Bellaver de Almeida
Karina Zanchetta Cardoso Eid
Welder Zamoner
André Balbi
Daniela Ponce

DOI 10.22533/at.ed.58319270512

CAPÍTULO 13 133

POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL EM BEBÊS A TERMO E PRÉ-TERMO

Dayse Mayara Oliveira Ferreira
Letícia Sampaio de Oliveira
Rafaela Cristina da Silva Bicas
Yara Bagali Alcântara
Brena Elisa Lucas
Ana Cláudia Figueiredo Frizzo

DOI 10.22533/at.ed.58319270513

CAPÍTULO 14 146

PROCEDÊNCIA DOS ENCAMINHAMENTOS À MATERNIDADE DO HC- FMB-UNESP DOS CASOS GRAVES E DE MORTE MATERNA ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

Eduardo Minoru Nomura
Victoria de Carvalho Zaniolo
Ariel Althero Zambon
Ana Débora Souza Aguiar
Eduarda Baccari Ferrari
José Carlos Peraçoli

DOI 10.22533/at.ed.58319270514

CAPÍTULO 15 160

SERIA A ANESTESIA UMA INTERFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE ELETROACUPUNTURA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Strongyloides venezuelensis*?

Maria Teresa da Silva Bispo
Luana dos Anjos Ramos

DOI 10.22533/at.ed.58319270515

CAPÍTULO 16 175

ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA CANHOTOS E OS DESAFIOS ENFRENTADOS EM ATIVIDADES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Julio Martinez Alves Oliveira
Suzely Adas Saliba Moimaz
Artênia José Isper Garbin
Tânia Adas Saliba

DOI 10.22533/at.ed.58319270516

CAPÍTULO 17 181

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DE *MYRTACEAE* CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Juliana Barbosa Succar
Gabriele Marques Pinto
Tauana de Freitas Pereira
Ida Carolina Neves Direito
Maria Cristina de Assis
Cristiane Pimentel Victório

DOI 10.22533/at.ed.58319270517

CAPÍTULO 18 193

ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Mariane Cristina Mendes
Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni
Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Maria Inês Rezende

DOI 10.22533/at.ed.58319270518

CAPÍTULO 19 206

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E TEMPO DE REAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE

Poline Wilke
Karen Jaqueline Haselroth
Raquel Ströher

DOI 10.22533/at.ed.58319270519

CAPÍTULO 20 223

AVALIAÇÃO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Victoria Pommer
Letícia Mara Rasbold
Jorge William Fischdick Bittencourt
Alexandre Maller
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.58319270520

CAPÍTULO 21 231

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus rhamnosus* V5 CONTRA *SALMONELLA ENTERICA* sorovarietade *Typhimurium*.

Carina Terumi Tsuruda
Patrícia Canteri De Souza
Erick Kenji Nishio
Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Luciano Aparecido Panagio
Ana Angelita Sampaio Baptista
Sandra Garcia
Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Gerson Nakazato

DOI 10.22533/at.ed.58319270521

CAPÍTULO 22 241

BIOFILME BACTERIANO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS : TEM COMO EVITAR?

Natara Favaro Tosoni

Naiele Mucke

Márcia Regina Terra

Márcia Cristina Furlaneto

Luciana Furlaneto Maia

DOI 10.22533/at.ed.58319270522**CAPÍTULO 23** 258

BIOFILTRO DE RESÍDUO ORGÂNICO APLICADO NA DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA SALOBRA

Francielle Fernandes Gonçalves de Barros

Rebecca Carvalho Mendes e Silva

Charles Albert Moises Ferreira

Juliana Parolin Ceccon

DOI 10.22533/at.ed.58319270523**CAPÍTULO 24** 270

BIOLOGIA E APLICAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DO MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Renata Rosado Drumond

Carla Lorena Silva Ramos

Rayran Walter Ramos de Sousa

Débora Caroline do Nascimento Rodrigues

Ana Paula Peron

DOI 10.22533/at.ed.58319270524**CAPÍTULO 25** 288

BIORREPOSITÓRIO DE SALIVA EM ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Natália Ramos

Thais Francini Garbieri

Thiago José Dionísio

Carlos Ferreira dos Santos

Lucimara Teixeira das Neves

DOI 10.22533/at.ed.58319270525**CAPÍTULO 26** 302

CONTROLE DA ESTERILIZAÇÃO DE AUTOCLAVES DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIOESTE E DE UM ABRIGO PARA IDOSOS, CASCABEL, PR

Helena Teru Takahashi Mizuta

Fabiana André Falconi

Sara Cristina Sagae Schneider

Rodrigo Hinojosa Valdez

Leanna Camila Macarini

DOI 10.22533/at.ed.58319270526

CAPÍTULO 27 309

ELEIÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS PARA INCORPORAÇÃO DE CAFEÍNA PARA TRATAMENTO DE LIPODISTROFIA GINÓIDE

Julia Vila Verde Brunelli
Maria Virgínia Scarpa
Flavia Lima Ribeiro Maccari
Tayara Luísa Paranhos de Oliveira Ribeiro de Almeida

DOI 10.22533/at.ed.58319270527

CAPÍTULO 28 316

ESTATÍSTICA PARAMÉTRICA E NÃO PARAMÉTRICA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ

Deusélio Bassini Fiorese
Wilton Soares Cardoso
Weliton Barbosa de Aquino
Luzia Elias Ferreira
Vinícius Serafim Coelho

DOI 10.22533/at.ed.58319270528

CAPÍTULO 29 326

ENZYMIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE PRE-TREATED BY ALKALINE SOLUTION IN FLUIDIZED BED REACTOR

Felipe A. F. Antunes
Guilherme F. D. Peres
Thaís. S. S. Milessi
Letícia E. S. Ayabe
Júlio C. dos Santos
Silvio S. da Silva

DOI 10.22533/at.ed.58319270529

CAPÍTULO 30 331

ESTUDO DESCritivo SOBRE O USO DE FOLHAS DA BATATA-DOCE E POTENCIAL PARA REDUÇÃO DE EFEITOS OXIDATIVOS

Thaís Cristina Coelho de Ornelas Salasar
Roberta Cattaneo Horn
Rodrigo Fernando dos Santos Salazar
Diego Pascoal Golle
Jana Koefender
Andreia Quatrin
Carolina Peraça Pereira Regis

DOI 10.22533/at.ed.58319270530

CAPÍTULO 31 339

FITOTOxicidade INDuzida PELA CO-EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E ARSÊNIO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE CRESPA (*L. sativa var. crispa*)

Flávio Manoel Rodrigues Da Silva Júnior
Eduarda De Moura Garcia
Rodrigo De Lima Brum
Silvana Manske Nunes
Mariana Vieira Coronas
Juliane Ventura Lima

DOI 10.22533/at.ed.58319270531

CAPÍTULO 32 345

FOTOBIORREATOR DE MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS UTILIZANDO MATERIAIS ALTERNATIVOS

Ana Beatriz Medeiros Dantas

Luana Valezi

Vitória Luciana de Souza

Roberto Shiniti Fujii

DOI 10.22533/at.ed.58319270532

CAPÍTULO 33 355

HIDRÓLISE ENANTIOSSELETIVA DE α - E β -BUTIRILOXIFOSFONATOS MEDIADAS POR LIPASE DE CANDIDA RUGOSA

Lucidio Cristovão Fardelone

José Augusto Rosário Rodrigues

Paulo José Samenho Moran

DOI 10.22533/at.ed.58319270533

CAPÍTULO 34 365

IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS DAS CASCAS E AMÊndoAS DO TUCUMÁ POR MEIO DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO POR BIOFILMES COM *C. ALBICANS*

Luis Fernando Mendonça da Silva

Ana Cláudia Rodrigues de Melo

DOI 10.22533/at.ed.58319270534

CAPÍTULO 35 376

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE TANASE POR FUNGO ISOLADO DE CACAU NO SUL DA BAHIA

Priscilla Macedo Lima Andrade

Julyana Stoffel Britto

Camila Oliveira Bezerra

Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Andrea Miura da Costa

DOI 10.22533/at.ed.58319270535

SOBRE O ORGANIZADOR..... 381

CAPÍTULO 1

AS LIBÉLULAS (ODONATA: INSECTA) DE CONCEIÇÃO DA BARRA, ESPÍRITO SANTO, DEPOSITADAS NA COLEÇÃO ZOOLÓGICA NORTE CAPIXABA / CZNC

Karina Schmidt Furieri

Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

São Mateus – Espírito Santo

Carolini Cavassani

Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

São Mateus – Espírito Santo

Arianny Pimentel Storari

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Vitória – Espírito Santo

registros de 11 famílias, 36 gêneros e 60 espécies, incluindo uma espécie deficiente em dados (DD) em nível mundial, quatro espécies ameaçadas em nível nacional, duas espécies criticamente ameaçadas e três DD em nível estadual. Esses resultados sugerem que a fauna da região estudada merece atenção. A conservação dos fragmentos da Mata Atlântica e seus ecossistemas associados em Conceição da Barra e o aumento da conectividade entre eles irá contribuir significativamente para a conservação desse grupo de insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Mata Atlântica, riqueza, conservação.

RESUMO: Um dos maiores obstáculos para a conservação da biodiversidade tropical é a falta de informações que permitam o estabelecimento de prioridades em ações práticas de conservação. Essa falta de informações advém principalmente da ausência de inventários em muitas áreas onde poucos grupos têm bancos de dados razoavelmente completos. O conhecimento das faunas regionais é importante para fornecer dados que se aproximem mais da realidade das espécies existentes no Brasil. Este trabalho, portanto, enriquece o conhecimento acerca da ordem Odonata para o Estado do Espírito Santo, além de contribuir para o conhecimento sobre o município de Conceição da Barra e consequentemente a Mata Atlântica. Para isso, foi construído um banco de dados com as espécies registradas para o município. O banco de dados apresentou

THE DRAGONFLIES (ODONATA: INSECTA) OF CONCEIÇÃO DA BARRA, ESPÍRITO SANTO, ALLOCATED AT THE ZOOLOGICAL COLLECTION NORTE CAPIXADA / CZNC

ABSTRACT: One of the greatest obstacles to the conservation of tropical biodiversity is the lack of information to prioritize and concentrate efforts on practical actions. This lack of information mainly from the absence of inventories in many areas where few groups have reasonably complete databases. The distribution of the dragonfly fauna of Brazil is little known - only 29% of the Brazilian territory presents data about the richness of Odonata. Knowledge of regional

faunas is important to provide numerical data that are closer to the reality of the species in Brazil. This project, therefore, enriches the knowledge about the Odonata order for the State of Espírito Santo, contributing to the knowledge about the Atlantic forest. For this, a database was built for Conceição da Barra, municipality. The database has 60 species distributed in eleven families and thirty-six genera, including one species in the category insufficient data (DD) at world-class data, four species endangered at national level, two species critically in danger and three DD at state level. These results suggest that the fauna of the studied region deserves attention. The conservation of fragments of the Atlantic Forest and its associated ecosystems at Conceição da Barra and the increase of connectivity between them will contribute significantly for the conservation of this insect group.

KEYWORDS: Atlantic Forest, richness, conservation.

1 | INTRODUÇÃO

Os representantes da ordem Odonata são insetos predadores cujas larvas são aquáticas e os representantes adultos, terrestres, apresentando alta diversidade em domínios tropicais (DAVIES & TOBIN, 1984, 1985; CORBET, 1999). São popularmente conhecidos por uma variedade de nomes associados ao vôo e comportamento dos adultos como helicóptero, cavalinho-de-judeu, lavadeira, lava-bunda, donselinhas ou simplesmente libélulas. Os adultos são classificados comportamentalmente em pousadores (ex. *Heliocharis amazona* e *Zenithoptera* sp.), que usualmente defendem territórios próximos à água, e voadores (*Staurophlebia* sp.), que podem ser encontrados próximos aos corpos d'água, mas em geral não defendem territórios de acasalamento.

Estes insetos são predadores generalistas estando junto com alguns peixes no topo da cadeia trófica do litoral de lagos e riachos (PETR, 1968, 1972; KIRK & PERRY, 1994). Além disto, as larvas e adultos podem depender das características da matriz de habitat onde se inserem, permitindo o uso destes como indicadores de mudanças ambientais em uma grande variedade de parâmetros, desde condições fisico-químicas dos corpos d'água (CASTELLA, 1987; GORHAM & VODOPICH, 1992), até mudanças da cobertura vegetal nas proximidades dos corpos d'água (FERREIRA-PERUQUETTI & DE MARCO, Jr., 2002). Assim, o grupo Odonata tem sido cada vez mais estudado com vistas ao uso como indicadores de habitats e na identificação de áreas prioritárias para a preservação (CARLE, 1979; CLARK & SAMWAYS, 1996, 1999, 2005; STEWART & SAMWAYS, 1998; HAWKING & NEW, 2002; OERTLI *et al.*, 2002)

As fêmeas frequentemente dispersam para se alimentar, voltando ao ambiente aquático para a oviposição, mas grande parte dos machos, como mencionado acima, é territorialista e permanece defendendo o território reprodutivo próximo aos corpos d'água (CONRAD *et al.*, 1999, 2002). A defesa de território facilita a amostragem dos indivíduos, preferencialmente dos machos, o que também facilita a identificação, pois as descrições são feitas, em sua maioria, baseadas nos machos das espécies. A

identificação é relativamente simples e conta com literatura específica para América do Sul (HECKMAN, 2006, 2008) e Brasil (LENCONI, 2005, 2006), permitindo que grande parte da comunidade de libélulas coletada seja identificada até o nível de espécie.

Existem aproximadamente 6.000 espécies de libélulas (Insecta: Odonata) atualmente reconhecidas no mundo, das quais cerca de 800 conhecidamente ocorrem no Brasil (COSTA *et al.*, 2012). A ordem Odonata possui três subordens: Anisoptera, Zygoptera e Anisozygoptera (CORBET, 1952, 1999; DAVIES, 1981; MAY, 1991; SILSBY, 2001), mas apenas as duas primeiras ocorrem no Brasil. Os Anisoptera compreendem nove famílias e apresentam a maior riqueza em espécies da Ordem. Os Zygoptera compreendem 19 famílias. A subordem Anisozygoptera é conhecida principalmente por fósseis jurássicos, compreendendo atualmente duas espécies pertencentes à família Epiophlebidae. (IUCN, 2003; REHN, 2003). No Brasil, são listados 123 gêneros (DE MARCO, Jr. & VIANNA, 2005), pertencentes às famílias Dicteriadidae, Amphypterigidae, Polythoridae, Heteragrionidae, Lestidae, Coenagrionidae, Perilestidae, (Zygoptera) e Aeshnidae, Gomphidae, Cordulidae e Libellulidae (Anisoptera) (PAULSON, 2002; HAMADA & OLIVEIRA, 2003, 2010). O conhecimento sobre a odonatofauna do Estado do Espírito Santo foi sumarizado por Costa & Oldrini (2005), que citam 12 famílias, 69 gêneros e 180 espécies para o Espírito Santo (ES). A lista de libélulas do Espírito Santo está em processo de revisão. O ES apresenta grande diversidade de Odonata, incluindo 38 novos registros em 10 anos.

A Lista Vermelha Mundial da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) apresenta 268 espécies de Odonata ameaçadas (IUCN, 2012), com 11 espécies encontradas no Brasil: *Fluminagrion taxaense* (Santos), *Elga newtonsantosi* (Machado), *Erythrodiplax acantha* (Borror), *Erythrodiplax nivea* (Borror), *Mecistogaster pronoti* (Sjöstedt), *Micrathyria kleerekoperi* (Calvert) e *Minagrion ribeiroi* (Santos) na categoria “Criticamente Em Perigo”; e *Heteragrion flavovittatum* (Selys), *Mecistogaster asticta* (Selys), *Micrathyria divergens* (Westfall) e *Micrathyria pseudhypodidyma* (Costa, Lourenço & Viera) na categoria “Em Perigo”. O Brasil também conta com a ocorrência de 52 espécies de libélulas na categoria “Dados Deficientes” segundo a IUCN.

A Lista Vermelha Brasileira publicada em 2003 inclui oito espécies de Odonata consideradas ameaçadas de extinção (MMA 2003; MACHADO *et al.*, 2008). Sua revisão (Portaria N°444, de 17/12/2014) apresenta 18 espécies de libélulas ameaçadas. *F. taxaensis* e *M. pronoti* estão “Criticamente Em Perigo”, sendo consideradas “Potencialmente Extintas”. *Leptagrion acutum* Santos é considerada “Criticamente Em Perigo” com apenas um registro para o município de Conceição da Barra, Espírito Santo (SANTOS, 1961). O Brasil possui algumas listas de espécies ameaçadas de extinção estaduais com o objetivo de formar um sistema integrado de monitoramento e análise da fauna e flora ameaçadas. A Lista Vermelha do Espírito Santo possui quatro espécies de Odonata “Criticamente em Perigo” incluindo *Leptagrion capixabae* (Santos) e *L. acutum* (PASSAMANI & MENDES, 2007). Todas essas listas de espécies ameaçadas foram elaboradas seguindo os critérios adotados pela IUCN (2001). A

diferença na composição das espécies de libélulas das listas estaduais e nacional deve-se ao conhecimento disponível na época em que cada lista foi elaborada ou revisada. Já a diferença entre essas listas e a mundial deve-se provavelmente a falta de acesso dos responsáveis pela lista mundial a todas as informações disponíveis sobre as espécies de Odonata brasileiras.

Existe um viés taxônomico na avaliação do risco de extinção (muitos mamíferos e aves conhecidos e apenas 0,5% dos artrópodes avaliados), que é justificado pelo fato dos critérios atuais serem difíceis de serem aplicados usando apenas as informações que podem ser reunidas para a maioria das espécies de invertebrados (CARDOSO *et al.*, 2011a, 2011b). Essa dificuldade ocorre devido a quatro deficiências principais: (1) muitas das espécies não são descritas (o déficit Linneano); (2) a distribuição de espécies descritas é em grande parte desconhecida (o déficit Wallaciano); (3) abundâncias das espécies e suas alterações no espaço e tempo são desconhecidos (o déficit Prestoniano) e a (4) ecologia e sensibilidade das espécies às mudanças de habitat são desconhecidos (o déficit Hutchinsoniano).

O Município de Conceição da Barra (ES) está elaborando seu Plano Municipal da Mata Atlântica (PMMA). O PMMA é um instrumento de gestão, integração e de inclusão da variável ambiental ao sistema de planejamento municipal. Ele indicará orientações para as ações públicas e privadas, para a atuação de entidades acadêmicas e de pesquisa e para as organizações da sociedade, com vistas à conservação dos remanescentes de vegetação nativa e da biodiversidade existentes na Mata Atlântica, bem como à recuperação de áreas que foram degradadas. Com isso, o principal objetivo desse estudo foi fornecer subsídios para a construção de um banco de dados que está sendo utilizado na elaboração do PMMA de Conceição da Barra. Esse banco de dados reúne informações sobre as espécies de libélulas (Odonata), incluindo as ameaçadas de extinção, registradas para o município de Conceição da Barra com base nas informações da Coleção Zoológica Norte Capixaba / CZNC e na literatura especializada.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foi construído um banco de dados a partir de literatura especializada e registros na Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC - Universidade Federal do Espírito Santo), e coleção do Laboratório Teoria, Metacomunidades e Ecologia de Paisagens (THEMETALAND – Universidade Federal de Goiás). Neste banco de dados, foram incluídas as seguintes informações (sempre que disponíveis): nome da família; gênero; espécie; localidade (nome da região da cidade ou da reserva/parque, rio/lago); latitude e longitude; altitude; e a fonte (coleção onde o espécime se encontra ou citação bibliográfica). Os exemplares depositados nas coleções foram identificados com base em Lencioni (2005, 2006), Heckman (2006, 2008) e Garrison *et al.* (2006, 2010), além

de comparados com exemplares previamente identificados por outros especialistas. Posteriormente, verificou-se quais espécies foram registradas para o município de Conceição da Barra e se havia alguma espécie ameaçada de extinção a nível mundial (IUCN, 2012), nacional (MMA, 2014) ou estadual (PASSAMANI & MENDES 2007).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na CZNC foram analisados 105 exemplares de Odonata: oito famílias, 22 gêneros e 16 espécies. No banco de dados obteve-se 229 registros, 11 famílias, 25 gêneros e 51 espécies. O município de Conceição da Barra possui o registro de 11 famílias, 36 gêneros e 60 espécies. Libellulidae foi a família mais frequente, seguida de Coenagrionidae. Os gêneros mais comuns foram *Erythrodiplax*, *Micrathyria* e *Hetaerina*. Todas as famílias de libélulas, 50% dos gêneros e 27% das espécies do ES foram registradas nesse município.

Seis espécies tiveram o risco de extinção analisados a nível mundial (IUCN): *Nephepeltia phryne* (Perty), *Idioneura ancilla* (Selys), *Planiplax arachne* (Ris), *Erythrodiplax ochracea* (Burmeister) e *Hetaerina hebe* (Selys) na categoria não ameaçada (LC); *Mecistogaster amalia* (Burmeister) na categoria deficiente em dados (DD). Foram registradas quatro espécies ameaçadas em nível nacional: *Leptagrion acutum* na categoria Criticamente Ameaçado (CR), *Aceratobasis mourei* e *Leptagrion porrectum* na categoria Em Perigo (EN), e *Aceratobasis cornicauda* na categoria Vulnerável (VU). Foram registradas cinco espécies que constam na lista vermelha capixaba: *Leptagrion acutum* e *Idiogomphoides ictinia* na categoria Criticamente Ameaçado (CR), *Aceratobasis mourei*, *Leptagrion porrectum* e *Perilestes fragilis* na categoria deficiente em dados (DD).

A revisão da lista vermelha brasileira aumentou de oito (2013) para 18 espécies de libélulas (2014) ameaçadas de extinção, devido ao aumento do conhecimento sobre esses insetos. Em 2003 o ES possuía quatro espécies ameaçadas de extinção. O número de espécies declarado como ameaçado e o conhecimento de sua distribuição se dá principalmente pelo esforço de coleta e do número de pesquisadores na área. A identificação das espécies do grupo depositadas em coleções Entomológicas, como a Coleção Zoológica Norte Capixaba / CZNC, contribuiu na redução desse déficit. Esses dados estão contribuindo para indicar áreas a serem recuperadas e conservadas no PMMA de Conceição da Barra.

Muitos dos registros de Odonata foram na Reserva Biológica de Córrego Grande e no Parque Estadual de Itaúnas devido a conservação dos ambientes naturais e a um maior esforço de coletas nessas áreas. As unidades de conservação (UC's) são espaços territoriais, com características naturais relevantes, que têm a função de assegurar a representatividade de amostras significativas e ecologicamente viáveis das diferentes populações, habitats e ecossistemas do território nacional, preservando

o patrimônio biológico existente (SNUC). Porém, não estão livres das catástrofes naturais, como aconteceu com o Parque Estadual de Itaúnas, que sofreu dois grandes incêndios recentemente, um em dezembro de 2014 e o outro em dezembro de 2015.

De acordo com Watts e colaboradores (2005), as boas práticas de conservação dependem do entendimento da capacidade de dispersão histórica e atual associada aos processos adaptativos e neutros ligados à estrutura genética das populações e sua variação espacial e temporal. No mosaico de áreas preservadas e manchas de vegetação nativa, com a qualidade de habitat variável, mergulhadas em uma matriz de pastagem, silvicultura e agricultura, a capacidade de dispersão pode determinar quais espécies provavelmente vão persistir nos próximos 100 anos. Infelizmente, não há informação sobre essas características e esses dados podem ser incluídos em futuras ações conservacionistas. Considerando que populações pequenas estão vulneráveis se não receberem regularmente imigrantes de outras áreas (BOYCE, 1992; NUNNEY & CAMPBELL, 1993), é necessário conhecer os níveis de diversidade genética e de fluxo gênico dentro e entre as populações remanescentes das espécies de libélulas. É importante considerar que efeitos estocásticos em populações de insetos demograficamente instáveis podem levar a um acúmulo de diferenças genéticas localizadas, como as observadas em *Coenagrion mercuriale* (WATTS *et al.*, 2005). Nossas áreas de estudo são frequentemente isoladas por habitats potencialmente inóspitos (e.g. plantação de *Eucaliptus*, pastagens) e o aumento da conectividade entre fragmentos florestais pode reduzir o risco de extinção local, especialmente das espécies ameaçadas de extinção.

4 | CONCLUSÃO

O município de Conceição da Barra apresenta grande diversidade de Odonata (11 famílias, 36 gêneros e 60 espécies), incluindo uma espécie deficiente em dados (DD) em nível mundial, quatro espécies ameaçadas em nível nacional, duas espécies criticamente ameaçadas e três DD em nível estadual. A conservação dos fragmentos da Mata Atlântica e seus ecossistemas associados em Conceição da Barra e o aumento da conectividade entre eles irá contribuir significativamente para a conservação desse grupo de insetos.

REFERÊNCIAS

- BOYCE, M. S. **Population viability analysis.** Annual Review of Ecology and Systematics 23, 481-506. 1992
- CARDOSO, P.; BORGES, P. A. V.; TRIANTIS, K. A.; FERRANDEZ, M. A. & MARTIN, J. L. **Adapting the IUCN Red List criteria for invertebrates.** Biol. Conserv. 144:2432-2440. 2011a
- CARDOSO, P.; ERWIN, T. L.; BORGES, P. A. V. & NEW, T. R. **The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them.** Biol. Conserv. 144:2647-2655. 2011b

CARLE, F. L. **Environmental monitoring potential of the Odonata, with a list of rare and endangered Anisoptera of Virginia.** United States. *Odonatologica* 8(3):319-323. 1979

CASTELLA, E. **Larval Odonata distribution as a describer of fluvial ecosystems: the Rhône and Ain rivers, France.** *Advances Odonato.* 3:23-40. 1987

CONRAD, K. F.; WILLSON, K. H.; HARVEY, I. F.; THOMAS, C. J. & SHERRATT, T. N. **Dispersal characteristics of seven odonate species in an agricultural landscape.** *Ecography* 22:524–531. 1999

CONRAD, K. F.; WILLSON, K. H.; WHITHFIELD, K., HARVEY, I. F., THOMAS, C. J. & SHERRATT, T. N. **Characteristics of dispersing *Ischnura elegans* and *Coenagrion puella* (Odonata): age, sex, size, morph and ectoparasitism.** *Ecography* 25:439–445. 2002

CORBET, P. S. **An adult population study of *Pyrrhosoma nymphula* (Sulzer): (Odonata: Coenagrionidae).** *Anim. Ecol.* 21:206–222. 1952

CORBET, P. S. **Dragonflies: behavior and ecology of Odonata.** Comstock, Ithaca/NY, 829 p. 1999

DAVIES, D. A. L. **A synopsis of the extant genera of the Odonata.** Soc. Int. Odonatol. Rapid Comm. 3:1-59. 1981

DAVIES, D. A. L. & TOBIN, P. **The dragonflies of the world: a systematic list of the extant species of Odonata, vol. 1: Zygoptera.** Societas Internationalis Odonatologica. Rapid Communications (Suppl.) 3:1-127. 1984

DAVIES, D. A. L. & TOBIN, P. **The dragonflies of the world: a systematic list of the extant species of Odonata, vol. 2: Anisoptera.** Societas Internationalis Odonatologica. Rapid Communications (Suppl.) 5:1-151. 1985

DE MARCO Jr., P.; & VIANNA, D. M. **Distribuição do esforço de coleta de Odonata no Brasil: subsídios para escolha de áreas prioritárias para levantamentos faunísticos.** Lundiana 6 (supplement):13-26. 2005

FERREIRA-PERUQUETTI, P. S. & DE MARCO Jr., P. **Efeito da alteração ambiental sobre a comunidade de odonata em riachos de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil.** Revista Brasileira de Zoologia Curitiba 19(2):317-327. 2002

GARRISON, R. W.; ELLENRIEDER, N. V. & LOUTON, J. A. **Dragonfly Genera of the New World: An Illustrated and Annotated Key to the Anisoptera.** The Johns Hopkins University 384 p. 2006

GARRISON, R. W. **A Synonymic List of the New World Odonata.** California Department of Food & Agriculture, 38 p. 2010

GORHAM, C. & VODOPICH, D. Effects of acidic PH on predation rates and survivorship of damselfly nymphs. *Hydrobiologia*, Dordrecht 242:51-62. 1992

HAMADA, N. & DE OLIVEIRA S. J. Itens alimentares de larvas de *Rimanella arcana* (Needham, 1933) (Odonata: Amphipterygidae) na Amazônia Central, Brasil. *Entomotropica* 18(2):153-155. 2003

HAWKING, J. H. & NEW, T. R. **Interpreting dragonfly diversity to aid in conservation assessment: lessons from the Odonata assemblage at Middle Creek, north-eastern Victoria, Australia.** *Journal of Insect Conservation* 6:171–178. 2002

HECKMAN, C. W. **Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata – Zygoptera.**

Illustrated Keys to Known Families, Genera, and Species in South America. Springer, 694 p. 2006

HECKMAN, C. W. **Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata – Anisoptera.** **Illustrated Keys to Known Families, Genera, and Species in South America.** Springer, 725 p. 2008

IUCN, International Dragonfly Fund. **World species list.** 2003

IUCN, International Dragonfly Fund. **IUCN Red List Categories and Criteria:** Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 30 p. 2001

IUCN, International Dragonfly Fund. **IUCN Red List of Threatened Species:** Version 2012.2. 2012

KIRK, E. J. & PERRY, S. A. **Macroinvertebrate production estimates in the Kanawha River, West Virginia.** Hydrobiologia 281:39-50. 1994

LENCIONI, F. A. A. **Damselflies of Brazil: an illustrated identification guide, Volume 1: Non-Coenagrionidae Families.** FAA Lencioni, 332 p. 2005

LENCIONI, F. A. A. **Damselflies of Brazil: an illustrated identification guide, Volume 2: Coenagrionidae.** FAA Lencioni, 430 p. 2006

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M. & PAGLIA, A. P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.** MMA & Fundação Biodiversitas, Biodiversidade 19, 1.420 p. 2008

MAY, M. L. **Thermal adaptations of dragonflies, revisited.** Advances in Odonatology 5:71–88. 1991

MMA, **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção.** 2003

NUNNEY, L. & CAMPBELL, K. A. **Assessing minimum viable population size - demography meets population genetics.** Trends in Ecology & Evolution 8, 234-239. 1993

OERTLI, B.; JOYE, D. A.; CASTELLA, E.; JUGE, R.; CAMBIN, D. & LACHAVANNE, J. B. **Does size matter? The relationship between pond area and biodiversity.** Biological Conservation 104:59-70. 2002

PASSAMANI, M. & MENDES, S. L. (Orgs). **Espécies da fauna ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo. Ipema,** 140 p. 2007

PAULSON, D. R. **Odonata records from Nayarit and Sinaloa, Mexico, with comments on natural history and biogeography.** Odonatologica 31:359-370. 2002

PETR, T. **Populations changes in aquatic in vertebrates living on two plants in a tropical man-made lake.** Hydrobiologia 31:449-485. 1968

REHN, A. **Phylogenetic analysis of higher-level relationships of Odonata.** Systematic Entomology 28:181–239. 2003

SAMWAYS, M. J. **Diversity and conservation status of South African dragonflies (Odonata).** Odonatologica 28:13-62. 1999

SAMWAYS, M. J. **Insect Diversity Conservation.** Cambridge University Press, 356 p. 2005

SILSBY, J. **Dragonflies of the World.** Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 200 p. 2001

STEWART, D. A. B. & SAMWAYS, M.J. **Conserving dragonfly (Odonata) assemblages relative to**

river dynamics in an african savanna game reserve. Conservation Biology, Seattle 12(3):683-692.
1998

WATTS, P. C., THOMPSON, D. J., DAGUET, C., & KEMP, S. J. **Exuviae as a reliable source of DNA for population-genetic analysis of odonates.** Odonatologica 34, 183-187. 2005

FORMIGAS (Hymenoptera: Formicidae) ASSOCIADAS ÀS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE DE UMA HIDRELÉTRICA DO SUL DO BRASIL

Junir Antonio Lutinski

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, (UNOCHAPECÓ). Senador Attílio Fontana Av., 591-E, Efapi - CEP: 89809-000, Chapecó, SC, Brasil.

Cladis Juliana Lutinski

Laboratório de Biologia, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Av. Fernando Machado, 108 E, CEP 89802-112, Chapecó, SC, Brasil.

produção de hidroeletricidade no sul do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiversidade, conservação, mata atlântica, mirmecofauna, riqueza.

INTRODUÇÃO

A diversidade biológica brasileira é uma das maiores do mundo, um patrimônio natural ímpar, expresso nos diferentes Biomas (MARQUES; LAMAS, 2006), dentre eles, a Mata Atlântica (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003). Atividades antrópicas como a substituição de ambientes naturais por ambientes destinados ao cultivo agrícola, pecuária, instalações industriais, produção de energia e urbanização geram impactos ambientais que levam à perda de biodiversidade (MADEIRA et al., 2009; GARDNER, 2010; DIAMOND, 2012) e representam uma das importantes ameaças aos remanescentes da Mata Atlântica (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003).

Na região sul do Brasil, 48 Usinas Hidrelétricas (UHE) e 146 Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH) encontram-se em operação (ANEEL, 2016). Na matriz energética, as hidrelétricas representam uma alternativa de menor impacto comparado às usinas que utilizam combustíveis fósseis (KLIEMANN; DALARIVA, 2015). Contudo, a construção de

RESUMO: Formigas representam um grupo ecologicamente importante por apresentar potencial indicador de qualidade ambiental, posto que sua diversidade varia de acordo com a complexidade estrutural do ambiente. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de formigas da Área de Preservação Permanente do reservatório da Hidrelétrica Foz do Chapecó. Foram amostrados quatro ambientes com diferentes históricos de uso do solo, dois em Santa Catarina e dois no Rio Grande do Sul. Foram identificadas 55 espécies, pertencentes a 24 gêneros, 15 tribos e sete subfamílias. Este estudo apresenta um inventário de espécies capazes de colonizar ambientes isolados para o processo de regeneração natural. Apresenta informações relevantes para o entendimento da dinâmica de recuperação de APP de lagos formados para a

barragens pressupõe a supressão de vegetação, desalojamento de espécies e o revolvimento e a compactação do solo durante o processo de instalação, culminando com a formação do lago (BARBOSA FILHO, 2013; KLIEMANN; DALARIVA, 2015). Estas alterações se traduzem na perda de habitats, no deslocamento de espécies, em alterações microclimáticas locais e em uma reestruturação do ecossistema adjacente ao lago formado. Ecossistema que se forma na Área de Preservação Permanente (APP), prevista pelo código florestal brasileiro (BRASIL, 2012).

AAPP assume um papel importante na gestão de bacias hidrográficas, pois contribui para a estabilidade dos ciclos hidrológicos, biogeoquímicos e para a manutenção do equilíbrio ecológico (TUNDISI; TUNDISI, 2010). Segundo Bensusan (2006), as APP vêm sendo consideradas determinantes para a conservação da biodiversidade. Juntamente com os fragmentos florestais remanescentes, garantem as condições favoráveis para o estabelecimento e manutenção da fauna e da flora (GIBSON *et al.*, 2011; ULYSHEN, 2011). Considerando o crescente número de hidrelétricas instaladas na região sul do Brasil, nas últimas duas décadas, a fragmentação do Bioma Mata Atlântica e o endemismo associado a este Bioma, surge a necessidade de se compreender a dinâmica de regeneração de APP formadas em torno dos lagos de hidrelétricas e o seu potencial para a conservação da biodiversidade.

Formicidae é um grupo altamente funcional e especializado (PETTERS *et al.*, 2011) ecologicamente dominantes (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e importantes componentes dos ecossistemas terrestres, constituindo grande parte da biomassa animal (NAYANA *et al.*, 2016). São eficientes indicadores mudanças ecológicas (ANDERSEN; MAJER, 2004) e do estado de conservação (MAJER, 1983; ANDERSEN, 1997; KING *et al.*, 1998; SILVA; BRANDÃO, 1999; ALONSO, 2000; ILHA *et al.*, 2009). Sua associação íntima com a flora lhes dá propriedades bioindicadoras, correlacionando-as com o grau de conservação ambiental (LUTINSKI *et al.*, 2014; LUTINSKI *et al.*, 2016) e com a complexidade estrutural do habitat (FOWLER *et al.*, 1991; ARMBRECHT; PERFECTO; VANDERMEER, 2004). São afetadas pela regeneração da vegetação (RIBAS *et al.*, 2012), suas estreitas relações com a flora demonstram que o tipo e a intensidade da degradação ou da alteração do ambiente e podem produzir respostas diferenciadas, sendo algumas espécies beneficiadas e outras prejudicadas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A biodiversidade de formigas é expressiva nos ecossistemas terrestres (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), contudo, com grande sensibilidade para os impactos antrópicos que, associados com fatores bióticos e abióticos determinam a riqueza e influenciam na distribuição de espécies (PEREIRA *et al.*, 2007; LUTINSKI *et al.*, 2014; NAYANA *et al.*, 2016). São úteis para avaliar a resposta da biodiversidade animal para a restauração florestal (NEVES *et al.*, 2010; WETTERER, 2012). No contexto das APP, podem representar uma importante ferramenta para a avaliação do processo de recuperação do ambiente e da reconstituição da comunidade biológica.

Apesar da mirmecofauna da região austral do bioma Mata Atlântica ser bem

conhecida (SILVA; SILVESTRE, 2004; LUTINSKI et al., 2008; MACIEL et al., 2011; ULYSSÉA et al., 2011; LUTINSKI et al., 2014), ainda carecem de estudos acerca das assembleias de formigas associadas às APP no entorno dos lagos das hidrelétricas e sobre como o papel bioindicador destes insetos pode ser explorado na avaliação ambiental no período pós implantação. Os estudos já realizados nesta região permitem supor a existência de assembleias ricas de formigas presentes nos mais variados ambientes (LUTINSKI; GARCIA, 2005; IOP et al., 2009; LUTINSKI et al. 2008) e um estudo sobre a riqueza e abundância da mirmecofauna da APP do lago de uma das maiores UHE do sul do Brasil, acrescenta informações sobre a riqueza e distribuição das espécies, para os estados de Santa Catarina do Rio Grande do Sul, além de servir como base para estudos subsequentes. Conhecer esta riqueza e a composição das espécies de formigas que compõem estas assembleias é essencial para conhecer e compreender o processo de consolidação das APP e para subsidiar planos de conservação da biodiversidade. Diante deste contexto, este estudo teve como objetivo caracterizar as assembleias de formigas presentes na APP da UHE Foz do Chapecó, segundo a riqueza, abundância e composição.

MATERIAL E METODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido durante o mês de Janeiro de 2016, na área de APP do reservatório da UHE Foz do Chapecó, divisa entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A região está inserida no Bioma Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Mista) e o clima é do tipo superúmido mesotérmico subtropical úmido, sem estação seca definida, com geadas frequentes e com distribuição regular da pluviosidade (INMET, 2009).

O reservatório da UHE Foz do Chapecó tem uma área de 79,2 km² e possui uma capacidade instalada de 855 MW. Atingiu os municípios de Águas de Chapecó, Caxambú do Sul, Guatambu, Chapecó, Paial e Itá em Santa Catarina e Alpestre, Rio dos Índios, Nonoai, Faxinalzinho, Erval Grande e Itatiba do Sul no Rio Grande do Sul (FOZ DO CHAPECÓ, 2015). Foi formado no ano de 2010 e a APP contava, no período das amostras, com cinco anos de formação. Foram amostrados quatro ambientes, com área de dois hectares cada um, sendo dois em Santa Catarina, municípios de Guatambú (27°14'59"S; 52°41'06"W) e Caxambú do Sul (27°15'35"S; 52°42'40"W) e dois no Rio Grande do Sul, município de Rio dos Índios (27°17'38"S; 52°44'58"W e 27°20'41"S; 52°43'51"W).

O ambiente 1, localizado no município de Guatambú (GUA), encontra-se coberto por uma plantação de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) com idade de aproximadamente 10 anos. Quando da formação do lago, a vegetação presente na área demarcada

como APP não foi suprimida. Já é possível se observar um sub-bosque em formação, composto por vegetação nativa, com uma altura de até cinco metros. Não se observa a formação de serrapilheira e a área é cortada por diversas trilhas ocupadas por pescadores e veranistas.

O ambiente 2, localizado no município de Caxambu do Sul (CXS), se refere a uma área de lavoura, que após a formação do lago, foi isolada com cerca de arrame e deixada para regeneração. A vegetação nativa é composta majoritariamente por gramíneas e arbustos esparsos com até cinco metros de altura. A área é cortada por uma antiga estrada que dá acesso a veranistas até o lago.

O ambiente 3, situado no município de Rio dos Índios (RI1), se trata de um ambiente de pastagens que, assim como o ambiente 2, foi isolado para auto-recuperação. Neste ambiente são encontradas árvores porte adulto, esparsas, que já existiam antes da formação do lago. Além desta vegetação, o ambiente encontra-se coberto por gramíneas e pequenos arbustos.

O ambiente 4, também situado no município de Rio dos Índios (RI2), representa aquele em estágio mais avançado de regeneração. Encontra-se coberto por uma vegetação densa, com aproximadamente 20 anos de idade. O solo é coberto por uma serrapilheira bem formada. Trata-se de um fragmento florestal que, após a formação do lago, encontra-se inserido na demarcação da APP.

Amostragem

A amostragem foi conduzida com armadilhas pitfalls e com iscas de sardinha e iscas de glicose. Ao todo, 10 pitfalls e 20 iscas (dez de cada) foram distribuídas em transectos perpendiculares ao reservatório, equidistantes 10 metros entre si, sendo utilizado o mesmo número em cada ambiente. As armadilhas de solo (pitfall) para captura de formigas consistem em copos plásticos de 250 ml (10 cm de diâmetro por 12 cm de altura), enterrados, de maneira que sua borda fique ao nível do solo. Dentro de cada armadilha foram adicionados 150 ml de água com uma gota de detergente para quebrar a tensão superficial da água. As iscas sardinha (~1 g) e glicose (~1 mL) foram dispostas em retângulos de papel de 20X30 cm, sobre o solo. Os pitfalls permaneceram no ambiente por 48 horas e as iscas por uma hora (LUTINSKI et al., 2013).

Os espécimes amostrados foram acondicionados em frascos contendo álcool 70% e transportados para o Laboratório de Entomologia da Unochapecó para triagem e identificação.

Identificação

A identificação das amostras foi realizada com base em bibliografias como Gonçalves (1961), Kempf (1964), Kempf (1965), Watkins (1976), *Della Lucia* (1993),

Lattke (1995), Taber (1998), Fernández (2003), Longino (2003), Longino e Fernández (2007) e Wild (2007). Também foram comparados com os espécimes depositados na Coleção Entomológica da Universidade. A classificação foi baseada em Bolton (2003)..

Análise dos dados

A riqueza foi definida como o número de espécies de formigas que ocorreram em cada uma das amostras. A abundância foi definida com base na frequência relativa (número de registros de uma dada espécie em cada armadilha ou isca) e não com base no número de indivíduos. O número de registros minimiza o efeito dos hábitos de forrageamento e do tamanho das colônias e é mais apropriado para estudos de assembleias de formigas (ROMERO; JAFFE, 1989). A riqueza registrada para cada assembleia foi comparada por meio de análises baseadas no número de ocorrências (GOTELLI; COLWELL, 2001).

Aspectos legais

A realização do estudo foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, “Autorização para atividades com finalidade científica” nº 50739-1 de 30/11/2015.

RESULTADOS

Ao todo foram registradas 313 ocorrências de formigas, totalizando 55 espécies, 24 gêneros e sete subfamílias. A assembleia amostrada no ambiente GUA apresentou a maior riqueza ($S = 27$), seguido pelos ambientes 3 e 4 ($S = 26$) e o ambiente 2 ($S = 21$). Myrmicinae ($S = 27$), Formicinae ($S = 11$) e Ponerinae ($S = 6$) foram as subfamílias mais ricas. Os gêneros mais ricos foram *Pheidole* ($S = 11$), *Camponotus* ($S = 5$), e *Linepithema* ($S = 5$). Apenas oito espécies, *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), *Odontomachus chelifer* (Latreille, 1802), *Pachycondyla striata* F. Smith, 1858, *Pheidole (Pheidole) pubiventris* Mayr, 1887, *Pheidole (P.) risii* Forel, 1892, *Pheidole (P.) dyctiota* Kempf, 1972, *Pheidole (P.) punctatissima* Mayr, 1870, *Solenopsis* sp. 1, ocorreram nos quatro ambientes. A assembleia do ambiente 1 foi a que apresentou o maior número de espécies exclusivas ($S = 10$), seguida da assembleia do ambiente 3 ($S = 9$), ambiente 4 ($S = 8$) e ambiente 2 ($S = 4$) (Tabela 1).

A subfamília Myrmicinae presentou a maior riqueza sendo 21 espécies nos ambientes do RS e 16 em SC, 27 ao todo. Formicinae foi a segunda subfamília mais rica com oito espécies no RS e 10 em SC, totalizando 11. As espécies mais frequentes nas amostras foram *P. dyctiota* (GUA: 12%; CXS: 18%; RI1: 8%; RI2: 8%), *P. rissi* (GUA: 23%; CXS: 15%; RI1: 3%; RI2: 20%) e *P. striata* (GUA: 13%; CXS: 14%; RI1: 8%; RI2: 7%) (Tabela 1).

Táxon	GUA	CXS	RI1	RI2
Subfamília Dolichoderinae				
Tribo Dolichoderini				
<i>Linepithema humile</i> (Mayr, 1868)	0,07			
<i>Linepithema iniquum</i> (Mayr, 1870)		0,01		
<i>Linepithema micans</i> (Forel, 1908)	0,01			
<i>Linepithema</i> sp. 1		0,04		
<i>Linepithema</i> sp. 2			0,03	
Subfamília Ectatomminae				
Tribo Ectatommini				
<i>Ectatomma edentatum</i> Roger, 1863	0,04			
<i>Gnamptogenys striatula</i> Mayr, 1884		0,04		
<i>Gnamptogenys</i> sp.			0,03	
Subfamília Formicinae				
Tribo Camponotini				
<i>Camponotus (Myrmobrachys) crassus</i> Mayr, 1862	0,01	0,01	0,04	
<i>Camponotus (Myrmobrachys) mus</i> Roger, 1863	0,02	0,01	0,03	
<i>Camponotus (Myrmothrix) atriceps</i> (F. Smith, 1858)	0,01		0,01	
<i>Camponotus (Myrmothrix) rufipes</i> (Fabricius, 1775)	0,01	0,06	0,09	0,01
<i>Camponotus (Tanaemyrmex) lespesii</i> Forel, 1886		0,01		
Tribo Plagiolepidini				
<i>Brachymyrmex (Brachymyrmex) aphidicola</i> (Forel, 1909)	0,01		0,01	
<i>Brachymyrmex (Brachymyrmex) coactus</i> Mayr, 1887		0,01		
<i>Brachymyrmex (Brachymyrmex) cordemoyi</i> Forel, 1895	0,01			
<i>Nylanderia fulva</i> (Mayr, 1862)		0,01	0,04	
<i>Nylanderia</i> sp.			0,01	
<i>Paratrechina longicornis</i> (Latreille, 1802)	0,06	0,01	0,03	
Subfamília Heteroponerinae				
Tribo Heteroponerini				
<i>Heteroponera flava</i> Kempf, 1962	0,01			
<i>Heteroponera inermis</i> (Emery, 1894)	0,01		0,01	
Subfamília Myrmicinae				
Tribo Attini				
<i>Acromyrmex (Acromyrmex) aspersus</i> (F. Smith, 1858)	0,02			
<i>Acromyrmex (A.) subterraneus</i> (Forel, 1893)	0,01			
<i>Apterostigma pilosum</i> Mayr, 1865			0,01	
<i>Apterostigma</i> sp.	0,01		0,01	
<i>Cyphomyrmex rimosus</i> (Spinola, 1853)			0,04	
<i>Mycoceropurus goeldii</i> (Forel, 1893)	0,01			
<i>Mycoceropurus</i> sp.			0,01	
Tribo Blepharidattini				
<i>Wasmannia auropunctata</i> (Roger, 1863)		0,01	0,01	
Tribo Cephalotini				
Tribo Crematogastrini				
<i>Crematogaster (Eucrema) bingo</i> Forel, 1908			0,01	
<i>Crematogaster (Neocrema) corticicola</i> Mayr, 1887	0,02			
<i>Crematogaster (N.) magnifica</i> Santschi, 1925			0,01	0,01
Tribo Dacetini				

<i>Acanthognathus ocellatus</i> Mayr, 1887		0,01		
<i>Strumigenys cultrigera</i> Mayr, 1887			0,01	
<i>Strumigenys</i> sp.				0,01
Tribo Myrmicini				
<i>Pogonomyrmex naegelii</i> Forel, 1878		0,01		
Tribo Pheidolini				
<i>Pheidole (Pheidole) pubiventris</i> Mayr, 1887	0,07	0,04	0,09	0,04
<i>Pheidole (P.) risii</i> Forel, 1892	0,23	0,15	0,03	0,20
<i>Pheidole (P.) dyctiota</i> Kempf, 1972	0,12	0,18	0,08	0,08
<i>Pheidole (P.) punctatissima</i> Mayr, 1870	0,01	0,01	0,04	0,04
<i>Pheidole</i> sp. 1	0,02	0,07	0,08	
<i>Pheidole</i> sp. 2		0,04		0,03
<i>Pheidole</i> sp. 3	0,01	0,01		0,03
<i>Pheidole</i> sp. 4			0,05	
<i>Pheidole</i> sp. 5			0,01	
<i>Pheidole</i> sp. 6			0,08	0,01
<i>Pheidole</i> sp. 7			0,04	0,03
Tribo Solenopsidini				
<i>Solenopsis</i> sp. 1	0,01	0,04	0,03	0,07
Subfamília Ponerinae				
Tribo Ponerini				
<i>Dinoponera australis</i> Emery, 1901				0,03
<i>Neoponera villosa</i> (Fabricius, 1804)	0,01	0,01		
<i>Odontomachus affinis</i> Guérin-Méneville, 1844				0,04
<i>Odontomachus chelifer</i> (Latreille, 1802)	0,05	0,07	0,05	0,11
<i>Pachycondyla striata</i> F. Smith, 1858	0,13	0,14	0,08	0,07
<i>Pachycondyla harpax</i> (Fabricius, 1804)				0,01
Subfamília Pseudomyrmecinae				
Tribo Pseudomyrmecini				
<i>Pseudomyrmex gracilis</i> (Fabricius, 1804)			0,04	
Riqueza total	27	21	26	26

Tabela 1. Formigas amostradas na Área de Preservação Permanente do Lago da Usina Hidrelétrica da Foz do Chapecó, nos municípios de Guatambu (GUA) e Caxambu do Sul (CSX) em Santa Catarina e no município de Rio dos Índios (RI1 e RI2) no Rio Grande do Sul. Janeiro de 2016.

DISCUSSÃO

A mirmecofauna registrada neste estudo é expressiva comparada aos inventários já realizados na região. As 40 espécies amostradas nos ambientes dos municípios catarinenses representa 19,3 % daquela já descrita para a região oeste do estado (ULYSSÉA et al., 2011). Já a riqueza amostrada nos ambientes do município de Rio dos Índios, RS, representa 32,4% da mirmecofauna registrada por Cantarelli et al. (2015) para ambientes da região noroeste do estado gaúcho. As assembleias de formigas presentes nos ambiente são constituídas por subfamílias e gêneros com características reconhecidas pela sua importância nos diversos níveis tróficos do

ecossistema (HÖLLODOBLER; WILSON, 1990) e frequentes nos estudos regionais (LUTINSKI; GARCIA, 2005; LUTINSKI et al., 2008; ULYSSÉA et al., 2011; LUTINSKI et al., 2013; CANTARELLI et al., 2015; FLECK et al., 2015).

A subfamília Myrmicinae é dominante em Biomas brasileiros como Mata Atlântica e Cerrado, tanto em número de gêneros quanto de espécies. Algumas características são marcantes para o sucesso dessa subfamília, entre elas destacam-se a diversidade de hábitos alimentares e de nidificação (HÖLLODOBLER; WILSON, 1990). Além disso, a predominância de Myrmicinae pode ser explicada pelo fato de ser um grupo adaptado às alterações nas diferentes condições do ambiente podendo ocupar diversos nichos (FOWLER et al., 1991).

As espécies de *Linepithema* registradas são características de ambientes antropizados, apresentam ocorrências frequentes nos mais diversos ambientes do sul do Brasil (ULYSSÉA et al., 2011; LUTINSKI et al., 2014), dominam as fontes de alimento e recrutam massivamente nos ambientes (SILVESTRE et al., 2003). De acordo com Fernández (2003), pertencem a este gênero algumas das espécies mais importantes sob o ponto de vista do potencial de se tornarem pragas, com destaque para *L. humile*. O caráter onívoro dessas formigas e a ocorrência de cinco espécies deste gênero neste estudo é um indicativo de fragilidade do estado de recuperação ecológica em que os ambientes se encontram.

O gênero *Camponotus* foi o segundo mais rico no estudo. Aproximadamente 400 espécies deste gênero são descritas para a região neotropical, dentre as quais se observa acentuado polimorfismo e a onivoria é muito frequente. Podem ser observadas forrageando desde o solo até a copa das árvores. A defesa química e o mutualismo são comumente observados nas relações com outros organismos (SILVESTRE et al., 2003). *Camponotus crassus*, *C. mus* e *C. rufipes* são amplamente distribuídas em Santa Catarina (ULYSSÉA et al., 2011) e frequentes em ambientes antropizados (LUTINSKI et al., 2014).

O gênero *Pheidole* apresentou a maior riqueza e, juntamente com o gênero *Solenopsis* são descritas como formigas epígeas, onívoras e dominantes (SILVESTRE et al., 2003). A diversidade de espécies destes gêneros descritos para o Brasil (BACCARO et al., 2015) faz com que seja comum o registro de dezenas de espécies em estudos locais. A ampla distribuição geográfica e a grande habilidade de dispersão fazem com que algumas espécies se tornem localmente abundantes. Silvestre et al. (2003) associam a estes gêneros a nidificação no solo, formação de grandes colônias, indivíduos pequenos, monomórficos ou dimórficos com comportamento generalista e agressivo. São frequentemente encontradas em ambientes antropizados (LUTINSKI; GARCIA, 2005; LUTINSKI et al., 2014). Os tempos de apenas cinco anos de recuperação da APP, associado às alterações microclimáticas locais desencadeadas pela formação do lago caracterizam o grau de impacto ambiental sobre a flora e a fauna e podem explicar a riqueza de formigas destes gêneros nas amostras.

Foram registradas duas espécies de formigas cortadeiras, *Acromyrmex*. Formigas

deste gênero abundantes regionalmente (LUTINSKI et al., 2008; LUTINSKI et al., 2013). São descritas nove espécies com ocorrência na região oeste de Santa Catarina (ULYSSÉA et al., 2011) e dez para o estado do Rio Grande do Sul (LOECK et al., 2003), embora, neste estudo, nenhuma das espécies amostrada ocorreu nos ambientes gaúchos. Pertencem a este gênero algumas das espécies com o maior potencial de causar danos econômicos já que estão associadas aos desequilíbrios ambientais que resultam em desequilíbrios populacionais destas formigas e levam ao aumento da massa vegetal cortada (FERNÁNDEZ, 2003). Tratam-se de formigas polimórficas, endêmicas da região neotropical, que exercem importante papel na manutenção do solo, lugar que usam para a construção de seus ninhos. Suas galerias desempenham papel importante na aeração enquanto que seus excrementos eduosquanto que os restos vegetais truara asformigasamente forragear nas horas mais quentes do dia. resíduos vegetais residuais da ação dos fungos e têm função de enriquecer o solo (SILVESTRE et al., 2003).

A ocorrência de espécies dos gêneros *Acanthognathus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Dinoponera*, *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, *Heteroponera*, *Hypoponera*, *Mycocepurus*, *Neoponera*, *Pachycondyla*, *Odontomachus* e *Strumigenys* ressalta a importância do processo de regeneração da APP e a formação serrapilheira onde estas formigas encontram abrigo e alimento (SILVESTRE et al., 2003). *Acanthognathus*, *Dinoponera*, *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, *Heteroponera*, *Hypoponera*, *Neoponera*, *Pachycondyla*, *Odontomachus* e *Strumigenys* são formigas conhecidas como predadoras especializadas que forrageiam na serrapilheira e sobre o solo. De acordo com Lattke (2003), as formigas destes gêneros, compartilham, além do hábito predador, o hábito de construírem seus ninhos em troncos caídos, sob pedras ou na serrapilheira em geral. São identificadas no campo pela baixa agilidade, pela formação de colônias pequenas, pelo tamanho reduzido e por uma constrição entre o primeiro e o segundo segmento gastrál. Possuem afinidade com ambientes sombreados e úmidos. Predam pequenos invertebrados sem preferência específica. Já, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, e *Mycocepurus* utilizam a matéria orgânica morta para o cultivo de fungos que utilizam como alimento (SILVESTRE et al., 2003).

A onivoria e as características generalistas das formigas *Brachymyrmex*, *Crematogaster*, *Nylanderia*, *Paratrechina* e *Wasmannia* (SILVESTRE et al., 2003; LUTINSKI et al., 2014) podem explicar a ocorrência de espécies destes gêneros nos ambientes amostrados. O recrutamento massivo e o tamanho diminuto destas espécies (SILVESTRE et al., 2003; OLIVEIRA; CAMPOS-FARINHA, 2005) podem favorecer o domínio pelas fontes de alimento e a ocorrência nas áreas da APP.

Os resultados indicam que as mudanças na estrutura do habitat, promovido pelo incremento de riqueza e abundância da vegetação desde a formação do lago contribui para a manutenção de uma diversidade de formigas reconhecidamente importante nos diferentes níveis tróficos. Este resultados corrobora os estudos de Lassau et al. (2005), Lutinski et al. (2014) e Cantarelli et al. (2015).

Este estudo acrescenta informações sobre a riqueza e abundância de formigas que ocorrem em APP em processo de recuperação. Apresenta um inventário de espécies capazes de colonizar ambientes com diferentes históricos de uso do solo, isolados para um processo de regeneração natural. Considerando-se a mirmecofauna amostrada e a diversidade de outros organismos associados que a presença das formigas permite supor, o estudo apresenta informações relevantes para o entendimento da dinâmica de recuperação de APP de lagos formados para a produção de hidroelectricidade no sul do Brasil.

REFERENCIAS

- ALONSO, L. E. Ants as Indicator of Diversity. In: AGOSTI, D. et al. (Eds), **Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity**, Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, USA, 2000, p. 80-88.
- ANEEL. BIG – Banco de Informações de Geração, 2016. Disponível em: <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm>. Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL, Distrito Federal.
- ANDERSEN, A. N. Using Ants as Bioindicators: Multiscale Issue in Ant Community Ecology. **Conservation Ecology**, v. 1, p. 1-8, 1997.
- ANDERSEN, A. N.; MAJER, J. D. Ants show the way down under: invertebrates as bioindicators in land management. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n.6, p. 291–298, 2004.
- ARMBRECHT I.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Enigmatic biodiversity correlations: ant diversity responds to diverse resources. **Science**, v. 304, p. 284-286, 2004.
- BACCARO, B. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I. O.; IZZO, T. J.; SOUZA, J. L. P.; SOLAR, R. **Guia para gêneros de formigas no Brasil**, 1 ed., Manaus: INPA, 2015, 388 p.
- BARBOSA FILHO, W. P. **Impactos ambientais em usinas eólicas**. Agrener GD 2013, Belo Horizonte: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2013, p. 1-17.
- BENSUSAN, N. **Conservação da biodiversidade em áreas protegidas**, Rio de Janeiro: FGV, 2006 176 p.
- BOLTON, B. **Synopsis and classification of Formicidae**, Gainesville, USA: Memoirs of the American Entomological Institute, 2003, 370 p.
- BRASIL. Código Florestal. Lei nº 12.651 de 25 de maio de 2012, Brasília: **Diário Oficial da União**, 2012. Accessible at: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm
- CANTARELLI, E. B.; FLECK, M. D.; GRANZOTTO, F.; CORASSA, J. N.; D'AVILA, M. Diversidade de formigas (hymenoptera: formicidae) da serrapilheira em diferentes sistemas de uso do solo. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 607-616, 2015.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha da Mata, 1993, 262 p.
- DIAMOND, J. **Colapso**, 8th ed. Rio de Janeiro: Editora Record, 2012, 699 p.
- FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto

de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003, 433 p.

FLECK, M. D.; CANTARELLI, E. B.; GRANZOTTO, F. Registro de novas espécies de formigas (Hymenoptera: Formicidae) no estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, p. 491-499, 2015.

FOWLER, H. G. L.; FORTI, C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. "Ecologia Nutricional de formigas". In: PAZZINI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds), **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991, p. 131-209.

FOZ DO CHAPECÓ. **Informações on line sobre o consórcio da Hidrelétrica Foz do Chapecó**, 2015. Disponível em: <http://www.fozdochapeco.com.br>. Consórcio Foz do Chapecó, Florianópolis, Santa Catarina.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I. G. **The Atlantic Forest of South America. Biodiversity status, threats, and outlook**. Washington DC: Island Press, 2003, 488 p.

GARDNER, T. A. **Monitoring forest biodiversity: improving conservation through ecologically-responsible management**. London: Earthscan, 2010, 360 p.

GIBSON, L.; LEE, T. M.; KOH, L. P.; BROOK, B. W.; GARDNER, T. A.; BARLOW, J.; PERES, C. A.; BRADSHAW, C. J. A.; LAURANCE, W. L.; LOVEJOY, T. E.; SODHI, N. Primary forests are irreplaceable for sustaining tropical biodiversity. **Nature**, v. 478, p. 378-383, 2011.

GONÇALVES, C. R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil. **Studia Entomologica**, v. 4, p. 113-180, 1961.

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology Letters**, v. 4, p. 379-391, 2001.

HÖLLOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Massachusetts, Cambridge: Harvard University Press, 1990, 732 p.

ILHA, C.; LUTINSKI, J. A.; PEREIRA, D. V. M.; GARCIA, F. R. M. Riqueza de formigas (Hymenoptera: Formicidae) da Bacia da Sanga Caramuru, município de Chapecó-SC. **Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 95-105, 2009.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. In: RAMOS, A. M. et al. (Org), **Normais Climatológicas do Brasil 1961-1990**: edição revisada e ampliada. Brasília: INMET, 2009, 465 p.

IOP, S.; CALDART, V. M.; LUTINSKI, J. A.; GARCIA, F. R. M. Formigas urbanas da cidade de Xanxerê, Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v. 22, n. 2, p. 55-64, 2009.

KEMPF, W. W. A revision of the Neotropical fungus-growing ants of the genus *Cyphomyrmex* Mayr. Part 1: Group of *strigatus* Mayr. **Studia Entomologica**, v. 7, p. 1-44, 1964.

KEMPF, W. W. A revision of the Neotropical fungus-growing ants of the genus *Cyphomyrmex* Mayr. Part II: Group of *rimosus* (Spinola) (Hym., Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 8, p. 161-200, 1965.

KING, J. R.; ANDERSEN, A. N.; CUTTER, A. D. Ants as bioindicators of habitat disturbance: validation of the functional group model for Australia's humid tropics. **Biodiversity Conservation**, v. 7, p. 1627-1638, 1998.

KLIEMANN, B. C. K.; DELARIVA, R. L. Pequenas centrais hidrelétricas: cenários e perspectivas no estado do Paraná. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 274-283, 2015.

LASSAU, S. A.; HOCHULI, D. F.; CASSIS, G.; REID, C. A. M. Effects of habitat complexity on forest

beetle diversity: do trophic groups respond consistently? **Diversity and Distributions**, v. 11, p. 73-82, 2005.

LATTKE, J. Revision of the ant genus *Gnampogenys* in the New World (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 4, p. 137-193, 1995.

LATTKE, J. E. Subfamilia Ponerinae. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed), **Introducción a las hormigas de la región neotropical**. Bogotá, Colômbia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003, p. 261-276.

LOECK, A. E.; GRUTZMACHER, D. D.; COIMBRA, S. M. Ocorrência de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* nas principais regiões agropecuárias do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 129-133, 2003.

LONGINO, J. T. The *Crematogaster* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) of Costa Rica. **Zootaxa**, v. 151, p. 1-150, 2003.

LONGINO, J. T.; FERNÁNDEZ, F. Taxonomic review of the genus *Wasmannia*. In: SNELLING, R. R. et al. (Org), **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson - 50 years of contributions**. Memoirs of the American Entomological Institute, 2007, p.271-289.

LUTINSKI, J. A.; GARCIA, F. R. M. Análise faunística de Formicidae (Hymenoptera: Apocrita) em ecossistema degradado no município de Chapecó, Santa Catarina. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 73-86, 2005.

LUTINSKI, J. A.; GARCIA, F. R. M.; LUTINSKI, C. J.; IOP, S. Diversidade de formigas na Floresta Nacional de Chapecó, Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1810–1816, 2008.

LUTINSKI, J. A.; LOPES, B. C.; MORAIS, A. B. B. Diversidade de formigas urbanas (Hymenoptera: Formicidae) de dez cidades do sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 333-342, 2013.

LUTINSKI, J. A.; LUTINSKI, C. J.; LOPES, B. C.; MORAIS, A. B. B. Estrutura da comunidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em quatro ambientes com diferentes níveis de perturbação antrópica. **Ecología Austral**, v. 24, p. 229-237, 2014.

LUTINSKI, J. A.; BAUCKE, L.; FILTRO, M.; BUSATO, M. A.; KNAKIEWICZ, A. C.; GARCIA, F. R. M. Ant assemblage (Hymenoptera: Formicidae) in three wind farms in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 4, p. 1-9, 2016.

MACIEL, L.; IANTAS, J.; GRUCHOWSKI-W, F. C.; HOLDEFER, D. R. Inventário da fauna de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de sucessão ecológica florística no município de União da Vitória, Paraná. **Biodiversidade Pampeana**, v. 9, n.1, p. 38:43, 2011.

MADEIRA, B. G.; ESPÍRITO-SANTO, M. M.; D'ÂNGELO-NETO, S.; NUNES, Y. R. F.; SÁNCHEZ-AZOFÉIFA, G. A.; FERNANDES, G. W.; QUESADA, M. Changes in tree and Liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. **Plant Ecology**, v. 201, p. 291-304, 2009.

MAJER, J. D. Ants: bioindicators of Minesite Rehabilitation, land use, and land conservation. **Environment Management**, v. 7, p. 375-383, 1983.

MARQUES, A. C.; LAMAS, C. J. E. Taxonomia zoológica no Brasil: estado da arte, expectativas e sugestões de ações futuras. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 46, n. 13, p. 139-174, 2006.

NAYANA, P.; PRESTY, J.; BAABY, J.; LAKSHMI, P. D. M. Comparison of Ant (Hymenoptera: Formicidae) Diversity in Different Habitats of Machad Region of Thrissur. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 28-33, 2016.

NEVES, F. S.; BRAGA, R. F.; ESPÍRITO-SANTO, M. M.; DELABIE, J. H. C.; FERNANDES, G. W.; SANCHEZ-AZOFÉIFA, G. A. Diversity of arboreal ants an a Brazilian Tropical Dry Forest: Efects of seasonality and successional Stage. **Sociobiology**, v. 56, p. 177-194, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas urbanas do município de Maringá, PR, e suas implicações. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 33-39, 2005.

PEREIRA, M. P.; QUEIROZ, J.; VALCARCEL, R.; MAYHÉ-NUNES, A. J. Fauna de formigas como ferramenta para monitoramento de área de mineração reabilitada na Ilha da Madeira, Itaguaí, RJ. **Ciência Florestal**, v. 17, p. 197-204, 2007.

PETTERS, M. K.; LUNG, T.; SCHaab, G.; WÄGELE, J. W. Deforestation and the population decline of the army ant *Dorylus wilverthi* in western Kenya over the last century. **Journal of Applied Ecology**, v. 48, p. 697–705, 2011.

RIBAS, C. R.; SCHMIDT, F. A.; SOLAR, R. R. C.; CAMPOS, R. B. F.; VALENTIM, C. L.; SCHOEREDER, J. H. Ants as indicators of the success of rehabilitation efforts in deposits of gold mining tailings. **Restoration Ecology**, v. 20, n. 6, p. 712-720, 2012.

ROMERO, H.; JAFFE, K. A comparison of methods for sampling ants (Hymenoptera: Formicidae) in Savanna. **Biotropica**, v. 21, p. 348-352, 1989.

SILVA, R. R.; BRANDÃO, C. R. F. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) como indicadores da qualidade ambiental e da biodiversidade de outros invertebrados terrestres. **Biomas**, v. 12, n. 2, p. 55-73, 1999.

SILVA, R. R.; SILVESTRE, R. Diversidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) que habita as camadas superficiais do solo em Seara, Oeste de Santa Catarina. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 44, p. 1-11, 2004.

SILVESTRE, R.; BRANDÃO, C. R. F.; SILVA, R. R. Grupos funcionales de hormigas: el caso de los gremios del cerrado. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed), **Introducción a las hormigas de la región neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003, p.113-148.

TABER, S. W. The world of the harvester ants. College Station: Texas A & M University Press, 1998, 213 p.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Impactos potenciais das alterações do Código Florestal nos recursos hídricos. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 67-76, 2010.

ULYSHEN, M. D. Arthropod vertical stratification in temperate deciduous forests: Implications for conservation-oriented management. **Forest Ecology and Management**, v. 261, p. 1479-1489, 2011.

ULYSSÉA, M. A.; CERETO, C. E.; ROSUMEK, F. B.; SILVA, R. R.; LOPES, B. C. Updated list of ant species (Hymenoptera, Formicidae) recorded in Santa Catarina State, southern Brazil, with a discussion of research advances and priorities. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n.4, p. 603–611, 2011.

WATKINS, J. F. **The identification and distribution of New World army ants (Dorylinae: Formicidae)**. Waco: Markham Press Fund of Baylor University Press, 1976, 102 p.

WETTERER, J. K. Worldwide spread of Emery's sneaking ant, *Cardiocondyla emeryi* (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 17, n. 13-20, 2012.

WILD, A. L. Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae). **University of California Publications in Entomology**, v. 126, p. 1-159, 2007.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DA HERPETOFAUNA DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS CERES

Alexandre Pereira de Oliveira Filho

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Ceres
Ceres - Goiás

Marcos Vitor dos Santos Almada

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Ceres
Ceres - Goiás

Jorge Freitas Cieslak

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Ceres
Ceres - Goiás

testemunhos das espécies encontradas foram coletados, identificados, sacrificados e tombados em Coleção Zoológica. Foram encontrados 108 espécies da herpetofauna sendo 83 Anuras, 24 Squamata e 01 Testudine. O esforço amostral foi analisado com a curva de acumulação de espécies. Este inventário apresenta a oportunidade de conhecer a diversidade local de uma área do Cerrado, contribuindo para o conhecimento sobre a distribuição das espécies neste bioma e pode embasar futuros estudos sobre conservação em escala local.

PALAVRAS-CHAVE: Herpetofauna; anfíbios; répteis; coletas; exemplares.

ABSTRACT: Currently the Cerrado is considered a biodiversity hotspot, with a high number of endemic species (species restricted to a certain region) that characterize the region as a priority for conservation studies. Little information on the herpetofauna of the Cerrado is available, in view of the strong and rapid conversion of the Cerrado for various purposes, herpetofauna inventory studies have never been so necessary and urgent. In this way, the present study aimed to inventory the herpetofauna in the area of the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Ceres. Sampling was performed by Pitfall Traps and Active Search. Exemplary testimonies of the species

RESUMO: Atualmente o Cerrado é considerado um *hotspot* de biodiversidade, com elevado número de espécies endêmicas (espécie restrita a uma determinada região) que caracterizam a região como prioritária para estudos conservacionistas. Poucas informações a respeito da herpetofauna do Cerrado estão disponíveis, em vista à forte e rápida conversão do Cerrado para diversos fins, estudos de inventário da herpetofauna são necessários e urgentes. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo inventariar a herpetofauna na área do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Ceres. A amostragem foi realizada por Armadilhas de Interceptação e Queda (*Pitfall*), Procura Ativa e Encontros Ocasionais. Exemplares

found were collected, identified, sacrificed and will be listed in the Zoological Collection. As a result, 108 species of herpetofauna were found, being 83 Anuras, 24 Squamata and 1 Testudine. The sample effort was analyzed with the species accumulation curve. This inventory presents the opportunity to know the local diversity of an area of the Cerrado, contributing to the knowledge about the distribution of the species in this biome and can support future studies on conservation on a local scale.

KEYWORDS: Herpetofauna; amphibians; reptiles; collections; copies.

1 | INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma fitogeográfico brasileiro e um dos 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo, com elevado número de espécies endêmicas que caracterizam a região como prioritária para estudos conservacionistas (BASTOS, 2007; MITTERMEIER et al., 2004). A intensa ação antrópica convertendo a paisagem principalmente em áreas agrícolas, já modificou mais da metade da área original. Tais ações são responsáveis pela modificação em grande escala dos habitats naturais (KLINK; MACHADO, 2005).

O Brasil abriga a herpetofauna mais diversa do planeta, até o momento foram reconhecidas 1080 espécies de anfíbios (1039 Anuras, 05 Caudata e 36 Gimnophiona) e para répteis foram registradas 773 espécies com mais de 46 subespécies, totalizando 819 táxons divididos em Testudines (36 espécies), Crocodylia (06 espécies) e Squamata (731 espécies, sendo 266 de lagartos, 73 anfisbenídeos e 392 serpentes) (SBH, 2017).

Em vista à forte e rápida conversão do Cerrado em áreas para agricultura, pastagens, implementação de usinas hidrelétricas e ocupação humana, estudos intensivos de inventariamento da herpetofauna se fazem necessários e urgentes. Estes estudos são de extrema importância para melhor compreensão dos processos ecológicos e evolutivos que levaram à origem e distribuição da fauna. Atualmente, a perda de habitat é a principal causa de extinções e redução de diversidade no planeta (COLLEN, 2008). A conservação da biodiversidade depende diretamente de informações sobre a riqueza, composição e distribuição geográfica dos organismos (BROOKS et al., 2004).

A cidade de Ceres é um município localizado no Vale do São Patrício, região central do estado de Goiás, Brasil. Existe pouca informação sobre a diversidade da herpetofauna da região, apenas um estudo no município de Barro Alto, por Gambale et al. (2014), e ainda poucos estudos em regiões próximas, como no município de Niquelândia (Oda et al. 2009; Nomura et al. 2012).

Inventários da herpetofauna visam conhecer e caracterizar as espécies de anfíbios e répteis que ocorrem em uma região, contribuindo para o conhecimento sobre fauna, sendo estudos de base para trabalhos de manejo e conservação. Assim, o presente estudo tem o objetivo de inventariar a herpetofauna do IF Goiano - Campus Ceres.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em uma área de Cerrado, dentro dos limites do IF Goiano – Campus Ceres ($15^{\circ}12'5''S$; $49^{\circ}35'43''W$; 556m altitude), estado de Goiás. O período de amostragem da herpetofauna no campus foi realizada em dois ciclos o primeiro entre dezembro de 2017 a março de 2018, e o segundo em janeiro de 2019.

As visitas a campo foram realizadas quinzenalmente, as quais tiveram duração de quatro dias, totalizando 40 dias de coleta em campo, sendo elas realizadas nos períodos diurno e noturno para melhor amostragem de diferentes animais com diferentes hábitos. A coleta da Herpetofauna foi realizada através de: i) Armadilhas de Interceptação e Queda (modificado de ODA et al, 2009), ii) Procura Visual e Auditiva (Coletas ativas), além de encontros ocasionais (RÖDEL; ERNST 2004) e registro fotográfico.

As Armadilhas de Interceptação e Queda (*Pitfall traps*) foram construídas em forma de “Y” (Figura 1), ligadas por lona de plástico (0,5 m de altura e 05 m de comprimento e com ângulo de 120° entre as cercas). No centro do “Y” e nas extremidades de cada cerca foram enterrados baldes de 60 L (*pitfall*) com a borda superior (abertura) ao nível do solo, totalizando 4 baldes por armadilha (modificado de ODA et al 2009). As armadilhas permaneceram abertas apenas nos dias de visita a campo, sendo revisadas a cada 12 horas. Foram implantados três conjuntos de *Pitfall traps*, distribuídos de forma a caracterizar diferentes regiões encontradas no Campus (Tabela 1).

Exemplares testemunhos de cada espécie encontrada foram coletados e sacrificados (máximo de cinco espécimes por espécie). Os Anuras coletados foram sacrificados com lidocaína 5% e os répteis com uma câmara de éter (MORAIS et al, 2012), em seguida, foram fixados com solução de formaldeído 10%, conservados em álcool 70% e destinados a coleção Zoológica no próprio IF Goiano.

A nomenclatura utilizada para identificação das espécies seguiu Frost (2017) para anfíbios e Peters e Orejas-Miranda (1970), Peters e Danoso-Barros (1970), Colli e Oliveira (2004), Rodrigues (1987), Fenwick et al (2009) e Passos e Fernandes (2009) para répteis, além de consultas com especialistas.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IF Goiano, protocolado sob o CEUA nº 8593290917 na data de 10/10/2017 e sob o CEUA nº 4728311018 na data de 08/11/2018. O esforço amostral foi analisado com a curva de acumulação de espécies (GOTELLI; COLWELL, 2001) através de 100 aleatorizações pelo programa R (R Development Core Team, 2017).

Armadilha	Descrição do local
ARM1	Área de plantio agrícola, na divisa do Campus Ceres com outra propriedade (plantio de cana de açúcar).
ARM2	Área de transição de monoculturas para área de preservação permanente do Campus Ceres.
ARM3	No interior de uma área de proteção permanente do Campus Ceres.

Tabela 1: Descrição das localizações das armadilhas de interceptação e queda (Pitfall) instaladas para este estudo.

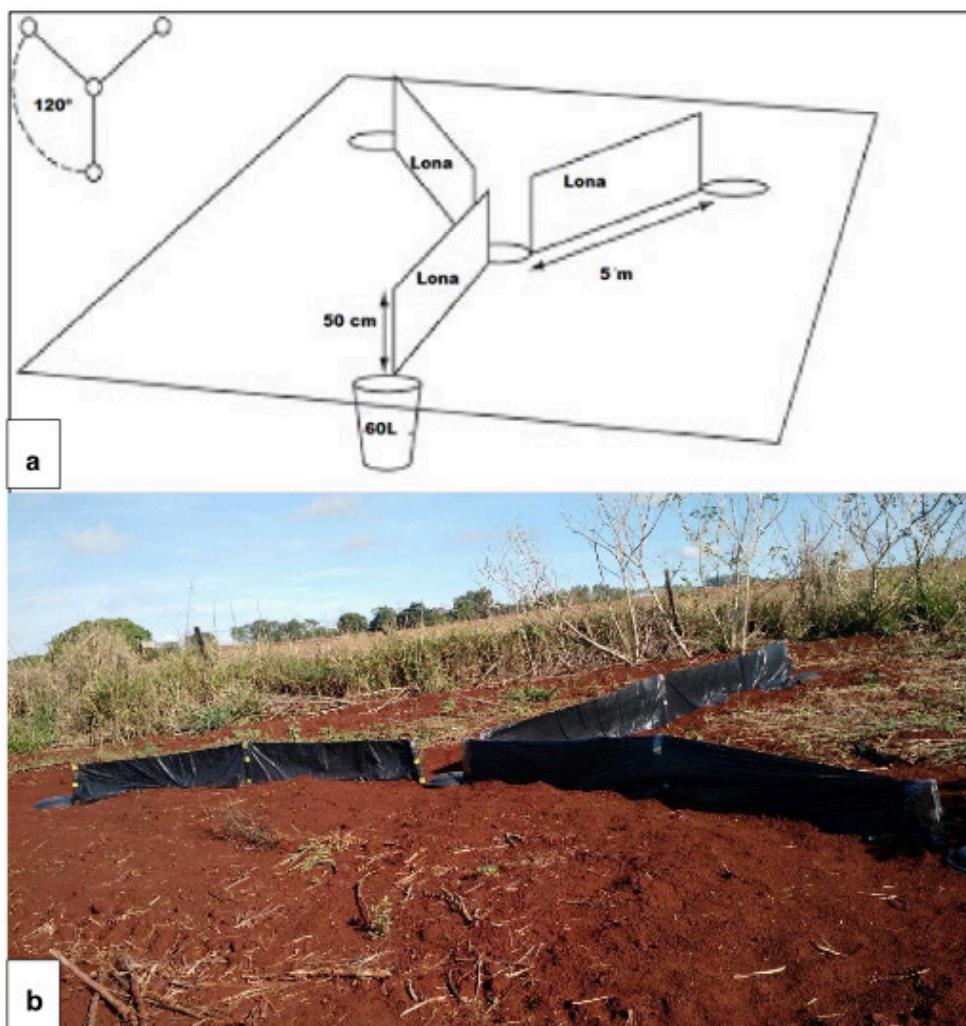


Figura 1: a: Desenho esquemático de construção das armadilhas de interceptação e queda (Pitfall); b: Armadilha de interceptação e queda construída (Pitfall).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi coletado um total de 108 espécimes da herpetofauna do IF Goiano – Campus Ceres, destas, 83 espécimes de Anuras e 24 espécimes de Squamata. Entre os Anuras, foram identificadas 13 espécies, distribuídas em quatro famílias e sete gêneros (Tabela 2). A família Leptodactylidae foi a mais representativa com sete espécies identificadas, seguida por Hylidae (três espécies), Microhylidae (duas espécies)

e Bufonidae (uma espécie). Entre os Squamata, foram identificados nove espécies (Tabela 2), distribuídas em sete famílias e oito gêneros. Sendo a família Dipsadidae a mais representativa com três espécies identificadas, seguida por Amphisbaenidae, Colubridae, Tropiduridae, Gekkonidae, Boidae e Viperidae com uma espécie cada (Figura 2). Por fim, um espécime de Testudine.

Ordem	Família	Espécie	Método de coleta
Anura	Microhylidae	<i>Chiasmocleis albopunctata</i> (Boettger, 1885)	PT
		<i>Elachistocleis cesarii</i> (Miranda-Ribeiro, 1920)	PT
	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus mystaceus</i> (Spix, 1824)	PT CA
		<i>Leptodactylus mystacinus</i> (Burmeister, 1861)	PT CA
	<i>Leptodactylus</i> sertanejo	(Giaretta e Costa, 2007)	CA
		<i>Physalaemus cuvieri</i> (Fitzinger, 1826)	PT CA
	<i>Leptodactylus</i> sp.	<i>Leptodactylus latinasus</i> (Jiménez de la Espada, 1875)	PT
		<i>Physalaemus nattereri</i> (Steindachner, 1863)	PT CA
		<i>Phyllomedusa</i> sp.	PT
		<i>Scinax</i> sp.	CA
		<i>Scinax fuscovarius</i> (A. Lutz, 1925)	CA
Squamata	Bufonidae	<i>Rhinella schneideri</i> (Werner, 1894)	PT CA EO
		<i>Lygophis meridionalis</i> (Schenkel, 1901)	EO
		<i>Oxyrhopus guibei</i> (Zaher e Caramaschi, 1992)	EO
	Dipsadidae	<i>Xenodon merremii</i> (Wagler, 1824)	EO
		sp.	EO
	Amphisbaenidae	<i>Sibynomorphus mikianii</i> (Fitzinger, 1843)	
		<i>Tropidurus torquatus</i> (Wied-Neuwied, 1820)	CA EO
	Gekkonidae	<i>Hemidactylus</i> sp.	CA
	Boidae	<i>Boa constrictor</i> (Lazell, 1964)	EO
	Viperidae	<i>Bothrops</i> sp.	EO
Testudine		sp.	CA

Tabela 2: Espécies de anfíbios/répteis registrados no IF Goiano - Campus Ceres Goiás, Brasil.

Legenda: PT = Pitfall Traps; CA = Coleta Ativa; EO = Encontros Ocasionais.

A riqueza total estimada para a herpetofauna local foi de 33 espécies (estimador Jackknife1), sendo que a curva de acumulação de espécies, baseada no esforço de coleta, não apresentou tendência para estabilização (Figura 3). Isso indica que o esforço amostral tem que ser ampliado, seja por maior eficiência nas coletas ativas, seja aumentando os conjuntos de armadilhas de interceptação e queda, pois se espera encontrar mais espécies cujo não foram amostradas no presente estudo.

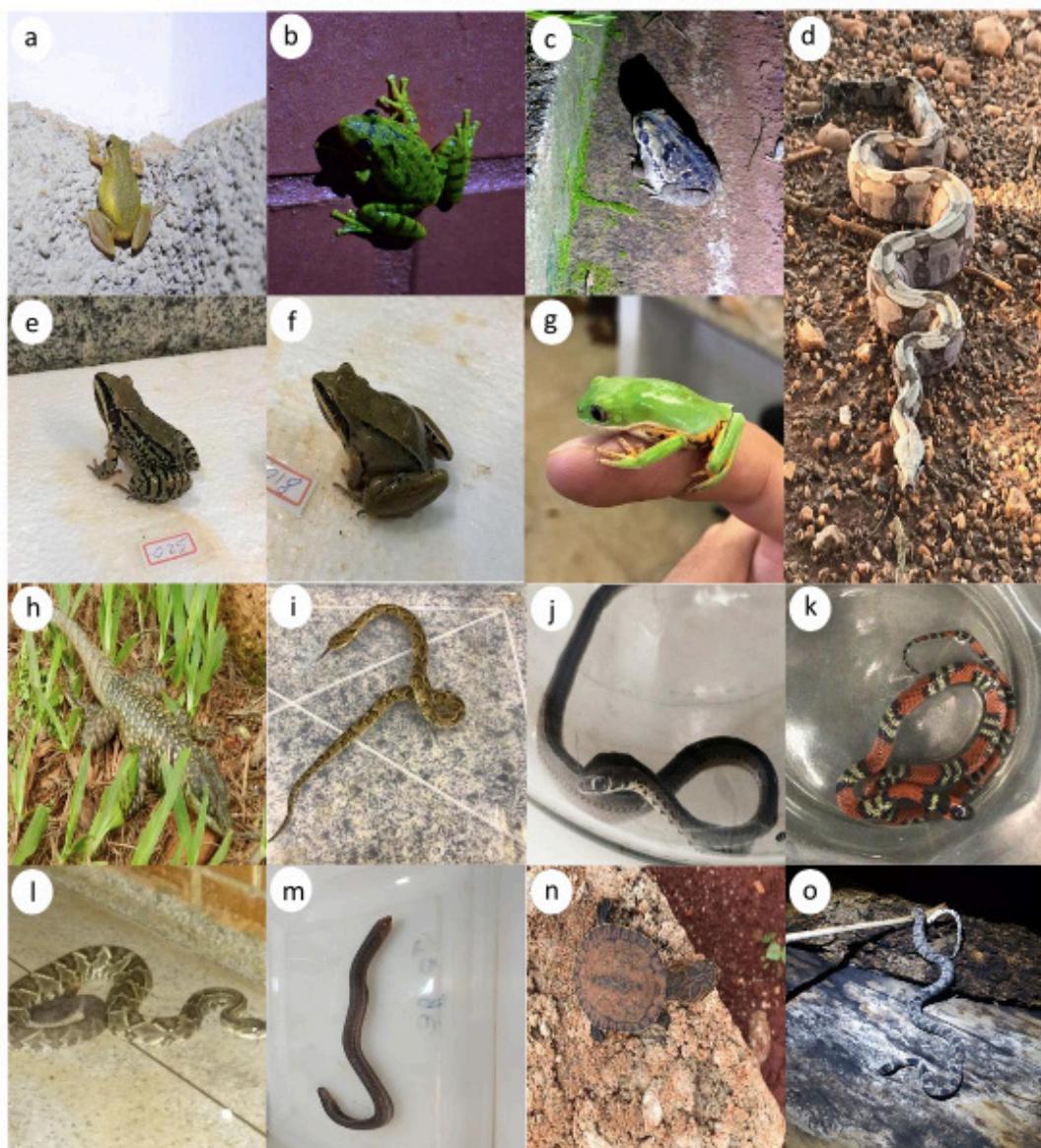


Figura 2: Espécies de anfíbios/répteis registrados no IF Goiano - Campus Ceres Goiás, Brasil. a) *Scinax sp*; b) *Scinax fuscovarius*; c) *Rhinella schneideri*; d) *Boa constrictor*; e) *Leptodactylus mystacinus*; f) *Leptodactylus mystaceus*; g) *Phyllomedusa sp*; h) *Tropidurus torquatus*; i) *Xenodon merremii*; j) *Lygophis meridionalis*; k) *Oxyrhopus guibei*; l) *Bothrops sp*; m) Amphisbaenidae; n) Testudine; o) *Sibynomorphus mikianii*.

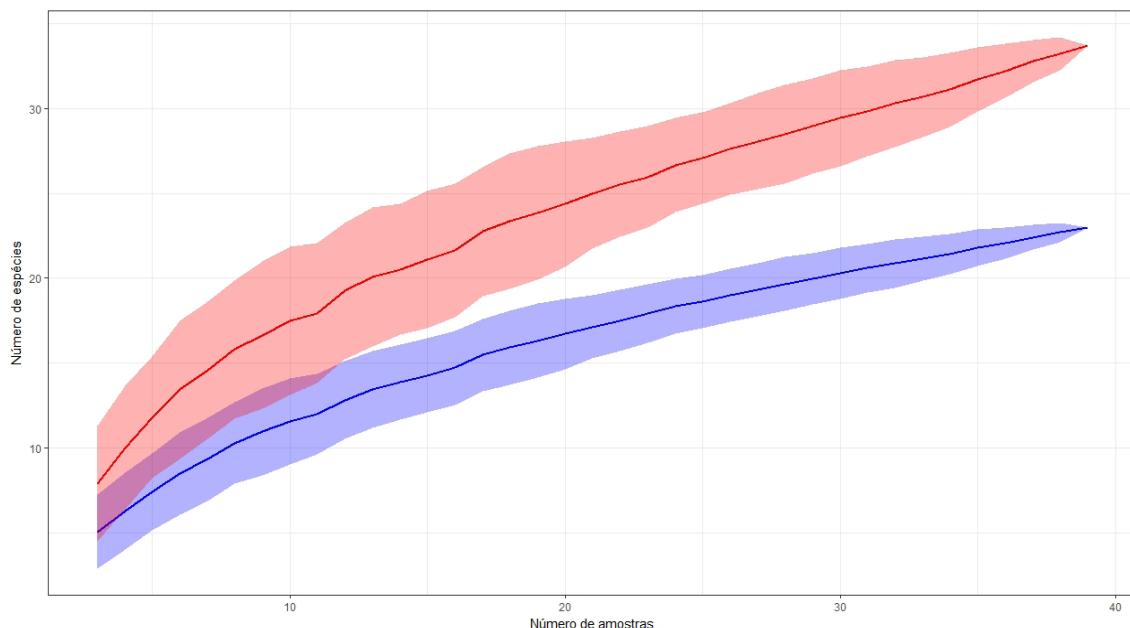


Figura 3: Curva de acumulação de espécies para riqueza observada (Azul) e estimada (Vermelho – estimador Jackknife1) da herpetofauna do IF Goiano - Campus Ceres, Goiás, Brasil. As linhas em cor sólida representam o número de espécies e a área em cor clara o respectivo desvio padrão.

Nenhuma das espécies da herpetofauna do IF Goiano Campus Ceres identificados até o momento é considerada de ameaçada de extinção. Contudo, segundo os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (da sigla em inglês IUCN) uma das espécies identificadas, a *Physalaemus nattereri*, tem tendência atual para diminuição de sua população (IUCN, 2019).

A herpetofauna do IF Goiano - Campus Ceres é composta por espécies com diferentes requerimentos ecológicos. O registro dessa diversidade de espécies foi possível devido à complementariedade de métodos de amostragens e aos diferentes *habitats* amostrados, uma vez que *habitats* abertos (e.g. cerrado *stricto sensu*) e fechados (e.g. mata seca) foram inventariados.

A degradação ambiental no Brasil, em especial no Cerrado, decorre da exploração agropecuária de forma equivocada, transformando consideravelmente o seu perfil, resultado da ampliação do desmatamento, compactação do solo, erosão, assoreamento de rios, contaminação da água subterrânea, e acarretando na perda de sua biodiversidade (Cunha, 2008). Desta forma, revelando a importância de estudos herpetofauna no Cerrado para conservação da biodiversidade (conjunto de todas as espécies de seres vivos existentes na biosfera) da mesma.

4 | CONCLUSÃO

O trabalho de inventário da herpetofauna do IF Goiano – Campus Ceres mostrou a importância das áreas de preservação ambiental do Campus para a fauna local. Com base nesses dados é possível propor medidas de conservação, uma vez que o Campus Ceres está inserido em uma grade de intensa exploração do solo, com

plantações de monoculturas e pastagens.

Porém, o inventário da herpetofauna do IF Goiano - Campus Ceres apresentou resultados incipientes, tendo em vista ser um dos primeiros trabalhos com identificação de espécies para uma região que ainda pouco estudada. Mesmo assim, apresentando potencial de que ocorra um número maior de espécies na região, que podem eventualmente incluir espécies raras ou endêmicas.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, R. P. **Anfíbios do Cerrado. Herpetologia o Brasil II.** Sociedade Brasileira de Herpetologia. Belo Horizonte, p.87-100, 2007.
- BROOKS, T. M.; FONSECA, G. A. B.; RODRIGUES, A. S. L. **Protected Areas and Species.** Conservation Biology, 18(3), 616–618, 2004
- COLLEN, B.; RAM, M.; DEWHURST, N.; CLAUSNITZER, V.; KALKMAN, V.; CUMBERLIDGE, N.; BAILLIE, J. E. M. **Broadening the coverage of biodiversity assessments.** Gland, Switzerland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN, 2008. 9 p.
- COLLI, G. R., & OLIVEIRA, L. E. (2004). **Guia dos Lagartos do Distrito Federal.** Disponível em: <http://www.unb.br/ib/zoo/grcolli/index.htm> Acessado em dezembro 2017.
- CUNHA, N.R.S.; LIMA, J. E.; GOMES, M.F.M. et al. **A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil.** Rev. Econ. Sociol. Rural vol.46 no.2, 2008.
- FENWICK, A. M., GUTBERLET, R. L., EVANS, J. A., & PARKINSON, C. L. **Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae).** Zoological Journal of the Linnean Society, 156, 617–640, 2009.
- FROST, D. (2017). **Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference.** Acessado em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- GAMBALE, P. G., WOITOVICZ-CARDOSO, M., VIEIRA, R. R., BATISTA, V. G., RAMOS, J., & BASTOS, R. P. **Composição e riqueza de anfíbios Anuras em remanescentes de Cerrado do Brasil Central.** Iheringia - Serie Zoologia, Porto Alegre, 104(1), 50–58, 2014.
- GOTELLI, N. J., & COLWELL, R. K. **Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness.** Ecology Letters, 4(4), 379–391, 2001.
- IUCN (2019) **Red List of Threatened Species.** Version 2018-2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> Acessado em junho de 2018.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R. 2005. **Conservation of the Brazilian Cerrado.** Conservation Biology, 19:707-713.
- MITTERMEIER, R. A.; ROBLES, G. P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J. & DA FONSECA, G. A. B. **Hotspots Revisited.** N.L. Mexico, CEMEX. 390p, 2004.
- MORAIS, A. R., BASTOS, R. P., VIEIRA, R., & SIGNORELLI, L. **Herpetofauna of the Floresta Nacional de Silvânia, a Cerrado remnant in Central Brazil.** Neotropical Biology and Conservation,

NOMURA, F.; MACIEL, N. M.; PEREIRA, E. B.; BASTOS, R. P. Diversidade de Anuras (*Amphibia*) em áreas recuperadas de atividade mineradora e de plantio de *Eucalyptus urophylla*, no Brasil central. Bioscience Journal, Uberlândia, 28(2), 312–324, 2012.

ODA, F. H.; BASTOS, R. P.; LIMA, M. A. D. C. S. Taxocenose de anfíbios Anuras no Cerrado do Alto Tocantins, Niquelândia, Estado de Goiás: diversidade, distribuição local e sazonalidade. Biota Neotropica, 9(4), 219–232, 2009.

PASSOS, P.; FERNANDES, R. Revision of the *Epicrates cenchria* complex (Serpentes: Boidae). Herpetological Monographs, 22, 1–30, 2009.

PETERS, J. A.; DONOSO-BARROS, R. Catalogue of the neotropical Squamata II. Lizards and amphisbaenias. United States National Museum Bulletim, 297(2), 1–293, 1970.

PETERS, J. A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata I. Snakes. United States National Museum Bulletim, 297(1), 1–347, 1970.

R Core Team. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em <http://www.r-project.org>. Acessado em 2017

RÖDEL, M.O.; ERNST, R. Measuring and monitoring amphibian diversity in tropical forests. I. An evaluation of methods with recommendations for standardization. Ecotropica. 10:1-14, 2003.

RODRIGUES, M. T. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). Arquivos de Zoologia, 31(3), 105–230, 1987.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br>. Acessado em Fevereiro de 2017.

CRIAÇÃO DE PACAS (*Cuniculus paca*) COMO ALTERNATIVA DE DIVERSIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RENDA EM RIO BRANCO - ACRE

Francisco Cildomar da Silva Correia

Universidade Federal do Acre – UFAC, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco – Acre

Reginaldo da Silva Francisco

Universidade Federal do Acre – UFAC, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco – Acre

Valderi Tananta de Souza

Universidade Federal do Acre – UFAC, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco – Acre

Vania Maria Franca Ribeiro

Universidade Federal do Acre – UFAC, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco – Acre

Fábio Augusto Gomes

Universidade Federal do Acre – UFAC, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco – Acre

índices econômicos para criação de 36 matrizes e 12 reprodutores, sendo um macho para três fêmeas, em sistema intensivo de produção, considerando-se a construção do galpão com o uso de parte da matéria-prima disponível na região, mão de obra local de profissionais autônomos, assistência técnica fornecida por órgãos públicos, alimentação adquirida na propriedade, animais fornecidos pelo IBAMA, por meio de doações e/ou capturados, mão de obra familiar para criação dos animais, custo de produção dos animais, valor da carne vendida para restaurantes R\$35,00/Kg, preço do prato individual comercializado pelos restaurantes, porção de 250g R\$30,00/40,00 e 50,00, dependendo do restaurante. Os resultados destacaram como principais custos para a implantação da atividade, a construção das instalações, considerando-se matéria-prima e mão de obra. Além disso, constatou-se que a criação comercial de pacas pode se tornar uma alternativa viável da diversificação de produção e renda para produtores da região.

PALAVRAS-CHAVE: Criação comercial de pacas, Sistema intensivo de produção, Viabilidade econômica.

ABSTRACT: For feasibility and performance of commercial activity, we need to study for economic and financial evaluation, verification of the opportunities and risks relevant to the

RESUMO: Para iniciar uma atividade comercial, estudos neste segmento devem ser realizados para verificação da viabilidade econômica e financeira, analisando as oportunidades e os riscos pertinentes ao projeto. Dessa forma, a finalidade deste estudo foi analisar indicadores de viabilidade de custo-benefício dos investimentos para um projeto de criação comercial de pacas (*Cuniculus paca*), em Rio Branco-Acre. Para este estudo utilizou-se

project. Therefore, the purpose of this study was to analyze the investment cost-benefit feasibility indicators for a commercial breeding project pacas (*Cuniculus paca*) in Rio Branco-Acre. For this study we used economic indices for creating arrays 36 and 12 breeders, with a male to female three in intensive production system, considering the construction of the shed with the use of the available raw material in the region hand local work of independent professionals, technical assistance provided by public agencies, gained power in the property, animals supplied by IBAMA through donations and / or captured, family labor for animal husbandry, production cost of animals, the value of meat to Restaurants will be R\$35.00kg, the price of individual plate to be sold by restaurants, 250g portion of R\$30.00/40.00 and 50.00, that depending on the restaurant. The results highlighted as major costs for the implementation of activity the construction of the facility, considering raw materials and labor. The results of this study found that trade creation of pacas can become a viable alternative to diversify production and income for producers in the region.

KEYWORDS: Commercial breeding of pacas, System intensive production, Economic viability.

1 | INTRODUÇÃO

Existem apenas um gênero e duas espécies de pacas, que são: *Cuniculus paca* L. e *Cuniculus tacjanowiskii* L.. Essas duas espécies habitam lugares distintos (PÉREZ, 1992; MOREIRA; MACDONALD1997; NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 1999). Sendo *C. tacjanowiskii*, encontrada apenas na região andina e *C. paca*, em uma grande variedade de habitats na América do Sul, que vai desde a Bacia do Rio Orinoco até o Paraguai. A paca é um animal de hábitos noturnos e que, geralmente, vive próximo de lagos, rios ou riachos, em florestas tropicais úmidas (ZUCARATTO; CARRARA; FRANCO, 2010). *C. paca* e *C. tacjanowiskii*, pertencem a ordem Rodentiae e família Cuniculidae. A espécie *C. paca* é considerada o segundo maior roedor encontrado no Brasil, sendo o primeiro a capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* L. (PEREI-RA; NORONHA; VARGAS, 2014).

A paca encontra-se entre as espécies em processo de extinção local, segundo a União Internacional de Conservação da Natureza – IUCN - (STRADIOTTI et al., 2007). A criação de pacas e de outros animais silvestres da fauna brasileira tem sido considerada, nas últimas décadas, uma alternativa usual para conservação de áreas de florestas nativas e a diminuição da caça predatória (LOURENCO; DIAS; GOMES, 2008). Além disso, possibilita a diversificação de produção e de renda para produtores rurais de diferentes regiões do país.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis criou a Portaria IBAMA nº 117/97, que trata sobre a comercialização da paca. Nessa mesma portaria, o Art. 7º estabelece que o criadouro de animais da fauna silvestre brasileira com fins comerciais, devidamente registrados pelo IBAMA, poderá comercializar somente animais, produtos e derivados provenientes de reprodução, recria ou manejo

em cativeiro (IBAMA, 1997). Atualmente, a criação e comercialização de produtos e subprodutos da fauna silvestre brasileira é regulamentada pela Instrução Normativa IBAMA 169, de 20 de fevereiro de 2008.

A criação de pacas, na forma de agricultura familiar, pode ser importante economicamente, considerando-se que já existe, por parte da população amazônica, o hábito de consumir carne de animais silvestres e, por esse motivo, há um mercado promissor para carnes exóticas. A carne de paca é uma rica fonte de proteína animal, além disso, seu couro possui elevada demanda no mercado internacional (LUI; NETO, 2008).

Na tentativa de reduzir a caça predatória, tem-se buscado a criação de pacas em cativeiro, principalmente na forma de manejo intensivo. Essa atividade representa uma alternativa de conservação, no que tange ao aumento de sua reserva populacional, diminuição da caça e do tráfico, além de contribuir para a conservação das áreas marginais às florestas ou às reservas.

Segundo Campo-Rozo e Ulloa (2003), para fortalecer o consumo de proteína animal na Amazônia, propõe-se a criação em cativeiro como um sistema de uso racional das espécies da fauna silvestre, que é uma proposta admissível para as espécies mais consumidas pela comunidade da região, pois a criação de animais silvestres tem sido apontada como uma possível fonte de proteína animal para populações mais pobres do interior de países em desenvolvimento, como o Brasil (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 2000).

Para a criação de pacas em cativeiro, costuma-se adotar o sistema de convivência de três a cinco fêmeas para um macho em baias de 12m² (HOSKEN; SILVEIRA, 2001; RIBEIRO; ZAMORA, 2008), pois as gerações de pacas nascidas em cativeiro tendem a tornar-se sociáveis e dóceis (SMYTHE, 1991; HOSKEN, 1998).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a viabilidade econômica da implantação da criação comercial de pacas em Rio Branco - Acre, e determinar indicadores de custo-benefício dos investimentos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de viabilidade econômica e financeira foi elaborado a partir de pesquisa de mercado, por meio do levantamento de preços da matéria-prima necessária para construção do galpão de manejo, nas principais lojas de material de construção, lojas de ferragens e madeireiras, em Rio Branco, Acre, no mês de junho de 2015. Obtiveram-se também preços de mão de obra local de carpinteiros e pedreiros para construção do galpão, utilizando-se profissionais liberais (autônomos). Também foi efetuada pesquisa acerca dos valores que os restaurantes estão dispostos a pagar pelo quilo da carne e o preço a ser repassado ao consumidor final, ou seja, o valor praticado pelos restaurantes por uma porção individual de 250g de carne de paca,

como também o lucro obtido pelo produtor.

A pesquisa de preço considerou a construção de um galpão para criação de 48 animais, sendo 36 matrizes e 12 reprodutores, levando em consideração a receita estimada com a venda dos animais, tendo como base o peso médio por carcaça de 6 Kg/animal a U\$\$ 11,32/Kg e o número de animais comercializados/ano.

A consulta de valores referentes a algumas das matérias-primas foi realizada em três estabelecimentos diferentes, considerando-se material de construção e ferragens, três profissionais autônomos (pedreiros e carpinteiros), três operadores de motosserra, para extração de madeira disponível na propriedade para construção do galpão e três estabelecimentos comerciais, especializados na venda de alimentos (restaurantes).

Além da estrutura física necessária para criação das pacas, que é representada pelo galpão, o manejo desses animais utiliza outros equipamentos, como: brincos de identificação, comedouros e bebedouros produzidos a partir de material reciclado (pneus), EPI (avental de polietileno, botas com biqueira plástica e luvas de borracha), produtos de limpeza (detergente limpador e cal para pintura) e equipamentos (pá, vassoura, mangueira, balde, facão e enxada), necessários para higienização do criatório, que é feita pelos próprios criadores; bem como atenção com a saúde dos animais, por meio de assistência técnica especializada, fornecida por órgãos governamentais, o que não acarreta gastos para o produtor.

Para avaliar a viabilidade de investimento em um criatório comercial de pacas, foram realizadas algumas análises e calculados indicadores nesse sentido. De acordo com Miranda et al. (2010), com adaptações, dentre os indicadores, podem-se destacar os seguintes:

Custos Fixos: Custo fixo total (CFT) - comprehende os valores que não sofrem alteração, independentemente da quantidade produzida (q), à medida que o custo fixo médio (CFMe) é proporcionalmente contrário à produção. Assim, à medida que se aumenta a quantidade de animais produzidos, o total de custos não se altera, mesmo existindo diluição desse valor ao longo da produção. O principal custo fixo identificado no criatório de pacas é a depreciação das instalações.

$$CFMe = \frac{CFT}{q}$$

Custos Variáveis: Custo variável total (CVT) - comprehende os valores que sofrem variações, de acordo com a quantidade produzida (q). O custo variável médio (CVMe) representa a soma do custo variável total e a quantidade produzida. Dentre custos variáveis, listam-se os gastos com a identificação dos animais.

$$CVMe = \frac{CVT}{q}$$

Custo do Capital: Corresponde a quanto o investidor deixa de receber ao investir seu dinheiro na criação de pacas. A taxa aplicada na análise para o cálculo de custo do capital empregado é de 6% ao ano, usualmente empregada nos investimentos privados e equivalente ao rendimento da caderneta de poupança em 2015.

Valor Presente Líquido: Corresponde aos custos de oportunidade do capital. O investimento na criação de pacas só pode ser considerado viável se o seu valor líquido presente for considerado positivo.

Relação Custo-Benefício: Corresponde ao quantitativo de entrada de recursos no caixa menos o valor investido anualmente.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plantel analisado correspondeu a 36 matrizes e 12 reprodutores, gerando um plantel estabilizado quando alcançar um número médio de 59 animais, prontos para serem comercializados a partir do quinto ano, considerando-se que os indivíduos são capturados da fauna local ou recebidos pelo IBAMA, depois de sofrerem maus tratos, tráfico ou de doações, os mesmos não se apresentam adaptados ao novo ambiente (cativeiro) (LOURENCO; DIAS; GOMES, 2008) (Tabela 1).

Discriminação	Ano (0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Plantel estabilizado
Reprodutores	12	12	12	12	12	12	12
Matrizes	36	36	36	36	36	36	36
Crias	28	36	43	54	57	57	275
Natalidade (10%)	3	3	4	5	6	6	27
Mortalidade (5%)	1	2	2	2	3	3	13
Total de Animais	72	79	85	95	96	96	98
Compras	0	0	0	0	0	0	0
Total de vendas	0	20	26	36	37	37	59

Tabela 1: Desenvolvimento e Estabilização do Plantel no período de cinco anos.

A Tabela 1 está baseada em uma taxa de prenhez de 40% no primeiro ano, 50 % no segundo ano, 60% no terceiro ano, 75% no quarto ano, 80% no quinto ano, período em que alcança estabilização do plantel e, a partir, tem-se uma taxa de prenhez 85% ao ano, uma taxa de mortalidade de 5% e uma taxa de natalidade de 10%. O Intervalo considerado entre partos é de seis meses, o que corresponde a dois partos por ano, sendo que o tamanho da prole é de uma cria por parto (LOURENCO; DIAS; GOMES, 2008).

A comercialização dos animais pode ser iniciada a partir do primeiro ano, sendo possível estimar a receita por meio do preço unitário de venda. A média de preço em junho de 2015 foi de U\$\$ 11,29/Kg, com o animal atingindo o peso médio de seis quilos, rendendo a média de U\$\$ 67,74 por carcaça, valores estes pagos em Rio

Branco, AC, preço bem inferior ao que é praticado nas capitais Belo Horizonte, São Paulo e Rio de Janeiro, nas quais variam de U\$\$ 19,35 a 29,03/Kg (LOURENCO; DIAS; GOMES, 2008).

Na Tabela 2, observa-se uma tendência crescente de receita, entre os anos zero e cinco, quando o plantel se estabiliza. Isto ocorre como consequência direta do número de animais nascidos e comercializados.

Discriminação	Ano (0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Vendas	0	20	26	36	37	37
Receita	0	1.354,83	1.761,29	2.438,70	2.506,45	2.506,45

Tabela 2: Evolução das Receitas com a Comercialização das pacas (U\$\$ 3,10).

A Tabela 3 apresenta os dados de receitas com a comercialização da porção individual de carne de paca nos restaurantes.

Discriminação da porção individual (U\$\$)	9,67	12,90	16,12
Lucratividade por kg (U\$\$)	27,41	40,32	53,22
Lucratividade (%)	71%	78%	82,5%

Tabela 3: Receitas com a comercialização da porção individual (250g) de carne de paca nos restaurantes de Rio Branco (U\$\$ 3,10).

Para a construção do galpão com largura de 09m x 18m de comprimento, dividido em 12 baias de 12m², medida considerada adequada para criação de 48 animais, distribuídos em três fêmeas e um macho por baia, levou-se em consideração todos os insumos ofertados na propriedade, principalmente, a extração da madeira, feita por um operador de motosserra profissional, em que se faz o beneficiamento desse material (tábuas, peças, mourões etc.) para a construção, diminuindo, assim, o capital de investimento da obra.

Quanto aos insumos a serem adquiridos em lojas de materiais de construção, tais como: cimento, telha, areia, dobradiça, prego, brita, chapa de zinco, tijolos e tela; também foram feitos levantamentos conforme pesquisas no mercado local. Na Tabela 4, pode-se observar a média dos valores dos materiais a serem utilizados na construção do galpão.

Descrição	Unidade	Valor Médio Unidade	Valor
Cimento	10 sacas	10,34	103,40
Telha	66und	4,28	282,48
Areia	5m	79,35	396,75
Dobradiças	22und	5,69	125,18
Prego	10Kg	2,47	24,70
Tijolo	1 milheiro	217,74	217,74

Tela 1m ½	142m	2,51	356,42
Brita	2m	93,00	186,00
Chapa de Zinco 1,5m	78m	16,07	1.253,46
Operador de motosserra	1	290,32	290,32
Total			3.236,45

Tabela 4 – Valor médio dos materiais utilizados na construção do galpão (cotação de junho de 2015/ U\$\$ 3,10).

Quanto aos investimentos anuais para manejo do plantel (brinco de identificação, materiais de limpeza, conjunto de EPI e equipamentos) não foram consideradas variações de preços no decorrer dos cinco anos até a estabilização do plantel, por motivos de não haver estimativas de inflação para esses insumos. Abaixo, seguem as tabelas referentes aos investimentos e custos ao ano, na construção e manutenção do criatório (investimentos e gastos ano zero (Tabela 5), custos para o ano zero (Tabela 6), custos para o ano um (Tabela 7), custos para o ano dois (Tabela 8), custos para o ano três (Tabela 9), custos para o ano quatro (Tabela 10), custos para o ano cinco (Tabela 11).

Discriminação	Valor	Acumulado
Galpão	3.236,45	3.236,45
Mão de obra	3.145,16	3.145,16
Remuneração de capital – 6%	6.381,61	

Tabela 5: Discriminação dos Investimentos e Gastos no Ano zero (U\$\$ 3,10).

No ano zero tem-se um investimento de U\$\$ 6.381,61 devido à necessidade de contratação de mão de obra especializada, carpinteiros, pedreiros e operador de motosserra, bem como a aquisição de insumos não disponíveis na propriedade como ferragens e materiais de construção, o que ocasionou a elevação dos valores.

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo	-	-	-	1.077,85
Mão de obra para manejo	-	-	-	744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/ Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	72	1,01	72,72
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPI	Und	3	10,20	30,60
Equipamentos	Und	6	8,69	52,14
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51

Custo operacional total	-	-	-	1.120,96
Custo operacional efetivo	-	-	-	1.077,85
Depreciação do galpão	%	4	1.077,85	43,11
Custo total	-	-	-	1.188,21
Custo Operacional Total	-	-	-	1.120,96
Remuneração de capital	%	6	1.120,96	67,25
Custo total				1.188,21

Tabela 6: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano zero (U\$\$ 3,10).

* medicamentos e assistência veterinária fornecidos por órgãos públicos, não gerando gastos.

** alimentação natural adquirida na propriedade, não gerando custos.

O custo de manutenção inicial para criação de pacas *C. paca*, é estabelecido em U\$\$ 1.188,21. Este valor se deve ao fato de que, inicialmente, faz-se necessário a identificação dos animais, aquisição de material de limpeza, equipamentos para higienização do criatório e materiais de segurança individual EPI, já nos anos seguintes estes valores tendem a diminuir, como é o caso apresentado na Tabela 7.

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo				958,75
Mão de obra para manejo				744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	36	1,01	36,36
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPIs	-	-	-	-
Equipamentos	-	-	-	-
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51
Custo operacional total				997,10
Custo operacional efetivo				958,75
Depreciação do galpão	%	4	958,75	38,35
Custo total				1.056,92
Custo Operacional Total				997,10
Remuneração de capital	%	6	997,10	59,82
Custo total				1.056,92

Tabela 7: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano 1(U\$\$ 3,10).

As despesas de manutenção para o primeiro ano correspondem a U\$\$ 1.056,92, valor este inferior ao do ano zero, o que se deve ao fato de não haver gastos com a identificação dos animais adultos, aquisição de EPIs e produtos para higienização do criatório.

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo				1.048,56
Mão de obra para manejo				744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	43	1,01	43,43
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPI	Und	3	10,20	30,60
Equipamentos	Und	6	8,69	52,14
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51
Custo operacional total				1.090,50
Custo operacional efetivo				1.048,56
Depreciação do galpão	%	4	1.048,56	41,94
Custo total				1.155,93
Custo Operacional Total				1.090,50
Remuneração de capital	%	6	1.090,50	65,43
Custo total				1.155,93

Tabela 8: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano dois (U\$\$ 3,10).

Os custos de manutenção para o segundo ano é de U\$\$ 1.155,93, havendo um aumento comparado ao ano anterior, isso se deve a necessidade de aquisição de EPIs e equipamentos para higienização do criatório.

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo	-	-	-	976,93
Mão de obra para manejo	-	-	-	744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	54	1,01	54,54
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPI	-	-	-	-
Equipamentos	-	-	-	-
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51
Custo operacional total	-	-	-	1.016
Custo operacional efetivo	-	-	-	976,93
Depreciação do galpão	%	4	976,93	39,07
Custo total	-	-	-	1.076,96
Custo Operacional Total	-	-	-	1.016
Remuneração de capital	%	6	1.016	60,96
Custo total				1.076,96

Tabela 9: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano três (U\$\$).

No terceiro ano, a taxa de reprodução está em 60%, o que garante mais animais a serem identificados, no entanto, não há aquisição de equipamentos para higienização do criatório e EPIs, fazendo com que os custos estejam avaliados em U\$\$ 1.076,96 inferior ao ano anterior.

No quarto ano, o plantel tem uma taxa de reprodução de 75%, elevando-se assim os gastos com a identificação dos animais, bem como aquisição de equipamentos para higienização do criatório e EPIs, elevando o valor de manutenção para U\$\$ 1.171,51 valor superior ao ano anterior.

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo	-	-	-	1.062,70
Mão de obra para manejo	-	-	-	744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	57	1,01	57,57
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPIs	Und	3	10,20	30,60
Equipamentos	Und	6	8,69	52,14
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51
Custo operacional total	-	-	-	1.105,20
Custo operacional efetivo	-	-	-	1.062,70
Depreciação do galpão	%	4	1.062,70	42,50
Custo total	-	-	-	1.171,51
Custo Operacional Total	-	-	-	1.105,20
Remuneração de capital	%	6	1.105,20	66,31
Custo total				1.171,51

Tabela 10: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano quatro (U\$\$ 3,10).

Discriminação	Unidade	Quantidade	Valor	Total
Custo Operacional Efetivo	-	-	-	979, 96
Mão de obra para manejo	-	-	-	744,60
Familiar	Horas	730	1,02	744,60
Medicamentos/Assistência	-	-	-	*
Alimentação	-	-	-	**
Brincos de identificação	Und	57	1,01	57,57
Materiais de limpeza	Und	24	4,72	113,28
Conjunto de EPIs	-	-	-	-
Equipamentos	-	-	-	-
Transporte dos animais	-	-	-	-
Taxa anual do Ibama	Und	1	64,51	64,51
Custo operacional total	-	-	-	1.019,15
Custo operacional efetivo	-	-	-	979, 96

Depreciação do galpão	%	4	979, 96	39,19
Custo total	-	-	-	1.080,29
Custo Operacional Total	-	-	-	1.019,15
Remuneração de capital	%	6	1.019,15	61,14
Custo total				1.080,29

Tabela 11: Estimativa dos custos para manutenção do plantel no ano cinco (U\$S).

No quinto ano, o plantel apresenta uma taxa de reprodução de 80%, alcançando a estabilidade ao atingir 85% de reprodução ao ano, esses níveis de reprodução aumentam o número de animais a serem identificados, elevando-se, assim, os gastos que, mesmo não adquirindo equipamentos para higienização do criatório, nem EPIs, o custo com a manutenção do plantel chega U\$S 1.080,20.

Deve-se ressaltar que o galpão de criação dos animais sofre uma depreciação anual de 4% e vida útil de 20 anos, valores adicionados aos custos de manutenção do criatório, além de haver uma remuneração de capital de 6%, já incluída no custo efetivo de manutenção. Ao fim dessas análises verificou-se, os indicadores de viabilidade do criatório do ano zero ao ano cinco, descrito a seguir, na Tabela 12.

Discriminação	Ano (0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Custo total anual	1.149,16	895,26	1.101,03	1.022,05	1.053,46	1.025,40
Venda de animais	0	1.354,83	1.761,29	2.438,70	2.506,45	2.506,45
Lucro líquido anual	0	459,57	660,25	1.416,65	1.452,99	1.481,35

Tabela 12: Indicadores de viabilidade do criatório de pacas (em U\$S 3,10).

Ao fazer a análise do capital investido, observa-se que o maior investimento se refere à construção das instalações (galpão) para confinamento dos animais, representando cerca de 85,5% do capital investido. Os demais custos estão relacionados ao manejo dos animais, no decorrer de toda a atividade, com pequenas variações. Nota-se também que há diferença nos custos de manutenção anual, pois os equipamentos para higienização do criatório e EPIs são substituídos a cada dois anos, já que ambos possuem vida útil de dois anos, o que ocasiona diferença nos valores. Outra diferenciação está relacionada aos gastos com a identificação dos animais que, no primeiro ano (ano 0), foram utilizados 72 brincos de identificação; nos anos seguintes diminuiu a quantidade, uma vez que só serão utilizados nas crias.

Alimentação, medicamentos, assistência veterinária e aquisição dos animais não foram considerados como gastos adicionais, já que os animais são fornecidos pelo IBAMA, por meio de doações e/ou capturados na propriedade; a assistência veterinária é fornecida por órgãos governamentais. Quanto à mão-de-obra, é realizada pelos proprietários, que se encarregam da manutenção dos animais. Nesse caso, foi calculado valor unitário da hora trabalhada e total de horas investidas no manejo, uma vez que o manejo diário de pacas se resume ao fornecimento de alimentos, água

e medicamentos, limpeza de comedouros, bebedouros e instalações, representando cerca de duas horas de trabalho por dia. Diante disso, os valores totais de horas trabalhadas podem ser considerados como lucro para o produtor.

A alimentação dos animais foi determinada com base numa dieta balanceada com frutas, verduras, legumes, raízes e outros alimentos produzidos na propriedade e em seu entorno, o que representa significativa redução nos custos de produção, sem comprometer a nutrição e o desenvolvimento dos animais.

A partir dos custos anuais considerados para a atividade, é possível estimar o montante de investimentos e gastos do empreendimento até alcançar a estabilidade do plantel. A análise foi realizada buscando-se somente a viabilidade econômica e financeira, não sendo considerados os benefícios ambientais provenientes da atividade.

Os níveis de desempenho zootécnicos e econômicos são em parte devido ao meio em que os animais estão submetidos, os quais assemelham-se ao seu habitat natural, reduzindo assim o estresse da adaptação e traduzindo-se em potencial de produção e reprodução, pois um ambiente estressante pode gerar várias respostas negativas, dependendo apenas da capacidade do animal de adaptar-se (BAETA; SOUZA, 1997). Além de ser uma fonte econômica viável é, sobretudo, uma forma de preservação das espécies, mediante a conservação dos habitats naturais e porcentagem de reposição obrigatória por parte dos criadores (ROCHA, 2001).

4 | CONCLUSÃO

A criação comercial de pacas (*Cuniculus paca*) pode ser uma alternativa viável de diversificação de produção e renda para os produtores rurais, no que se refere ao retorno do capital investido, com poucas horas de trabalho destinadas aos cuidados do plantel. Já para os proprietários de restaurantes é recomendável pela alta lucratividade obtida com a comercialização do produto, abrangendo também os benefícios ao meio ambiente, em decorrência do manejo destes animais.

É importante destacar ainda que o estudo em questão enfoca benefícios ambientais, no entanto, considerou-se apenas valores de uso direto, excluindo-se os indiretos, como a preservação da fauna brasileira, a diminuição da caça e do tráfico, a competição com essas atividades ilícitas e a garantia de uso futuro (pelas gerações posteriores) do bem ambiental preservado, mediante o baixo custo de aquisição da carne de paca pelos restaurantes locais e a facilidade de consumo pela população, já que é vista como uma iguaria, não só pelos acreanos, como também pela população amazônica e em outras localidades do país.

REFERÊNCIAS

BAETA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em Edificações Rurais**. Conforto Animal. 246p. UFV, 1997.

CAMPO-ROZO, C.; ULLOA, A. **Perspectivas y tendencias en torno al manejo de fauna participativo en América Latina**. p. 27-50, 2003.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. **Criação de Paca**. Viçosa: Aprenda Fácil, p. 262, 2001.

HOSKEN, M. F. **Criação comercial de pacas**. Viçosa, Minas Gerais: Manual Técnico, p. 54, 1998.

IBAMA – Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal; MMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria nº 118-N / 97, de 15 de outubro de 1997- criadouros comerciais da fauna silvestre brasileira**. Disponível em: <www.ibama.gov.br/cartas.../77-legislacao_fauna>. Acesso em: 28 jun. de 2015.

LOURENCO, R. F. S.; DIAS, R. S.; GOMES, A. P. A. **Criação de paca (*Agouti pacificus*) como alternativa de diversificação de produção e renda em Minas Gerais**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Rio Branco, AC. Anais... p.1-20. (Resumo), 2008.

LUI, J. F.; NETO, A. C. Conservação e uso de animais silvestres. In: SEVERINO GONZAGA NETO. **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Zootecnia e X Congresso Internacional de Zootecnia**. 10 ed. João Pessoa PB: Zootec, v. 18, p. 1-10, 2008.

MIRANDA, R. J. S. et al. Viabilidade econômica da criação de caititus (*Tayassutajacu*): Um estudo de caso. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, 48., 2010, Campo Grande, Brasil. Anais... Campo Grande: SOBER, Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/720.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia, p. 186-213, 1997. In: VALLADES-PÁDUA, C.; BODMER, R. E.; WELLER, J. L. **Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil**. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Pará.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C. Criação comercial de animais silvestres: Produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 31, n. 2, p. 188-195, 2000.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. **Criação de Pacas (*Agouti pacificus*)**. Piracicaba: FEALQ, p. 60, 1999.

PEREIRA, T. G.; NORONHA, C. M. S.; VARGAS, E. T. Monitoramento do comportamento reprodutivo e territorialista de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no IFMG-Campus Bambuí. In: **I Mostra de Extensão do IFMG - Campus Bambuí**, 2014.

PÉREZ, E.M. MammalianSpecies - Agouti pacificus. **The American society of Mammalogists**. n. 404, p. 1-7, 1992.

RIBEIRO, V. M. F.; ZAMORA, L. M. **Pacas e capivaras criação em cativeiro com ambientação natural**. Rio Branco-AC: Bagaço, p. 48, 2008.

ROCHA D. C.C.; CARDOZO, R. M. Desenvolvimento estratégico na criação e manejo de animais silvestres em Guarapuava-PR., - In: **ZOOTEC 2001**. 09 a 11 de maio de 2001. Goiânia-GO.

SMYTHE, N. Steps toward domesticating the paca (*Agouti=Cuniculus pacificus*) and prospects for the future. In: ROBINSON, J. G.; REDFORD, K. H. **Neotropical wildlife use and conservation**. University of Chicago Press, Chicago, USA. p. 202-216, 1991.

STRADIOTTI, C. G. P. et al. Estudo hematológico de pacas (*Agouti pacificus*, L.1766) sob condições de cativeiro. **XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-graduação** - Universidade do Vale do Paraíba, 2007. Disponível em: <<http://www>>.

inicepg.univap.br/cd/INIC_2008/anais/arquivosEPG /EPG01236_01_O.pdf. Acesso em: 28 jun. de 2015.

ZUCARATTO, R.; CARRARA, R.; FRANCO, B. K. S. Dieta da pacá (*Cuniculus paca*) usando métodos indiretos numa área de cultura agrícola na Floresta Atlântica brasileira. **Biotemas (UFSC)**, v. 23, p. 235-239, 2010.

FISCALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO: AVIFAUNA RESGATADA PELO MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA

Diego Silva Macedo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e
Biológicas.

Cruz das Almas - Bahia

Alanna Barreto dos Santos

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e
Biológicas.

Cruz das Almas - Bahia

Lucas Gabriel Souza Santos

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e
Biológicas.

Cruz das Almas - Bahia

a partir do número de aves resgatadas em um único ano (2015). Foram resgatadas 160 aves, distribuídas em 26 espécies. A ordem Passeriforme foi a mais bem representada com 96 espécimes, seguida da Psittaciforme com 62, e Falconiformes e Gruiformes com 1 representante cada. Com isso foi constatado a importância da existência de órgãos ambientais responsáveis, comprometidos com a fiscalização, a fim de combater o tráfico e criação ilegal de animais silvestres

PALAVRAS-CHAVE: Avifauna; Fiscalização; Tráfico de animais.

OVERSIGHT AND CONSERVATION:

RESCUED AVIFAUNA FOR MINISTERIO

PUBLICO OF STATE OF BAHIA

ABSTRACT: The Brazil is one of the most megadiverse countries in the world, and the birds are very representative in this respect. However, these animals are often victims of trafficking. Measures are being adopted with the aim of minimizing the impact of this illegal practice on the taxon. Thus, the objective of this study was to raise the number of wild birds sent to the Wild Animals Triage Center (CETAS) by the Regional Environmental Prosecutor of the State Public Ministry of Bahia, based in the municipality of Santo Antônio de Jesus. After the

RESUMO: O Brasil é um dos países mais megadiversos no mundo, e as aves tem grande representatividade nesse quesito. Contudo, esses animais, corriqueiramente, são vítimas do tráfico. Medidas veem sendo adotadas com o objetivo de minimizar o impacto dessa prática ilícita sobre o táxon. De tal maneira, o objetivo deste estudo foi levantar o número de aves silvestres encaminhadas ao Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) pela Promotoria Ambiental Regional do Ministério Público Estadual da Bahia, sediada no município de Santo Antônio de Jesus. Após as análises, pudemos verificar a eficiência dos trabalhos

analyzes, we verified the efficiency of the work from the number of birds rescued in a single year (2015). 160 birds were rescued, distributed in 26 species. The Passeriform Order was the best represented with 96 specimens, followed by the Psittaciform with 62, and Falconiformes and Gruiformes with 1 representative each. With this, it was verified the importance of the existence of responsible environmental agencies, committed to inspection, in order to combat the illegal trafficking and creation of wild animals

KEYWORDS: Avifauna; Oversight, Animals Trafficking.

1 | INTRODUÇÃO

O Brasil é classificado entre os países com maior biodiversidade (ROCHA, 1995; MYERS *et al.*, 2000), ocupando a terceira posição em riqueza de aves (IBAMA, 2002). Em 2014 o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) catalogou 1902 espécies de aves no Brasil. Entretanto, alguns fatores tem favorecido a extinção das espécies, aspectos especialmente relacionados a ações antrópicas, tais como abertura de estradas, caça predatória, desmatamento de florestas, exploração de madeiras, poluição da água e do ar (IBGE, 2001; BEZERRA *et al.*, 2011; GOMES; OLIVEIRA, 2012).

O comércio ilegal de animais silvestre é o segundo maior responsável pela redução das populações de espécies nativas, perdendo apenas para redução de habitat ocasionado pelo desmatamento (ROCHA, 1995; RENCTAS, 2001). Estima-se que, por ano, 12 a 38 milhões de espécimes são retiradas dos seus habitats, destas, a maior porcentagem morre, consequência dos processos de captura e transporte inadequado (ROCHA *et. al.*, 2006).

Acredita-se que o comércio ilegal de animais silvestres esteja concentrado em regiões com índices de pobreza acentuados, sendo realizado como forma de obtenção de renda (ROCHA, 1995; BARBOSA *et al.*, 2010). As regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste são as principais fornecedoras de espécies da fauna silvestres (SOUZA, 2007).

Entre os biomas existentes no Brasil, a Mata Atlântica apresenta o maior número de registros de espécies ameaçadas de extinção, uma estimativa de 41,1% com relação aos outros biomas, considerando que o grupo mais expressivo é o das aves, com 41,9% de espécies ameaçadas com registro em Unidades de Conservação Federal (NASCIMENTO; CAMPOS, 2011). Por concentrar o maior número de espécies ameaçadas, o Bioma Mata Atlântica representa uma área prioritária para preservação de espécies (MMA, 2000).

No estado da Bahia, o Recôncavo Baiano, em especial a região sul, é responsável por alojar um dos mais importantes remanescentes de Mata Atlântica, a Serra da Jiboia. Esta possui área total de aproximadamente 23.000 hectares, sendo que 30% da área total são consideradas Mata Atlântica em estágio avançado de regeneração (FREITAS; MORAES, 2009).

Percebe-se que a ausência de fiscalização, descumprimento das leis de proteção

à fauna e a falta de conhecimento dessas leis favorecem a prática ilegal de criação e comercialização de animais silvestres (ROCHA, 1995; SOUZA *et al.*, 2014). Assim, no intuito de amenizar os impactos da perda de espécimes provenientes do comércio ilegal no Recôncavo Baiano, e motivado pela carência nas fiscalizações, em virtude da inexistência de órgãos competentes atuantes na região, a Primeira Promotoria de Justiça do Ministério Público Estadual Regional de Santo Antônio de Jesus- Bahia, dentro de suas atribuições legais, decidiu por compor uma equipe técnica de fiscalização para atuar na preservação das espécies nativas e manutenção da biodiversidade.

Destarte o presente trabalho buscou identificar e promover um levantamento quantitativo das aves recebidas pelo Ministério Público Estadual Regional de Santo Antônio de Jesus- Bahia e encaminhadas ao Centro de Triagem de Animais Silvestres, CETAS, localizado em Vitória da Conquista estado da Bahia, no intuito de construir um banco de dados.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo considerou as regiões de ação da equipe de Polícia Militar Ambiental do Ministério Público, que abrangeu alguns municípios do Recôncavo da Bahia.

O levantamento de dados foi realizado com base em documentos conhecidos como “Termos de Recebimento” das aves encaminhadas, durante o ano de 2015, pelo Ministério Público de Santo Antônio de Jesus ao Centro de Triagem de Animais Silvestres, CETAS, localizado em Vitória da Conquista, estado da Bahia. Esses termos possuem informações do “número do documento”; “mês/ ano”; “número de aves por espécie” e “local de apreensão ou captura”.

A lista de espécies registradas pelo estudo adotou a nomenclatura científica, a categoria de endemismo nacional e a classificação taxonômica sugerida pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO 2014). As espécies foram distribuídas por total de exemplares e procedência. A discriminação das espécies classificadas em alguma categoria de ameaça seguiu a Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção (MMA, 2014), IUCN (2018) e a Lista Vermelha da Bahia (MACHADO; BORGES, 2013). Todas os animais apresentados imagens foram identificados de acordo com Sigrist (2014).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram registrados um total de 160 de aves silvestres, distribuídas em 26 espécies, enviadas para o CETAS de Vitória da Conquista encaminhas pelo Ministério Público de Santo Antônio de Jesus. Oito espécies consideradas endêmicas do Brasil (CBRO 2014), sendo elas: *Sporophila albogularis*, *Ramphocelus bresilius*, *Paroaria*

dominicana, *Aratinga auricapillus*, *Eupsittula cactorum*, *Brotogeris tirica*, *Icterus jamacaii* e *Cyanocorax cyanopogon*.

As aves registradas foram classificadas em quatro ordens (Figura 1), sendo que a ordem com mais registros foi Passeriformes, com 96 exemplares (60%), seguida de Psittaciformes com 62 (38,75%). As ordens Falconiformes e Gruiformes apresentaram apenas 1 (0,62%) representante cada. Passeriformes foi a classe mais representativa, o mesmo foi observado por Souza e Vilela (2013) no seu trabalho envolvendo os CETAS brasileiros.

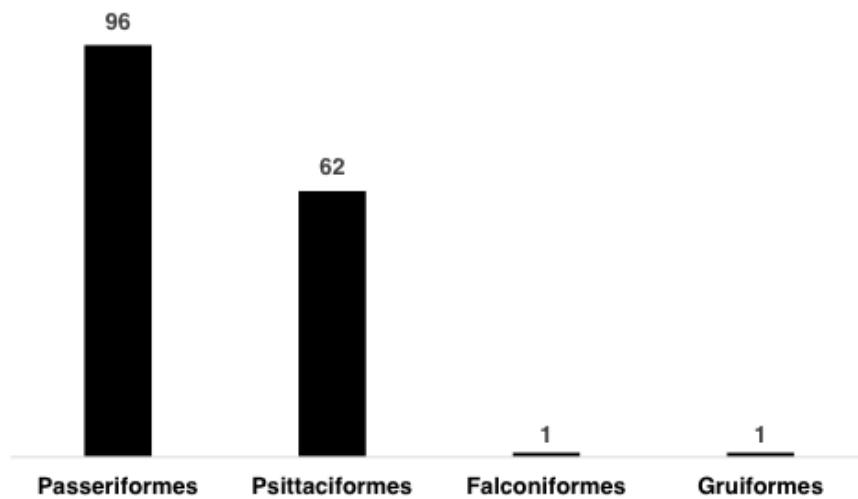


Figura 1. número de aves distribuídas em suas respectivas ordens.

Entre as famílias mais representativas está a *Thraupidae* com 72 (45%) indivíduos, seguida da *Psittacidae* 62 (38,75%), *Turdidae* 10 (6,25%), *Icteridae* 9 (5,63%) e *Passerellidae* 2 (1,25%). As famílias *Falconidae*, *Cotingidae*, *Corvidae*, *Rallidae* e *Cardinalidae* apresentaram apenas 1 (0,63%) indivíduo (Figura 2). A diversidade de famílias registradas pelo presente trabalho foi superior à registrada por Souza e Vilela (2013), que verificaram 10 famílias, considerando todas as aves recebidas pelo CETAS de Belo Horizonte durante o período de vinte anos (1992 a 2012).

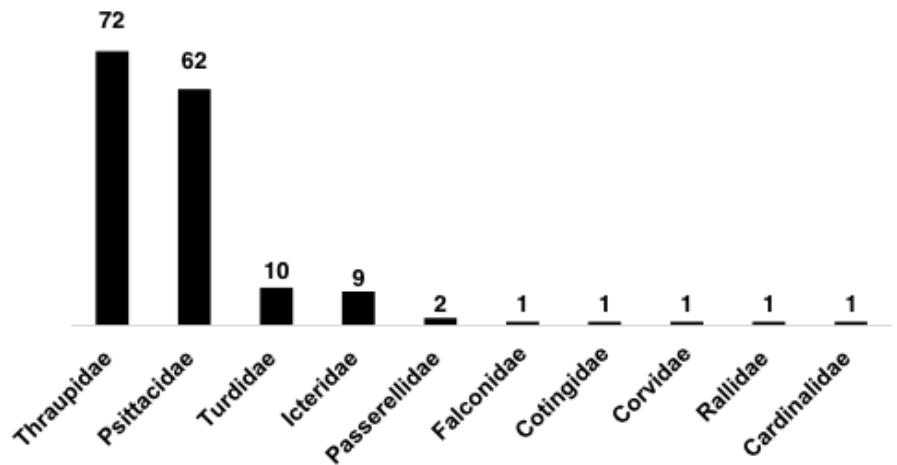


Figura 2. Número de indivíduos por família.

A família *Thraupidae*, portanto, teve o maior registro de espécimes de aves, sendo distribuídos em 8 espécies, das quais se destacaram: *Saltator similis* (Trinca ferro) com 26 (36,11%) espécimes, *Sicalis flaveola* (Canário-da-terra-verdeadeiro) com 19 (26,39%) e *Sporophila nigricollis* (Baiano) (Figuras 3 e 4) com 18 (25%). As demais espécies tiveram número de espécimes abaixo de 4: *S. albogularis* (Golinho) com 3 (4,17%), *R. bresilius* (Tiê-sangue) e *Sporophila angolensis* (Curió) com 2 (2,78%), e *Sporophila caerulescens* (Papa capim cruz) e *P. dominicana* (Cardeal do nordeste) (Figura 5) com 1 (1,39%).



Figura 3. Dois machos *Sporophila nigricollis*.

Figura 4. Fêmea de *Sporophila nigricollis*



Figura 5. Paroaria dominicana (Cardeal-do-nordeste).

Figueira (2007) em seu estudo sobre diagnóstico de apreensões de animais silvestres no estado de São Paulo, realizado entre os anos de 1999 a 2003, considerou as espécies *Sicalis flaveola* e *Saltator similis* como entre as mais frequentes, mostrando que a pressão de captura e comercialização dessas espécies não é só intensa na Bahia, mas também em outros estados.

Sporophila foi o gênero com maior número de espécies, possivelmente estes dados possam estar relacionados à maior procura das espécies desse gênero para criação, como foi dito por ROCHA *et al.* (2006), que relacionou essa procura ao canto e fácil manutenção em cativeiro.

A família Psittacidae foi a segunda com maior representatividade, dados semelhantes foram encontrados por FREITAS et. al (2015), totalizando 5 espécies, considerando as mais representativas: *Eupsittula aurea* (Periquito rei) (Figura 6) com 35 (56,45%) indivíduos, seguido pela *A. auricapillus* (Jandaia da testa vermelha) com 13 (20,97%), *E. cactorum* 5 (8,06%). *Amazona amazônica* (Curica) e *B. tirica* (Periquito rico) possuíram cada um 3 (4,84%) de espécimes. A espécie *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro) teve 2 (3,23%) representantes e a *Forpus xanthopterygius* (Tuim) (Figura 7) teve apenas 1 (1,61%).



Figura 6. *Eupsittula aurea* (Periquito rei).

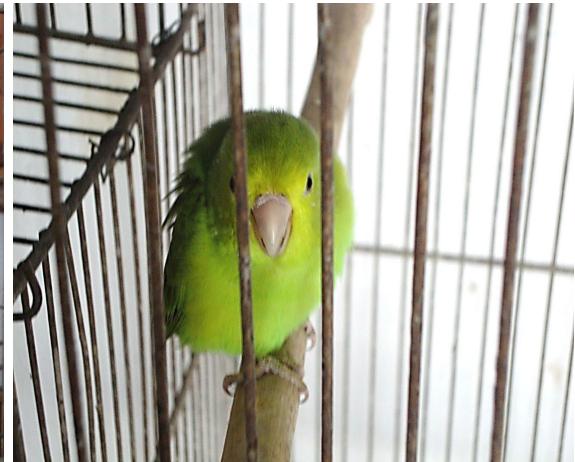


Figura 7. *Forpus xanthopterygius* (Tuim)

Além da procura pelas belas penas, os psitacídeos destacam-se pela capacidade de imitarem a voz humana, sendo, portanto, as aves mais populares no mundo, refletindo na sua frequência no comércio ilegal (RENCTAS, 2001; SOUTO *et al.*, 2017).

O *Turdus rufiventris* (Sabiá laranjeira) (Figura 8) com um total de 8 espécimes e *Turdus leucomelas* (Sabiá do barranco) com 2, foram as únicas espécies registradas para a família Turdidae. A família Icteridae também registrou apenas duas espécies, sendo a de maior destaque a *Gnorimopsar chopi* (Graúna), com 8 (%) indivíduos. A espécie *I. jamacaii* (Curupião), pertencente à mesma família, teve apenas 1 (%) registro.

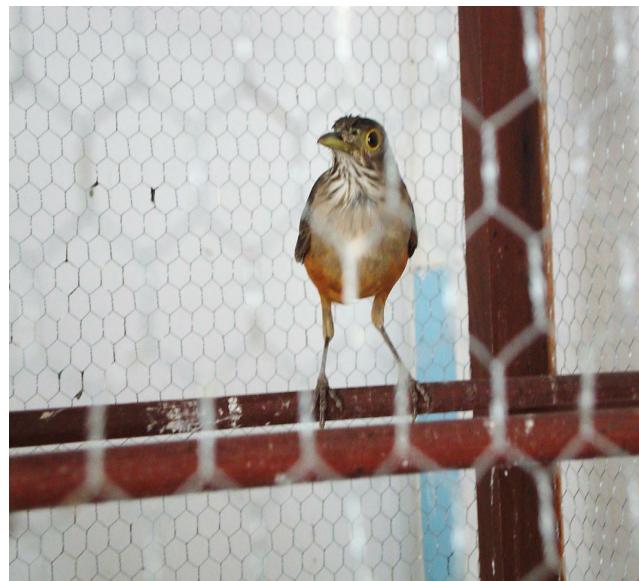


Figura 8. *Turdus rufiventris* (Sabiá laranjeira).

As famílias que tiveram menos destaque em relação ao número de espécies foram: Passerellidae, com 2 representantes da espécie *Zonotrichia capensis* (Tico tico). As famílias Falconidae, Cotingidae, Corvidae, Rallidae e Cardinalidae tiveram

apenas 1 espécime dentro de cada espécie. As espécies são, na ordem das famílias apresentadas anteriormente, *Milvago chimachima* (Gavião carrapateiro); *Procnias nudicollis* (Araponga); *C. cyanopogon* (Gralha-cancã); *Porphyrio martinicus* (Frango d'água azul) e *Cyanoloxia brissonii* (Azulão).

Segundo ROCHA e colaboradores, 2006, as espécies *R. bresilius* (Tiê-sangue), *Sicalis flaveola* (Canário-terra) e *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro) são consideradas raras entre os criadores e comerciantes ilegais, pois são encontradas com menos frequências em seus habitats naturais, sendo trazidas de outras regiões e vendidas por preços variáveis.

Entre os Municípios abrangidos pela pesquisa, Santo Antônio de Jesus foi o que apresentou maior número de registros de espécimes apreendidas, um total de 137 (85,63%), seguida de Varzedo 12 (7,50%), Amargosa 7 (4,38%), Valença 3 (1,88%) e Nazaré com apenas 1 (0,63%) indivíduo (Figura 9). Acredita-se que essa frequência pode estar relacionada a localização da Promotoria Ambiental, instalada no município de Santo Antônio de Jesus.

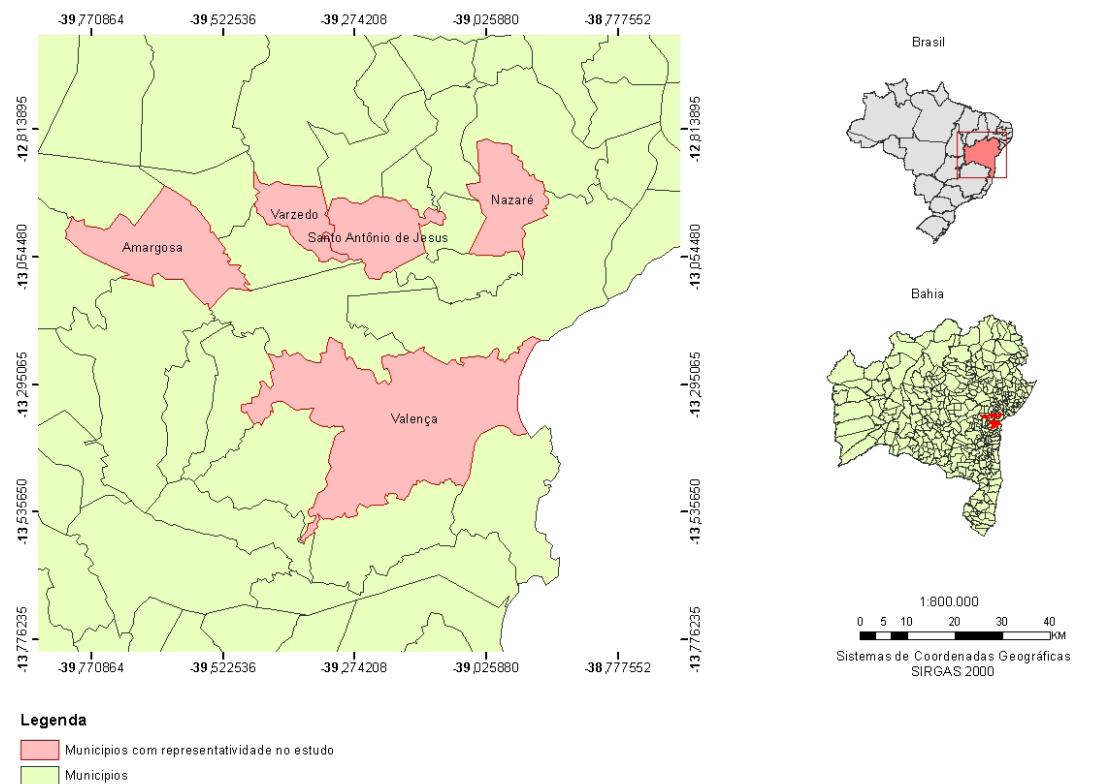


Figura 9. Municípios de origem das aves encaminhadas ao CETAS.

Quanto ao registro de espécies constantes na Lista Vermelha da Bahia ou Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção, apenas três espécies não tiveram ocorrência sendo elas: *Porphyrio martinicus*, *Eupsittula aurea*, *E. cactorum*. Entretanto, na lista da fauna brasileira ameaçada não foi observado nenhum registro (MMA, 2014).

Essa condição de vulnerabilidade das aves baianas é influenciada principalmente pela falta de conhecimento sobre a reprodução em cativeiro, levando a retirada desses animais diretamente da natureza (SOUZA *et al.*, 2014; SOUTO *et al.*, 2017). Além

da diminuição da biodiversidade, a constante retirada dos animais do seu habitat natural causa um desequilíbrio nas relações ecológicas desempenhadas por estes, afetando desde processos como reprodução, até teias tróficas as quais esses animais participam (ROCHA *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2012).

4 | CONCLUSÃO

A partir da análise dos termos de recebimento das aves encaminhadas para o CETAS de Vitória da Conquista pelo Ministério Público em 2015 foi possível quantificar e classificar os animais em seus respectivos táxons, constatando uma considerável diversidade de espécies, que sofrem ameaça de extinção devido às ações antrópicas. Tornando-se, portanto, essencial à existência de órgãos públicos dedicados a proteção da fauna silvestre e campanhas de apreensão de forma a influenciar na criação e tráfico de aves diminuindo-os e garantindo maior diversidade de espécies na natureza.

O presente trabalho apenas mostra o grande número de espécies sobre condições de vulnerabilidade presentes em alguns dos municípios do Recôncavo Baiano, porém são necessários novos estudos que avalie aspectos importantes, como o perfil do público consumidor e a rentabilidade da atividade, pois são informações que podem auxiliar na criação de medidas para acabar com a criação ilegal de aves no Recôncavo.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. A. A.; NOBREGA, V. A.; ALVES, R. R. N. **Aspectos da caça e comercio ilegal da avifauna silvestre por populações tradicionais do semi-árido paraibano.** Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 10, n. 2, p. 39-49, 2010.
- BARROS, Y. M.; SOYE, Y.; MIYAKI, C. Y.; WATSON, R.; CROSTA, L. **Plano de Ação Nacional para a Conservação da Ararinha-azul *Cyanopsitta spixii*.** Série Espécies Ameaçadas, n. 9. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 2012.
- BEZERRA, D. M. M.; ARAUJO, H. F. P.; ALVES, R. R. N. **Avifauna silvestre como recurso alimentar em áreas de semiárido no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** Sitientibus Série Ciências Biológicas, v. 11, n. 2, p. 177-183, 2011.
- CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2014) **Listas das aves do Brasil**, 11^a Edição.
- FIGUEIRA, C. J. M. **Diagnóstico de Apreensões de Aves, Répteis e Mamíferos no estado de São Paulo.** 241f. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- FREITAS, A. C. P.; OVIEDO-PASTRANA; M. E.; VILELA, D. A. R.; PEREIRA, P. L. L.; LOUREIRO, L. O. C.; HADDAD, J. P. A.; MARTINS, N. R. S.; SOARES, D. F. M. **Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Minas Gerais.** Revista Ciência Rural, n. 1, p.163-170, 2015.
- FREITAS, M. A.; MORAES, E. P. F. **Levantamento da avifauna (Serra da Jibóia), município da Fazenda Jequitibá de Elísio Medrado/Bahia.** Revista Atualidades Ornitológicas, n. 147, p. 73- 76, jan., 2009.

GOMES, C. C.; OLIVEIRA, R. L. **O tráfico internacional de animais: tratamento normativo e a realidade brasileira.** Revista Direito e Liberdade, v. 14, n. 2, p. 33-49, 2012.

IBAMA, **GEO BRASIL 2002: Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil.** Brasília, p. 32-47, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **Fauna ameaçada de extinção**, 2001, 106 p.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species (version 2018-1).** Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/>. 2018

MACHADO, C. G.; BORGES, O. **Lista vermelha: Aves da Bahia.** 2013.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos.** Brasília, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção.** Diário Oficial da União. Portaria nº 43, de 31 de janeiro de 2014.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G; FONSECA, G. A. B.; KLENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature. v. 403, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO, J. L.; CAMPOS, I. B. **Atlas da fauna brasileira ameaçada de extinção em unidades de conservação federais.** Brasília. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMCbio. 2011. 276 p.

REDE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES (RENCTAS). **1º Relatório nacional sobre o tráfico de animais silvestres.** Brasília, DF, 2001, 108p.

ROCHA, F. M. **Tráfico de Animais Silvestres no Brasil: Um diagnóstico preliminar.** Brasília, Série técnica I, WWF-Brasil, 1995.

ROCHA, M. S. P.; CAVALCANTI, P. C. M.; SOUSA, R.L.; ALVES, R. R. N. **Aspectos da comercialização ilegal de aves nas feiras livres de Campina Grande, Paraíba, Brasil.** Revista Biologia e Ciências da Terra, v. 6, n. 2, p. 204-221, 2006.

SIGRIST, T. **Guia de Campo: Avifauna Brasileira.** 4^a ed., Avisbrasilis, 2014. 608 p.

SOUTO, W. M. S; TORRES, M. A. R.; SOUSA, B. F. C. F.; LIMA, K. G. G. C.; VIEIRA, L. T. S.; PEREIRA, G. A.; GUZZI, A.; SILVA, M. V.; PRALON, B. G. N. **Singing for Cages: The use and trade of passeriformes as wild pets in a economic center of the Amazon-NE Brazil Route.** Tropical Conservation Science, v.10, p. 1-19. 2017.

SOUZA, L. C. **Diagnóstico do atual status do tráfico de animais silvestres no Brasil.** 2007. 51p..

SOUZA, T. O.; VILELA, D. A. R. **Espécies ameaçadas de extinção vítimas do tráfico e criação ilegal de animais silvestres.** Atualidades Ornitológicas On-line, n. 176, p. 64-68, 2013.

SOUZA, T. O.; VILELA, D. A. R.; CÂMARA, B. C. O. **Pressões sobre a avifauna brasileira: Aves recebidas pelo CETAS/IBAMA, Belo Horizonte, Minas Gerais.** Ornitologia, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

CAPÍTULO 6

LEVANTAMENTO DA AVIFAUNA EM AMBIENTE URBANO E RURAL NO MUNICÍPIO DE NOVO HAMBURGO, RS, BRASIL

Brenda Silveira de Souza

Universidade Feevale

Novo Hamburgo/RS

Marcelo Pereira de Barros

Universidade Feevale

Novo Hamburgo/RS

RESUMO: Apesar de constituírem um grupo chave na composição dos ecossistemas e possuírem grande importância para a conservação da biodiversidade, as aves ainda permanecem pouco estudadas na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos. Com o objetivo de se inventariar aves na região, duas áreas de preservação ambiental municipal foram visitadas ao longo de onze meses em 2018, determinando-se as espécies ocorrente nos dois locais. Entre os meses de janeiro e novembro foram registradas 83 espécies para as áreas, a maior riqueza de espécies foi registrada em outubro ($n=63$) e a menor em fevereiro ($n=25$). Oito espécies foram consideradas raras para as áreas de estudo, sendo registradas somente em um mês.

PALAVRAS-CHAVE: Aves. Levantamento de espécies. Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos.

HAMBURGO, RS, BRAZIL

ABSTRACT: Despite constitute a key group on ecosystem composition and possesses great importance on the biodiversity conservation, the birds remain little studied on Rio dos Sinos Hydrographic Basin. With the objective of inventory birds on the region, two areas of preservation environment municipal were visited during the period of eleven months in 2018, determining the common species on both sites. From the months of January to November were registered 83 species in the areas, the greatest diversity of species were recorded on October ($n=63$) and the lowest in February ($n=25$). Eight species were considered rare for the studied areas, being recorded only in one month.

KEYWORDS: Birds. Survey of species. Rio dos Sinos Hydrographic Basin.

1 | INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande riqueza de aves, atualmente com 1919 espécies, sendo um total de 1692 residentes, isto é, com reprodução no país, destas 277 endêmicas, segundo o CBRO (2015). No Rio Grande do Sul foram registradas 704 espécies de aves (FRANZ *et al.*, 2018), apesar do estado corresponder a apenas 3,3% do território nacional e situar-se na fronteira meridional do país, em pleno

AVIFAUNA SURVEY AT URBAN AND RURAL ENVIRONMENT ON THE COUNTY OF NOVO

subtrópico (BENCKE *et al.*, 2010). O estado, pode ser considerado uma encruzilhada geográfica avifaunística, por conter uma diversidade de biomas, como a Mata Atlântica, Pampa e Chaco (TIMM, 2016).

O conhecimento acerca da composição da avifauna em determinadas regiões é de suma importância para a conservação da biodiversidade em uma proporção mais ampla, devido ao fato das aves desempenharem papéis ecológicos decisivos nas comunidades naturais, atuando como polinizadoras, dispersoras de sementes e reguladoras de populações de outros animais, como os insetos (SICK, 1997), em vista disso, as aves silvestres tem sido reconhecidas como as melhores bioindicadoras dos ecossistemas terrestres, principalmente as de hábitos florestais (ALMEIDA, 1998).

Segundo FONTANA *et al.* (2003), grande parte das espécies de aves ameaçadas são restritas a habitats específicos que, por razões naturais ou antrópicas, ocupam apenas uma pequena parte do território gaúcho, em ambientes muito degradados pela ação humana. A perda e a fragmentação de habitats representam as principais ameaças para as aves no Brasil. (MARINI & GARCIA, 2005). A fragmentação de habitats pode acontecer a partir de várias atividades humanas. Ambientes grandes e não perturbados são divididos em áreas menores e isolados uns dos outros por cidades, estradas e áreas agrícolas. A perturbação gerada pela fragmentação pode modificar a comunidade original de várias formas, usualmente com efeitos sobre a riqueza e a composição de espécies (SALES, 2003).

Fragments urbanos possuem um papel importante nas alterações da composição das espécies da região onde se encontram (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Grande parte da biodiversidade hoje existente encontra-se em pequenos fragmentos florestais, motivo pelo qual o estudo das consequências dessa fragmentação para a biodiversidade tem crescido significativamente (GRADWOHL & GREENBERG, 1991; VIANA & PINHEIRO, 1998).

No município de Novo Hamburgo, assim como nos demais municípios da região da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos (BHRS), ocorre uma crescente pressão sobre os remanescentes de ecossistemas nativos, em virtude do aumento da urbanização, do estabelecimento de indústrias e da ampliação das fronteiras agrícolas (BERTÊ, 2016). Deste modo, a região de estudo é muito importante para a conservação da avifauna, pois além da crescente degradação de suas áreas de banhado, possui apenas 9% de sua cobertura florestal pertencente ao domínio Mata Atlântica, ecossistemas criticamente ameaçados (ANSCHAU, 2016; MARINI & GARCIA, 2005; SOS - MATA ATLÂNTICA, 2014).

Considerando uma carência de referências na literatura sobre a descrição da avifauna de Novo Hamburgo, como o trabalho realizado no Campus II da Universidade Feevale (TEIXEIRA, 2015), onde foram registradas 36 espécies de aves, pertencentes a 26 famílias e o de (FRANZ, 2010) realizado também na ARIE Henrique Luís Roessler (Parcão), entre 2005 a 2009, registrando 114 espécies de aves para o município de Novo Hamburgo.

Deste modo, um estudo da composição de espécies de aves torna-se importante para futuros acompanhamentos e comparações, tendo o presente trabalho o objetivo de elaborar uma listagem das espécies de aves, determinando suas ocorrências mensais e sua riqueza ao longo de um ano, em duas áreas distintas do município de Novo Hamburgo.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

2.1.1 Bacia hidrográfica – Novo Hamburgo

A Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos está situada a nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, delimitando-se à leste pela Serra Geral, pela bacia do Caí à oeste e ao norte, e ao sul pela bacia do Gravataí. Possui uma área de 3.820 km², correspondendo a 4,5% da bacia hidrográfica do Guaíba e 1,5% da área total do Estado. Possuindo população aproximada de 975.000 habitantes, sendo que 90,6% ocupam as áreas urbanas e 9,4% estão nas áreas rurais (FEPAM, 2017).

O Rio dos Sinos, curso principal da bacia, é considerado um dos principais rios de domínio do Estado, formando, juntamente com mais sete rios, a Região Hidrográfica do Guaíba. Com cerca de 190 km de extensão desde sua nascente em Caraá, até sua foz no município de Canoas, o Rio dos Sinos possui contribuições de corpos d'água que totalizam uma rede de drenagem de 3.471 km. (COMITESINOS, 2017).

O presente estudo foi realizado em duas áreas de preservação ambiental do município de Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, localizadas em zona urbana e rural. Possuindo uma área de 223,821 km² com densidade demográfica de aproximadamente 1,07 hab/km², o município está localizado cerca de 40 km da capital do Estado, fazendo parte da Região Metropolitana de Porto Alegre e integrado a Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos (IBGE 2016).

A área rural de Novo Hamburgo possui extensão territorial de 156 Km² equivalente a dois terços do território do município, abrangendo o banhado do Rio dos Sinos, considerado um ecossistema importante para a preservação da fauna e da flora (NOVO HAMBURGO, 2017). A região pertence ao bioma Mata Atlântica, de clima subtropical e vegetação à fisionomia da Floresta Estacional Semidecidual, sendo as principais espécies a figueira-branca (*Ficus insipida*), o rabo-de-mico (*Lonchocarpus muehlbergianus*), o angico-vermelho (*Paraptdenia rigida*), o aguáí (*Cryosophyllum gonocarpum*), o canelão (*Ocotea cf. acutifolia*), o sobrasil (*Colubrina glandulosa*), a canela-preta (*Nectandra megapotamica*), cangerana (*Cabralea canjerana*), o cedro (*Cedrela fissilis*) e o palmitero (*Euterpe edulis*) (LEITE, 2002).

2.1.2 Área de relevante interesse ecológico Henrique Luís Roessler – parção (área urbana)

A Área de Relevante Interesse Ecológico Henrique Luís Roessler, inscrito no Sistema Estadual de Unidades de Conservação (SEUC) vinculada à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Novo Hamburgo, é considerado o maior remanescente florestal localizado na zona urbana desta cidade, nas coordenadas 29°41'22"S 51°06'37"W, possuindo uma área 54 hectares, sendo aproximadamente 51,3 hectares de mata nativa (NOVO HAMBURGO, 2017), com vegetação composta por comunidades arbóreas, campestres, paludosas e vegetações manejadas, possuindo cursos hídricos inseridos em uma matriz urbana que alimentam o arroio Pampa

2.1.3 Centro de Educação Ambiental Ernest Sarlet (Área Rural)

O Centro de Educação Ambiental Ernest Sarlet (CEAES) está localizado na estrada do Wallahai, 1.400, em Lomba Grande, na zona rural de Novo Hamburgo, nas coordenadas 29°44'32"S 51°03'11"W. Sancionado pela Lei nº 1779, de 11 de março de 2008, administrado pela Prefeitura e gerenciado pela Secretaria Municipal da Educação, abrange uma área de 13,9 hectares extensamente influenciada pelo percurso do Rio dos Sinos e áreas alagadiças (NOVO HAMBURGO, 2017), estando inserido numa faixa compreendida entre a encosta dos morros e áreas de banhado, que por sua vez exerce o papel de esponja natural. O arroio Wallahai, afluente do Rio do Sinos, possui suas nascentes cortando a área do CEAES em direção a sua foz nos banhados da Integração (PROJETO VERDE SINOS, 2016).

2.2 Procedimentos

Para as amostragens em campo foi aplicado o método de “caminhamento” descrito por Filgueiras *et al.* (1994), adaptado para a observação de aves, onde em um percurso, as espécies são registradas por meio de visualizações e vocalizações. As campanhas amostrais foram realizadas entre janeiro e novembro de 2018, totalizando 66 horas de amostragens, ocorrendo uma vez por mês em cada área, nos períodos da manhã e tarde, das 8:00 às 11:00 horas e das 18:00 às 21:00 horas, podendo-se assim identificar espécies em horários diferentes.

As espécies foram identificadas com auxílio de um binóculo Bushnell 10x50, um gravador de voz (Samsung J5). Imagens foram capturadas com câmera NIKON COOLPIX P510 – lente 4.3-180mm, para serem identificadas posteriormente. Guias de identificação como os de Gabriel Rocha (2015) e Narosky & Yzurieta (2003) foram utilizados para auxiliar nas identificações.

A classificação taxonômica das aves está de acordo com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2015). De acordo com as planilhas de campo, foi elaborada uma lista taxonômica, acompanhada do registro mensal de ocorrência

de cada espécie, por área. As espécies registradas foram classificadas como raras quando encontradas em somente um mês de amostragem.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao longo do período de amostragens foram realizadas 22 campanhas de observação, totalizando 66 horas de esforço amostral, neste período foi possível registrar a ocorrência de 83 espécies de aves pertencentes a 35 famílias, a lista taxonômica e os registros por área estão na Tabela 1. Na área do Centro de Educação Ambiental Ernest Sarlet, foram registradas 67 espécies, na Área de Relevante Interesse Ecológica Henrique Luís Roessler (Parcão) foram registradas 44 espécies de aves.

Família/Espécie	Nome comum	Parcão	CEAES	J	F	M	A	M	J	J	J	A	S	O	N
Cracidae															
<i>Ortalis squamata</i>	aracuã-escamoso	X	X	X	X	X						X	X	X	X
Ardeidae															
<i>Tigrisoma lineatum</i>	socó-boi		X						X	X					
<i>Butorides striata</i>	socózinho		X	X	X	X						X	X	X	X
Bubulcidae															
<i>Bubulcus ibis</i>	garça-vaqueira		X					X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Ardea alba</i>	garça-branca		X											X	X
Syrigmidae															
<i>Syrigma sibilatrix</i>	maria-faceira		X												X
Threskiornithidae															
<i>Phimosus infuscatus</i>	tapicuru	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cathartidae															
<i>Cathartes aura</i>	urubu-de-cabeça-vermelha			X											X
<i>Coragyps atratus</i>	urubu	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Accipitridae															
<i>Heterospizias meridionalis</i>	gavião-caboclo		X					X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Rupornis magnirostris</i>	gavião-carijo	X	X									X	X	X	X
Rallidae															
<i>Aramides cajaneus</i>	saracura-três-potes		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aramides saracura</i>	saracura-do-mato	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Charadriidae															
<i>Vanellus chilensis</i>	quero-quero	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Jacanidae															
Jacana jacana	jaçanã		X									X	X	X	X
Columbidae															
<i>Columbina talpacoti</i>	rolinha		X									X	X	X	X
<i>Columba livia</i>	pombo-doméstico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Zenaida auriculata</i>	avoante	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Leptotila verreauxi</i>	juriti-pupu	X		X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
<i>Leptotila rufaxilla</i>	juriti-de-testa-branca	X		X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
Cuculidae															
<i>Piaya cayana</i>	alma-de-gato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

<i>Crotophaga ani</i>	anu-preto	X				X	X
<i>Guira guira</i>	anu-branco	X				X	X
<i>Tapera naevia</i>	saci	X				X	X
Nyctibiidae							
<i>Nyctibius griseus</i>	mãe-da-lua	X					X
Trochilidae							
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	besourinho-de-bico-vermelho	X	X				X
<i>Hylocharis chrysura</i>	beija-flor-dourado		X			X	X
<i>Amazilia versicolor</i>	beija-flor-de-banda-branca		X			X	X
Alcedinidae							
<i>Chloroceryle amazona</i>	martim-pescador-verde	X					X
<i>Chloroceryle americana</i>	martim-pescador-pequeno	X	X	X	X	X	X
Picidae							
<i>Melanerpes candidus</i>	pica-pau-branco	X					X
<i>Veniliornis spilogaster</i>	picapauzinho-verde-carijó	X					X
<i>Colaptes melanochloros</i>	pica-pau-verde-barrado	X	X	X	X	X	X
<i>Colaptes campestris</i>	pica-pau-do-campo	X	X	X	X	X	X
Cariamidae							
<i>Cariama cristata</i>	seriema		X				X
Falconidae							
<i>Milvago chimachima</i>	carrapateiro	X	X		X	X	X
Psittacidae							
<i>Myiopsitta monachus</i>	caturrita	X	X	X	X	X	X
Thamnophilidae							
<i>Dysithamnus mentalis</i>	choquinha-lisa	X			X		
<i>Thamnophilus ruficapillus</i>	choca-de-chapéu-vermelho	X		X			X
<i>Thamnophilus caerulescens</i>	choca-da-mata	X	X	X	X	X	X
Scleruridae							
<i>Sclerurus scansor</i>	vira-folha	X		X	X	X	X
Dendrocolaptidae							
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	arapaçu-verde	X					X
Furnariidae							
<i>Furnarius rufus</i>	joão-de-barro	X	X	X	X	X	X
<i>Synallaxis spixi</i>	joão-teneném	X					X
Rhynchocyclidae							
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	bico-chato-de-orelha-preta	X					X
<i>Poecilotriccus plumbeiceps</i>	tororó	X					X
Tyrannidae							
<i>Campstostoma obsoletum</i>	risadinha	X	X				X
<i>Elaenia parvirostris</i>	guaracava-de-bico-curto	X	X				X
<i>Pitangus sulphuratus</i>	bem-te-vi	X	X	X	X	X	X
<i>Megarynchus pitangua</i>	neinei	X	X	X	X	X	X
<i>Tyrannus melancholicus</i>	suiriri	X	X				X

<i>Tyrannus savana</i>	tesourinha	X		X	X	X	X		X	X	X
<i>Lathrotriccus euleri</i>	enferrujado	X									X
<i>Satrapa icterophrys</i>	suiriri-pequeno	X								X	X
<i>Xolmis irupero</i>	noivinha	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Vireonidae											
<i>Cyclarhis gujanensis</i>	pitiguary	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Hirundinidae											
<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	andorinha-pequena-de-casa		X								X
	andorinha-de-sobre-branco		X							X	X
Troglodytidae											
<i>Troglodytes musculus</i>	corruíra	X	X						X	X	X
Turdidae											
<i>Turdus leucomelas</i>	sabiá-branco	X		X	X	X	X	X			
<i>Turdus rufiventris</i>	sabiá-laranjeira	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Turdus amaurochalinus</i>	sabia poca	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>Turdus albicollis</i>	sabiá-coleira	X	X	X	X	X	X	X			
Mimidae											
<i>Mimus saturninus</i>	sabia do campo		X						X	X	X
Passerellidae											
<i>Zonotrichia capensis</i>	tico-tico	X	X			X	X	X	X	X	X
Passerida											
<i>Setophaga pityayumi</i>	mariquita		X								X
Parulidae											
<i>Basileuterus culicivorus</i>	pula-pula	X	X	X		X	X	X	X	X	X
<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	pula-pula-assobiador	X								X	X
Icteridae											
<i>Icterus pyrrhopterus</i>	encontro		X							X	X
<i>Pseudoleistes guirahuro</i>	chopim-do-brejo		X							X	X
<i>Agelaioides badius</i>	asa-de-telha		X			X	X	X	X	X	X
<i>Molothrus bonariensis</i>	chupim		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Thraupidae											
<i>Paroaria coronata</i>	cardeal		X			X	X	X	X	X	X
<i>Tangara sayaca</i>	sanhaço-cinzento	X	X	X		X	X	X	X	X	X
<i>Sicalis flaveola</i>	canário-da-terra	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coryphospingus cucullatus											
<i>tico-tico-rei</i>			X								X
<i>Tachyphonus coronatus</i>	tie preto		X							X	X
<i>Coereba flaveola</i>	cambacica	X								X	X
<i>Sporophila caerulescens</i>	coleirinho		X						X	X	X
<i>Saltator similis</i>	trinca-ferro		X			X			X	X	X
Fringillidae											
<i>Euphonia violacea</i>	gaturamo-verdadeiro	X									X
<i>Euphonia chlorotica</i>	fim-fim		X			X	X	X	X		
Passeridae											
<i>Passer domesticus</i>	pardal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Total	83	44	67	26	25	30	36	39	36	39	48
										60	63
											60

Tabela 1: Lista de ocorrência de espécies de aves nas áreas de preservação ambiental de Novo

Hamburgo, com a distribuição mensal entre os meses de janeiro a novembro de 2018.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

O total de espécies (83) registradas para o município de Novo Hamburgo, corresponde a 11,6% das espécies de aves ocorrentes no Rio Grande do Sul, quando comparado ao trabalho de Franz *et al.*, 2018, que registra 704 espécies para o estado. Existem inúmeras fatores que podem influenciar em um trabalho de observação de aves, como por exemplo, o local de estudo, tempo de esforço amostral, experiência do pesquisador e equipamento utilizado. De acordo com trabalhos realizados na região, no município de Taquara, foram registradas 128 espécies de aves, distribuídas em 46 famílias, encontradas em 66 horas de observações, em uma área pertencente à zona rural do município (SILVEIRA, 2017). No Campus II da Universidade Feevale (TEIXEIRA, 2015), foram registradas 36 espécies de aves, pertencentes a 26 famílias, totalizando 86 horas de observações, durante este período parte do campus estava sendo reformado. Segundo Franz (2010), foram registradas 114 espécies de aves, na ARIE Henrique Luís Roessler, entre os anos de 2005 a 2009, somando um esforço amostral de aproximadamente 100 horas (21 dias).

O Centro de Educação Ambiental Ernest Sarlet está localizado em uma importante área de preservação ambiental por pertencer a uma zona rural e de banhado, possuindo apenas 13,9 hectares, no local registrou-se a maior riqueza de aves. Foram registradas 67 espécies, entre elas *Tigrisoma lineatum* (socó-boi), *Butorides striata* (socózinho), *Ardea alba* (garça-branca), *Bubulcus ibis* (garça-vaqueira), *Chloroceryle amazona* (martim-pescador-verde) e *Chloroceryle americana* (martim-pescador-pequeno), espécies características do banhado, ecossistema criticamente ameaçado. A Bacia do Rio dos Sinos já perdeu 8850ha de áreas úmidas em trinta anos, com uma média anual de 295ha (ANSCHAU, 2016).

A ARIE Henrique Luís Roessler encontra-se em meio a uma matriz urbana, e consideravelmente distante de qualquer outro fragmento de vegetação florestal. Foram registradas 44 espécies de aves no Parcão, entre elas *Dysithamnus mentalis* (choquinha-lisa) *Thamnophilus ruficapillus* (choca-de-chapéu-vermelho), *Sclerurus scansor* (vira-folha), *Sittasomus griseicapillus* (arapaçu-verde) e *Myiothlypis leucoblephara* (pula-pula-assobiador).

Apesar do mesmo esforço amostral e de possuir maior extensão territorial, 54 hectares, a ARIE Henrique Luís Roessler apresentou a menor riqueza de espécies de aves, comparada ao CEAES, podendo indicar que, por ser um fragmento florestal totalmente isolado em meio a zona urbana ocorrerá gradualmente uma redução em sua riqueza de espécies. Estratégias de conservação como a criação de corredores ecológicos e zonas de amortecimento podem ser aconselháveis nestes casos. Segundo GALINKIN et al. (2004), implementados estrategicamente, os corredores e as zonas de amortecimento podem mudar fundamentalmente o papel ecológico das

áreas protegidas. Os corredores servem para aumentar o tamanho e as chances de sobrevivência de populações de diferentes espécies, além de possibilitarem a recolonização com populações de espécies localmente reduzidas e, ainda, permitir a redução da pressão sobre o entorno das áreas protegidas.

Quando analisam-se as frequências mensais de ocorrências das espécies, observa-se que a menor riqueza, somando-se os valores das duas áreas, corresponde a 25 registros no mês de fevereiro de 2018. Esse número pode estar associado a fatores ambientais, como temperatura, pois fevereiro é um mês de temperaturas elevadas, dificultando a observação de aves. Além disso, representa o segundo mês de atividades em campo do observador, podendo-se ter incorrido em falhas na identificação das espécies. A maior riqueza, somando-se os registros das duas áreas, foi observada no mês de outubro, com 63 espécies. Esse valor está fortemente relacionado ao aumento da atividade reprodutiva da avifauna.

Com os dados de ocorrências mensais, foi elaborada a curva do coletor e o gráfico da Figura 1 apresenta o acréscimo do número de espécies observadas ao longo do período amostral, somando-se os registros das duas áreas, portanto, esses dados são válidos para o município de Novo Hamburgo, como um todo. Um aumento gradativo ao longo das observações pode ser observado, contudo, destaca-se um incremento no aumento de registros nos meses que antecedem a chegada da primavera e na própria primavera. Até o mês de julho, foram registradas 47 espécies, em agosto foram registradas 59 espécies e em setembro, 71. Esse aumento é devido a aproximação da época de reprodução das aves no sul do Brasil. Esse fenômeno corrobora as observações de Sick (1997) que aponta o intervalo entre os meses de setembro a janeiro como o período reprodutivo do grupo. Durante este período ocorre a migração de algumas espécies, como por exemplo, *Tyrannus savana* (tesourinha) e *Tachycineta leucorrhoa* (andorinha-de-sobre-branco) e *Lathrotriccus euleri* (enferrujado), que viajam até a região para se reproduzir.

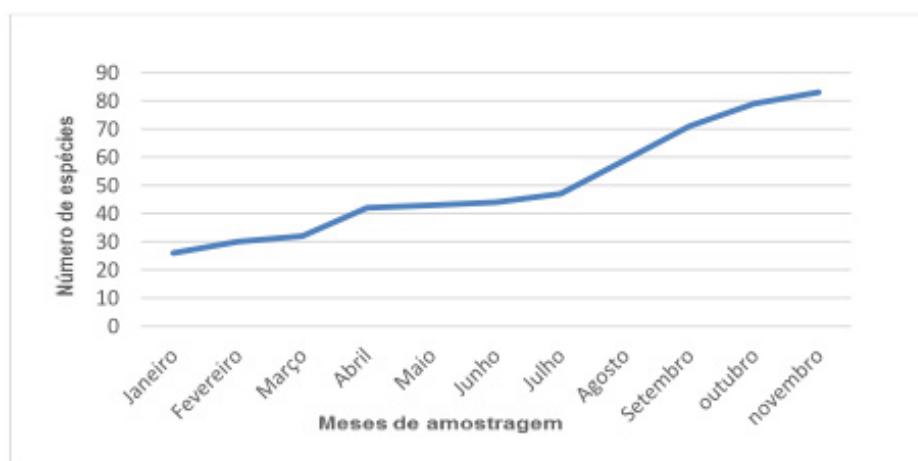


Figura 1: Curva de acumulação de espécies de aves registradas entre os meses de janeiro a novembro de 2018 em duas áreas de preservação ambiental no município de Novo Hamburgo, RS.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

As duas áreas onde ocorreram os estudos são de grande importância para a preservação ambiental da Região da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos. Das 83 espécies de aves registradas para o município oito foram consideradas raras, pois ocorreram em apenas um mês de amostragem, sendo que destas duas foram registradas na ARIE Henrique Luís Roessler e seis no CEAES.

Na ARIE Henrique Luís Roessler ainda habitam muitas espécies da fauna e flora que necessitam de preservação, além da existência de nascentes e cursos hídricos que são importantes para a hidrografia da região e para a manutenção da vida das espécies locais. A área é a primeira e única Unidade de Conservação Ambiental do município, uma conquista que deveria ter facilitado a busca por nossos recursos e investimentos com intuito de preservar a biodiversidade. O Centro de Educação Ambiental Ernest Sarlet, por pertencer a zona rural e situar-se em meio as áreas de banhado, possui uma grande riqueza de espécies da fauna e flora que vivem no local, no caso das aves, possui espécies que não sobreviveriam em ambiente urbano, o que torna sua preservação e monitoramento de suma importância para a sobrevivência dessas espécies, além disso possui as nascente do arroio Wallahai, afluente do Rio do Sinos, cortando sua área.

4 | AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Pereira de Barros por toda ajuda na identificação das espécies e elaboração do trabalho, ao Prof. Me. Rage Maluf pelas sugestões, e ao meu companheiro Bruno Henrique dos Santos pelo acompanhamento em todas as saídas a campo, e auxílio em todos os momentos difíceis nessa importante etapa da minha vida.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F.; ALMEIDA, A. Monitoramento de fauna e de seus habitats em áreas florestadas. **Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP: Série Técnica IPEF**, São Paulo, v. 12, n. 31, p.85-92, abr. 1998.
- ANSCHAU, Carla. Atlas do Projeto Verde Sinos. Porto Alegre. **Ed. Do Autor**. p. 116. Ed 1, 2016.
- BARTH, B. J.; FITZGIBBON, S. I.; WILSON, R. S. New urban developments that retain more remnant trees have greater bird diversity. **Landscapeand Urban Planning**, v. 136, p. 122-129, 2015.
- BENCKE, G.A. Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. **Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**. p. 519 - 556. 2010.
- BERTÊ, A.M.A., LEMOS, B.O., TESTA, G., ZANELLA, M.A.R., OLIVEIRA, S.B. Perfil Socioeconômico - COREDE Vale do Rio dos Sinos. **Boletim Geográfico do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, n. 26, p. 942-983, fev. 2016.
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Lista das Aves do Brasil. 2015** Disponível em <<http://www.cbro.org.br>> Acesso em 27. set. 2017.

COMITESINOS. **Caracterização da bacia.** Disponível em <<http://www.comitesinos.com.br/bacia-hidrografica-do-rio-dos-sinos>> acesso em 27 mar. 2018.

DATASINOS. 2006. **Sistema de Informação e análise sócio-econômico-ambiental para o COREDE do Vale do Rio dos Sinos.** Disponível em: <<http://www.datasinos.unisinos.br>>. Acesso em: 09 abr. 2018.

FEPAM. **Qualidade das Águas da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos.** Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos> Acesso em 16 mar 2017.

FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; BROCHADO, A.L. & GUALA II, G.F. Caminhamento: um método expedito para levantamentos florísticos qualitativos. **Cadernos de Geociências.** cap.12. p. 39-43. 1994.

FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre. EDIPUCRS. p. 191. 2003.

FRANZ, I.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BUGONI, L & DIAS, R. A. Four decades after Belton: a review of records and evidences on the avifauna of Rio Grande do Sul, Brazil. Porto Alegre. **Iheringia, Série Zoologia** 108: e2018005. p. 38. abr. 2018. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/isz/v108/1678-4766-isz-108-e2018005.pdf>> Acesso em 9 abr. 2018.

FRANZ, I., CAPPELATTI, L., BARROS, M. P. Bird community in a forest patch isolated by the urban matrix at the Sinos River basin, Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on the possible local defaunation. *Braz. J. Biol.*, vol. 70, no. 4 (suppl.), p. 1137-1148. 2010.

GALINKIN, M.; et al. Projeto corredor ecológico Araguaia – Bananal. In: ARRUDA, M.B.; SÁ, L.F.S.N. (Orgs.) corredores ecológicos: Uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil. Brasília: **IBAMA**. p. 81-132. 2004.

GRADWOHL, J.; GREENBERG, R. Small forest reserves: making the best of a bad situation. **Climatic change**, v. 19, p. 235-256, 1991.

IBGE. **Cidades.** Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/novo-hamburgo/panorama>> Acesso em 27. set. 2017.

LEITE, P. F. Contribuição ao conhecimento fitoecológico do sul do Brasil. **Ciência e Ambiente**. c. 24, p. 51-75. 2002.

MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação De Aves No Brasil. Brasília: **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005. Disponível em: <www.researchgate.net>. Acesso em: 21 out. 2017.

NAROSKY, T. & IZURIETA, D. **Guía para La Identificación de Aves Del Uruguay y Argentina.** Buenos Aires: IVB. p. 234. 2003.

NOVO HAMBURGO. **Dados gerais.** Disponível em <www.novohamburgo.rs.gov.br> Acesso em 21 nov. 2017.

PETRY, M.V.; SCHERER, J.F.M., Distribuição da avifauna em um gradiente no Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biodiversidade Pampeana PUCRS**, Uruguaiana, v.6, n. 2, p 19-29, dez. 2008.

PROJETO VERDEGINOS. **Almanaque Fauna e Flora da Mata Ciliar do Arroio Wallahai.** Disponível em <<http://www.comitesinos.com.br/trabalhos-tecnicos>> Acesso em 27 mar 2018.

SALES, V. C. (Org.). **Ecossistemas brasileiros:** manejo e conservação. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora. c. 1. p. 31-32; c. 4. p. 165, 2003.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil. p. 20, 113, 912, 1997.

SILVEIRA, A. P. L. **Composição da Avifauna em uma área rural do Município De Taquara, Rio Grande Do Sul.** 2017. Monografia (Artigo de conclusão do curso de Ciências Biológicas), Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, 2017.

SOS Mata Atlântica - **Atlas dos Municípios das Mata Atlântica.** Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE. 2014.

TEIXEIRA, E. C.; PETRY, M.V.; TEIXEIRA, E.C. & MARTINS, J.F.C. Ocorrência de Falconiformes em Diferentes Ambientes do Parque Estadual de Itapuã, RS. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 27, n.1. p.51-56, 2005.

TEIXEIRA, J.B. Avifauna do Campus II da Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil. **Revista Conhecimento Online** – a. 6. v. 1, p. 15 Novo Hamburgo, 2015.

TIMM, C. D. **Aves do Extremo Sul do Brasil: guia de identificação.** Pelotas. USEB, p. 331. 2016.

ASPECTOS PSICOLÓGICOS NO ESPORTE: REFLEXÕES, QUESTIONAMENTOS E INFLUÊNCIAS DO ESTRESSE E ANSIEDADE NOS ATLETAS DE HANDEBOL

Rômulo Dantas Alves

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru – São Paulo (Lab. de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-*LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*).

Taís Pelição

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru – São Paulo (Lab. de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-*LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*). Bolsista PIBIC CNPq 2019 Unesp PROPE.

Marcos Gabriel Schuindt Acácio

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru – São Paulo (Lab. de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-*LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*). Bolsista PIBIC CNPq 2018/19 Unesp PROPE.

Luan Henrique Roncada

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru – São Paulo (Lab. de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-*LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*).

Debora Gambari Freire Batagini

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru – São Paulo (Lab. de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-*LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*). Bolsista CAPES Mestrado Acadêmico UNESP RC/ PPG DHT 2018/19.

Rubens Venditti Júnior

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Campus de Bauru-SP, Faculdade de Ciências (FC), Departamento de Educação Física (DEF) e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação UNESP Rio Claro/IB – Programa Interdisciplinar de Desenvolvimento Humano e Tecnologias (DHT). Coordenador do *Laboratório de Atividade Motora Adaptada, Psicologia Aplicada e Pedagogia do Esporte-LAMAPPE/ DEF-FC, Unesp Bauru*.

RESUMO: A aprendizagem de um jogo passa por diversas etapas e níveis de habilidades motoras. A modalidade coletiva do handebol é um desses jogos que tem diversas características e níveis de aprendizado, com um ambiente de jogo dinâmico, envolvente e complexo. É um jogo que envolve invasão espacial, confronto direto e ação simultânea. Todas as características de uma modalidade coletiva como o handebol cria um ambiente competitivo em si, pela busca da vitória em toda sua duração. O ambiente competitivo cria um contexto de confronto, avaliação, comparação e demonstração. O sujeito que passa por todo o processo de aprendizagem do jogo, e por todo processo competitivo, é influenciado por aspectos psicológicos importantes para prática esportiva. Nesse sentido, o capítulo buscou na literatura subsidio teórico para mostrar os resultados e

conclusões das pesquisas, sobre as temáticas de estresse e ansiedade na modalidade de handebol. Os estudos tem convergido em seus resultados referentes a situações causadoras de estresse no handebol e o nível de ansiedade em praticantes de handebol, sejam universitários ou profissionais. Os estudos encontrados na literatura também convergiram ao utilizar metodologias similares, tanto para a variável estresse, quanto para ansiedade. Pesquisas com abordagens diferentes também são encontradas, buscando observar a variável do estresse de forma biológica e sua influência no treinamento esportivo.

PALAVRAS-CHAVE: aspectos psicológicos; estresse; ansiedade; handebol.

PSYCHOLOGICAL ASPECTS INSPORT: REFLECTIONS, QUESTIONS AND INFLUENCES ABOUT STRESS AND ANXIETY IN HANDBALL ATHLETES

ABSTRACT: The learning of a game goes through several stages and motor skill levels. The collective modality of handball is one of those games that has several characteristics and levels of learning, with a dynamic, engaging and complex game environment. It's a game that involves spatial invasion, direct confrontation and simultaneous action. All the characteristics of a collective modality like the handball creates a competitive environment per se, fighting for the victory in all its duration. Moreover, the competitive environment creates a context of confrontation, evaluation, comparison and demonstration. Psychological aspects important for sports practice influence the subject that goes through the whole process of learning the game, and through all competitive process. On this way, the chapter sought in the literature theoretical subsidy to show the results and conclusions of the research, on these themes of stress and anxiety in the modality of handball. Studies have converged in their results regarding situations that cause stress in handball, and about the level of anxiety in practitioners of handball, whether they are college or elite subjects. The studies found in literature research also converged using similar methods and procedures, both for the stress variable and for anxiety. Researches with different approaches are also found, seeking to observe the stress variable in a biological way and its influence on sports' training.

KEYWORDS: psychological aspects; stress; anxiety; handball.

1 | INTRODUÇÃO

Ao se considerar as características de uma modalidade, é preciso pensar que o ambiente de jogo em si é dinâmico e complexo, tendo situações e momentos imprevisíveis que transpassam as relações de cooperação e oposição dos atletas. No ambiente de jogo, o jogador irá identificar, interpretar, analisar e decidir, perante as situações que lhe forem apresentadas, tendo por base todas as habilidades específicas das modalidades. O poder de resolução do atleta dependerá de sua capacidade em executar as habilidades específicas do handebol. (MENEZES; REIS; MORATO, 2016).

Handebol evoluiu na última década em consequência de alterações no regulamento, desenvolvimento de métodos de treinos e também pelo aparecimento de modelos de jogos mais evoluídos (SECO apud ESTRIGA e MOREIRA, 2013). Investigação escassa na modalidade (nível de formação e alto rendimento): também acontece com os modelos de referência em ensino do handebol, principalmente nas escolas, mesmo que a modalidade venha ganhando espaço no currículo da Educação Física (EF). Rejeição por profissionais de EF: difícil abordagem; falta de espaços apropriados; falta de modelos para uma abordagem escolar (ESTRIGA; MOREIRA, 2013).

Para apresentar as características do jogo de handebol é preciso entender o processo de ensino e aprendizagem da modalidade. Segundo Menezes, Reis e Morato (2016) a aprendizagem do handebol deve partir de modelos menos complexos do jogo, até chegar ao jogo formal.

Não há organização coletiva.
Jogo anárquico.
Participantes aglomeram-se na bola.
Dificuldade em assumir seu papel no jogo.
Dificuldade em diferenciar fases do jogo.
Cooperação ofensiva através de passes e posse de bola.
Dificuldade na tomada de decisão.
Pouco domínio das habilidades motoras fundamentais.
Progressão individual para o alvo
Do ponto de vista <u>defensivo</u> , focam apenas a bola, sem pensar nas linhas de passes.
Aglomeram-se na pessoa em posse da bola.
Recuperação da bola por incidente (erro do ataque).

Quadro 1: 1º Nível de jogo - Do jogo sem sistema à organização rudimentar

Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Acima foi apresentado no quadro 1, a etapa inicial de aprendizagem do jogo de handebol, e, partindo do pressuposto de que o jogo deve estar desde o início no processo de ensino e aprendizagem. A seguir são descritos os níveis seguintes de aprendizagem da modalidade segundo Estriga e Moreira (2013).

Melhorar competências técnicas individuais.
Elaborar ofensivas mais simples.
Ensinar alunos a construir o jogo em função do alvo.
Cooperação ofensiva pretende-se evoluir explorando o espaço livre.
Defensivamente, introduzir noção básica de defesa da bola, do oponente e da baliza.

Quadro 2: 1º Nível de jogo - É Necessário

Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Ocupação de jogo mais racional
Maior frequência de transição rápida para o ataque
Melhor progressão para o alvo

Quadro 3: 2º nível de jogo - Situação de jogo 5x5 e em campo reduzido Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Continuidade e consolidação das noções táticas básicas.	
Desenvolver recursos técnicos fundamentais da 1ª etapa.	
Ataque	Defesa
Desenvolver capacidade de transitar rápido para o ataque	Consolidar os princípios da defesa em proximidade com o adversário
Garantir posse de bola.	Introduzir noções básicas de defesa.
Defesa capaz de impedir ataque adversário	Introduzir soluções motoras e táticas ofensivas de complexidade. Marcação em proximidade na zona de bola. Controle defensivo em proximidade.

Quadro 4: 2º nível de jogo - É Necessário

Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Transição do jogo reduzido ao terreno formal/ espaço 3 vezes superior.
Terreno de jogo formal = introdução de mais jogadores, pois há mais espaço para explorar.
Aumento de exigências e possibilidades em relações de cooperação/oposição, pois há aumento de nº de jogadores.
Introdução e compreensão do papel do pivô no jogo.

Quadro 5: 3º nível de jogo – transição para o terreno de jogo formal e introdução do 6º jogador (pivô) – jogo 6x6

Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Sistema de ataque:	Sistema de defesa:
De 3:2 com passagem para 2:3.	Necessidade de recuo da defesa para zona de área de baliza.
Introduzir função do pivô	Avanço organizado da defesa.

Quadro 6: 3º nível de jogo - É Necessário termos praticantes capazes de jogar no terreno formal

Fonte: adaptado de Estriga e Moreira (2013, p. 123-133).

Salto para um nível de jogo mais exigente.
Consolidação de aprendizagens anteriores torna-se decisiva neste nível.
Definida pela introdução do 7º jogador.
Altera os constrangimentos e possibilidades de ação
Aumenta as dificuldades de comunicação e organização.
Praticantes capazes de interpretar o jogo, de diferenciar e adequar as ações.
Inclusão de mais um elemento: introduz a função do organizador no jogo de ataque.
Jogadores instruídos para entender o papel do organizador.
Preconizar sistemas defensivos em duas linhas (5:1, 3:3).
Opção por sistemas defensivos abertos e profundos.
O jogo de transição deve ter grande importância e volume.

Quadro 7: 4º nível de jogo – jogo formal – jogo 7x7 – Fases de defesa

A modalidade de handebol é um jogo desportivo coletivo (JDC), que envolve, atividade lúdica, disciplina, organização, ação simultânea, confronto direto, oposição, invasão, cooperação e habilidades motoras específicas. Tudo isso inserido em um contexto com regras fixas e espaço de jogo limitado. O fenômeno do esporte é o que acaba propiciando toda organização dos JDC. (BALBINO; PAES, 2005)

Todas essas características que o jogo de handebol apresenta, acabam por torná-lo um jogo competitivo que busca sempre o desequilíbrio do oponente, para obter vantagens táticas e espaciais, para assim ampliar a pontuação. A obtenção desse desequilíbrio e vantagem no placar, ocorrer pela maestria em pôr em prática as habilidades motoras específicas e os princípios ofensivos técnicos e táticos do jogo de forma individual e coletiva, da mesma maneira acontece nas situações defensivas do jogo. (KNIJNINK, 2009; MENEZES; REIS; MORATO, 2016).

Por todas as características apresentadas acima, a modalidade de handebol acaba por ser extremamente competitiva. Sendo assim, o jogo de handebol como modalidade esportiva, insere o atleta no processo competitivo no contexto do esporte, que é composto por uma série de etapas e desafios, desde treinamentos, jogos, cobranças dos envolvidos, viagens, lesões, relacionamentos com outras pessoas que compõem o elenco, comissão técnica e até mesmo problemas pessoais causados pelos compromissos com o esporte. Cada atleta encara esse processo de uma forma, alguns conseguem lidar muito bem com pressões, outros acabam abandonando a carreira esportiva. (DE ROSE JUNIOR et al., 2004).

O ambiente competitivo é formado por diversas situações que podem acarretar uma série de reações psicológicas, emoções e sentimentos são aspectos que estão presente em todos os indivíduos. Especificamente, no contexto competitivo esportivo os atletas se encontram absorto por esses aspectos psicológicos. (DE ROSE JUNIOR et al., 2004).

O estresse é uma dessas variáveis que atingem todos os sujeitos do contexto esportivo, o estresse que pode ser entendido aqui como a diferença significativa entre demandas físicas e/ou psicológicas e a capacidades de resposta do indivíduo, que em uma situação de falha ao concluir essas demandas, acaba por acarretar outras emoções como angústia, nervosismo, aflição e entre outros (WEINBERG; GOULD, 2008).

A ansiedade é outro aspecto psicológico que está muito presente no contexto esportivo, que pode ser compreendida como uma condição emocional ou psicológica negativa, caracterizada por preocupações, apreensão, pensamentos negativos. Entende-se então ansiedade como uma condição negativa do estado psíquico que é observada por sentimentos negativos tais como: nervosismo, apreensão, preocupação e está associada com a ativação ou excitação fisiológica e psicológica. (SAMULSKI,

2002).

A ansiedade pode ser compreendida a partir dos conceitos de ansiedade – estado e ansiedade – traço, sendo ansiedade – estado um componente em constante variação do estado de ansiedade, que é composto por uma série de elemento tais como: sentimentos de tensão, apreensão e nervosismo, pensamentos desagradáveis e mudanças fisiológicas (SPIELBERGER, 1989).

E ansiedade – traço faz parte da personalidade do indivíduo, é uma disposição a reagir com certo nível de ativação em situações percebidas como ameaçadoras, mas que realmente não representam um perigo concreto (WEINBERG; GOULD, 2008).

Segundo Spielberger (1989), ansiedade traço são diferenças próprias da personalidade do sujeito, sendo estas diferenças relativamente estáveis conectadas a ansiedade e a ansiedade-estado é uma maior manifestação no nível de ativação. A ansiedade está ligada à ativação, que em síntese é uma alteração fisiológica e psíquica, variando da inercia à agitação. O estado de ansiedade apresenta alguns sintomas que podem ser percebidos corporalmente, tais como: sudorese intensa, inquietação, tensão muscular, boca seca, tremores e entre outros. (WEINBERG; GOULD, 2008).

Além do conceito de ansiedade estado e traço, a ansiedade também pode ser entendida pela ótica da ansiedade cognitiva e da ansiedade somática, a ansiedade cognitiva está ligada aos pensamentos negativos como apreensão, nervosismo, preocupação. Já a ansiedade somática está relacionado com os níveis de ativação física do indivíduo, sintomas como sudorese, agitação e até tremores. (WEINBERG; GOULD, 2008).

A pesquisa científica tem buscado compreender os aspectos psicológicos no ambiente esportivo, buscando preencher as lacunas existentes na literatura. Muitos estudos tem investigado as características das modalidades esportivas e tentando associar as peculiaridade do esporte aos estados emocionais dos atletas, técnicos, árbitros, espectadores. Nesse capítulo, abordamos ansiedade pelo conceito de ansiedade traço e estado, por ter sido muito utilizado nos estudos científicos. A literatura apresenta alguns estudos sobre a temática de estresse e ansiedade especificamente no handebol. Sendo assim, buscou-se na bibliografia científica os estudos dessa temática, para verificar qual tem sido a conclusão das pesquisas nessa área, se existe convergência entre os resultados e obtidos e quais reflexões podem ser feitas.

2 | ESTRESSE, ANSIEDADE E HANDEBOL

Dentro da área de psicologia do esporte, existem estudos investigando, motivação, orientação para tarefa e para ego, síndrome de burnout, personalidade e entre outras variáveis tais como, a do capítulo em questão. Os estudos encontrados na literatura buscam abordar situações causadoras de estresse na modalidade de handebol, em outros casos somente os níveis de ansiedade dos atletas foi investigado. Outros

estudos também investigaram ansiedade associada a outros aspectos psicológicos, tais como: habilidades psicológicas, vigor mental (*Mental Toughness*). A literatura também apresenta estudos, investigando estresse e ansiedade pelo viés da fisiologia, observando mudanças metabólicas e alterações fisiológicas. Sendo assim, à luz do que foi encontrado na literatura, procurou-se explanar as conclusões e as reflexões que tais estudos trouxeram para a temática.

O estudo de Silva, Padovani, e Viana (2016) investigou o emprego do *biofeedback* no treinamento da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) para diminuição dos sintomas de estresse e ansiedade em 12 atletas de handebol, sendo os atletas divididos em dois grupos (grupo 1 e 2). O estudo utilizou o *biofeedback* por meio de um equipamento que mede a VFC, e, que orienta o indivíduo a manter o controle respiratório. Para medir a ansiedade e o estresse foram utilizados três inventários, o “Inventario de Ansiedad de Beck” (BAI) e o “Inventario de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp” (ISSL) e o “*Competitive State Anxiety Inventory-2*”(CSAI-2). Uma ficha de caracterização dos atletas e uma “Avaliação de Qualidade de Vida” (WHOQOL-BREF) também foram aplicada as atletas. As atletas inicialmente responderam todos questionários e avaliações em uma sessão, e durante um mês participaram de sete sessões de treinamento com o *biofeedback*. Sendo que, ao final desse mês as atletas responderam novamente os questionários.

Os resultados do estudo mostraram que na esfera da qualidade de vida o treinamento de autorregulação da respiração e da VFC trouxe resultados significativos para o grupo 1. No ISSL e CSAI-2 as alterações foram significativas no grupo 2, e no CSAI-2 houve aumento significativo na esfera da autoconfiança. Já para o BAI o treinamento em *biofeedback* não trouxe resultados significativos. O estudo concluiu que o treinamento de *biofeedback* pode trazer benefícios nos sintomas de estresse e ansiedade, e que as características de cada grupo devem ser levadas em consideração quanto planejamento e tempo das intervenções para obter melhores resultados. (SILVA; PADOVANI; VIANA, 2016)

Em Marin et al. (2013), 10 atletas profissionais de handebol, do sexo masculino, participaram de um estudo que verificou o efeito de diferentes cargas de treinamento e competição, sobre o estresse oxidativo, o acompanhamento do estudo foi de 6 meses. Por meio de amostras de sangue os pesquisadores conseguiram verificar, que houve diferenças significativas nos períodos mais intensos de competições e treinamentos, sobre os níveis de estresse oxidativo (aumentando os marcadores fisiológicos).

O período de preparação causou adaptações contínuas ao treinamento físico, e mostrou que tal efeito é um fator de prevenção significativo, contra o estresse oxidativo. O treinamento acabou por causa uma adaptação antioxidante. O estudo conclui que o estresse oxidativo e biomarcadores podem ser modificados ao longo da temporada competitiva dos atletas. (MARIN et al., 2013).

O estudo que investigou habilidades psicológicas (PS), vigor mental (MT) e ansiedade em atletas profissionais, procurou fazer grupos por idade e por sexo. Foram

174 atletas que responderam três questionários cada um referente a um variável do estudo. E por meio da análise estatística de variância, o estudo não encontrou nenhuma diferença significativa entre as variáveis estudadas em relação a idade. Mas os homens mostraram níveis menores de ansiedade do que as mulheres. As variáveis que apresentaram maior relação pra o grupo mais jovem foi ansiedade e vigor mental. Para o grupo de atletas mais velhos, a variável de habilidades psicológicas se destacou com relação ao controle emocional, estabelecimento de metas no treino para homens, e relaxamento na competição para mulheres. (KRISTJÁNSDÓTTIR et al., 2018).

O autor destaca que os resultados do estudo são coerentes com os dados que a literatura apresenta sobre outros esportes, sendo que, o estudo apresentou igualdades com equipes masculinas de rúgbi em relação ao controle emocional na prática e na competição e estabelecimento de metas. Sobre a ansiedade, que destaca que os homens apresentaram menores níveis de ansiedade do que as mulheres, o que pode sugerir uma preparação psicológica mais focada na ansiedade para as equipes femininas. Porém, em relação a idade não foram encontradas diferenças nos valores de ansiedade, seja em homens ou em mulheres. Esses resultados divergem de dados encontrados na literatura que, relaciona atletas mais velhos e com mais experiência a menores níveis de ansiedade. (KRISTJÁNSDÓTTIR et al., 2018)

Em relação a diferença de sexo, o estudo encontrou diferenças nas habilidades psicológicas, os homens pontuaram mais em cinco subescalas (automacidade, controle emocional no treino e na competição, e relaxamento na competição), e as mulheres pontuaram mais em duas subescalas (relaxamento e auto fala no treino). O estudo também sugere que as habilidades psicológicas utilizadas por homens e mulheres são diferentes, como mencionado a cima. (KRISTJÁNSDÓTTIR et al., 2018).

Caputo, Rombaldi e Silva (2017) investigaram sintomas de estresse pré-competitivo em jogadores adolescentes de handebol, 97 sujeitos de ambos os sexos participaram do estudo. Os autores utilizaram um instrumento que listava sintomas de estresse pré-competitivo infanto-juvenil, as coletas foram realizadas meia hora antes do primeiro do campeonato estadual. O único sintoma que teve diferença significativa foi “sonho com a competição”, sendo que foi significativa para os meninos, de modo geral, meninos e meninas demonstraram nível de estresse similar, ficando em uma classificação média. Em síntese, a competição no início da adolescência é um causador de estresse.

O estudo de Pires, Flores e Brandão (2008), que utilizou o questionário sobre situações causadoras de estresse no handebol, investigou duas equipes diferentes, e definiu como estressoras as 5 situações que apresentassem a maior porcentagem de respostas “sim”. Eles encontraram 4 situações semelhantes para as duas equipes, sendo estas as situações (1) “Errar tiros de 7m em momentos decisivos do jogo”; (12) “Errar um arremesso completamente livre”; (14) “Arbitragem estar prejudicando minha equipe”; (15) “Ser excluído nos momentos decisivos da partida”. As situações que diferiram entre as equipes foram as: (5) “Estar perdendo para equipe tecnicamente

inferior” para equipe do Oeste do Paraná e (16) “Sofrer um gol devido a uma falha defensiva” para equipe da cidade de Campinas, estado de São Paulo.

Outro estudo similar ao estudo já citado com o mesmo modelo metodológico investigou 69 atletas femininas de handebol, que defendiam equipes de cidades do interior do estado de São Paulo. As situações causadoras de estresse para esse grupo foram similares ao estudo de Alves, Santos e Venditti Jr (2016), sendo as situações: (1) “Errar tiros de 7m em momentos decisivos do jogo”; (12) “Errar um arremesso completamente livre”; (14) “Arbitragem prejudicando minha equipe”; (15) “Ser excluído nos momentos decisivos da partida”; (16) “Sofrer gol devido a falha defensiva”. Porém, esse estudo também encontrou a situação (8) “Perder por pouca diferença e o adversário amarrar o jogo” (VENDITTI JR et al., 2013).

As mesmas situações que o estudo de Pires, Flores e Brandão (2008) encontraram corroboram com outros estudos encontrados na literatura (ALVES, 2016; VENDITTI Jr, 2013). Os dados encontrados na pesquisa de Alves, Theodoro e Venditti Jr (2018) também dialogam com parte dos dados encontrados por Prado et al (2013), que não identificaram como estressoras as situações: (6) “Não começar jogando”; (9) “Ser substituído por estar jogando mal”; (10) “Ser perturbado pela minha torcida”; (11) “Ser advertido pelo técnico na frente de todos”; (13) “Estar sendo fortemente marcado e ficar isolado”. Porém, a amostra do estudo de Alves, Theodoro e Venditti Jr (2018) também difere com o estudo de Prado et al (2013), ao encontrar a situação (2) “Ser excluído por 2 min muito cedo no jogo” como estressora, e ao sinalizar que a situação (8) “Estar perdendo por pouca diferença e o adversário está amarrando o jogo”, como não sendo estressora para os atletas.

Para o estudo de Venditti Jr et al (2013), os dados se equipararam com a literatura, ao encontrarem as situações (1) “Errar tiros de 7m em momentos decisivos do jogo”; (12) “Errar um arremesso completamente livre”; (14) “Arbitragem estar prejudicando minha equipe”; (15) “Ser excluído nos momentos decisivos da partida”; (16) “Sofrer um gol devido a uma falha defensiva”, como estressoras. A afirmativa (8) “Estar perdendo por pouca diferença e o adversário está amarrando o jogo” no estudo de Venditti et al (2013) é mostrada como estressora, e difere do estudo mencionado acima. (ALVES, THEODORO, VENDITTI JR, 2018).

O estudo de Pandolfo et al. (2014) verificou o nível de ansiedade-estado em atletas do sexo masculino, entre 14 e 16 anos durante as fases finais do Campeonato Gaúcho de Handebol no ano de 2012, o estudo utilizou o instrumento de auto-avaliação “Inventario de Ansiedad Traço-Estado” (IDATE). A pesquisa encontrou níveis baixos e moderados de ansiedade-estado, entre os quatro finalistas, porém entre as equipes que ficaram em segundo e quarto lugar observou-se um menor nível, do que na equipe campeão e na terceira colocada, podendo haver um nível de ansiedade ideal pra obter um melhor desempenho.

No estudo de Alves, Sousa e Venditti Jr (2015), investigou-se a ansiedade traço-estado em atletas universitários e profissionais da cidade de Bauru, São Paulo.

Os níveis de ansiedade-traço e ansiedade-estado dos dois grupos de atletas foram considerados baixos, segundo a classificação utilizada (PANDOLFO et al., 2014). Contudo, os atletas de idade mais baixa apresentaram maiores níveis de ansiedade. Isso sugere que atletas mais novos e com menos experiência apresentam maiores índices de ansiedade.

Salles et al.(2015) avaliaram o nível de ansiedade traço pré-competitiva em atletas universitários de três modalidades, futsal handebol e voleibol, utilizando o “Teste de Ansiedade Traço Competitiva” (SCAT). O teste tem finalidade de detectar o perfil de ansiedade pré-competitiva. A pesquisa investigou atletas de ambos os sexos, atingido assim 65 atletas. A amostra tinha média de idade de 22 anos, para o caso da modalidade handebol, os atletas obtiveram classificação “média ansiedade – traço” no teste do estudo, e a média geral da amostra se manteve na mesma classificação, o estudo não encontrou influências significativas associadas as modalidades ou ao sexo. O estudo concluído que a amostra de atletas foi bem preparada para o contexto competitivo universitário.

Os estudos encontrados na literatura apresentam similaridades entre si, seja na metodologia, ou nos resultados, outros estudos apresentam investigações diferenciadas, seja com viés mais biológico, seja em investigações mais amplas. Tanto na variável de estresse como na variável de ansiedade é possível ver que os estudos corroboram entre si, encontrando níveis baixos e médios de ansiedade em diferentes contextos esportivos, e em diferentes idades. O mesmo ocorre quando observamos a variável de estresse, encontrando as mesmas situações de estresse com atletas universitários, profissionais, mais jovens e mais velhos.

Divergências entre os resultados dos estudos também são notadas, É preciso levar em consideração que os contextos esportivos são diferentes, que as equipes são diferentes, e que cada ambiente e amostra tende apresentar peculiaridades. Mas de modo geral, as descobertas das pesquisas tem tido mais convergências entre si; e, a cada novo estudo, tem sido possível ver direcionamentos e descobertas, tais como situações causadoras de estresse mais relevantes que outras (níveis de ansiedade mais frequentes nos atletas). A influência da experiência dos atletas na percepção dessas situações estressoras no handebol e no controle dos níveis de ansiedade também aparece em muitos estudos e pesquisas, sinalizando a importância e necessidade de se estudar estas variáveis no contexto esportivo.

3 | CONCLUSÃO

O capítulo cumpriu com o objetivo de apresentar diversos estudos da literatura, a fim de mostrar seus resultados e conclusões, com o intuito de questionar se os estudos nessa temática tem conversado entre si ou apresentado desenvolvimento de métodos e instrumentos mais específicos. Se as metodologias tem sido muito

diferentes, qual tem sido o enfoque dos pesquisadores. A literatura de modo geral é vasta, mas ainda há muito a se desenvolver na temática de estresse, ansiedade e aspectos psicológicos de forma geral na modalidade de handebol. Outrossim, há que se destacar a importância e aplicabilidade de se compreender estes aspectos, de modo a reverter em desenvolvimento humano e influências na performance e rendimento esportivos.

É possível identificar na literatura estudos envolvendo atletas de muitas modalidades e encontrando diferenças entre cada modalidade, portanto a investigação dos aspectos psicológicos nas modalidades esportivas é de extrema relevância. As diferentes metodologias e formas de investigação também são interessantes para fazer diferentes reflexões, questionamentos e associações. A interdisciplinaridade entre áreas do conhecimento só tem agregar as pesquisas científicas. E estudos envolvendo variáveis biológicas e psicológicas devem ser incentivados, visto que é possível ter duas perspectivas de olhares para a mesma variável. Isso sem contar que, é de extrema importância desse conhecimento ser acessível ao profissional de Educação Física e de aplicabilidade em seu cotidiano em diferentes contextos esportivos.

AGRADECIMENTOS:

Programa de Pós-graduação DHT/ Unesp RC-IB.

Programa Interdisciplinar em Desenvolvimento Humano e Tecnologias e Pro-Reitoria de Pesquisa Unesp (Programas PIBIC/ PIBITI CNPq).

REFERÊNCIAS

BALBINO, H.F; PAES, R.R. Pedagogia do esporte e os jogos desportivos coletivos na ótica das inteligências múltiplas. In: BALBINO, H.F; PAES, R.R. **Pedagogia do Esporte: Contextos e Perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 137-154, 2005.

CAPUTO, E. L.; ROMBALDI, A. J.; SILVA, M. C. DA. Sintomas de estresse pré-competitivo em atletas adolescentes de handebol. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 39, n. 1, p. 68–72, jan. 2017.

ALVES, R.D. **Psicologia do Esporte: Estresse e Ansiedade em atletas de handebol universitário**. 2016. 49f. TCC (Graduação em Educação Física) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP, Bauru, 2016.

ALVES, R.D.; SOUSA, M.A; VENDITTI JR, R. Ansiedade pré-competição em atletas universitários e profissionais das equipes de handebol na cidade de Bauru. In: Congresso Internacional dos Jogos Desportivos. 5. 2015. Belo Horizonte. **Anais do 5º Congresso Internacional dos Jogos Desportivos**...Belo Horizonte: EEFITO/UFMG, 2015. p.186-189.

ALVES, R.D.; THEODORO, M.A.; VENDITTI JR, R. Situações causadoras de stress em atletas profissionais de handebol da equipe de Bauru – SP. In: Congresso Internacional de Psicologia do Esporte, Desenvolvimento Humano e Tecnologias. 4. 2018. Rio Claro. **Anais do Congresso Internacional de Psicologia do Esporte, Desenvolvimento Humano e Tecnologias**...Rio Claro:

ESTRIGA, L; MOREIRA, I. Proposta metodológica de ensino no andebol. In: TAVARES, F (ed). **Jogos Desportivos Coletivos: ensinar a jogar**. Porto: Editora FADEUP, p.123-164, out. 2013.

KNIJNIK, J.D. **Handebol: Agôn: o espírito do esporte**. 1ºed. São Paulo: Odysseus Editora, 2009.

DE ROSE JR, D. SATO, C.T; SELINGARDI, D.; BETTENCOURT, E.L.; BARRO, J.C.; FERREIRA, M.C.M. Situações de jogo como fonte de “stress” em modalidades esportivas coletivas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 4, p. 385–395, 1 dez. 2004.

ESTRIGA, L; MOREIRA, I. Proposta metodológica de ensino no andebol. In: TAVARES, F (ed). **Jogos Desportivos Coletivos: ensinar a jogar**. Porto: Editora FADEUP, p.123-164, out. 2013.

KNIJNIK, J.D. **Handebol: Agôn: o espírito do esporte**. 1ºed. São Paulo: Odysseus Editora, 2009.

KRISTJÁNSDÓTTIR, H.; ERLINGSDÓTTIR, A.V.; SVEINSSON, G.; SAAVEDRA, J.M. Psychological skills, mental toughness and anxiety in elite handball players. **Personality and Individual Differences**, v. 134, p. 125–130, 1 nov. 2018.

MARIN, D. P.; BOLIN, A.P.; CAMPOIO, T.R.; GUERRA, B.A; OTTON, R. Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 462–470, 1 out. 2013.

MENEZES, R. P.; REIS, H. H. B.; MORATO, M. P. O handebol, seu cenário imprevisível e os métodos de ensino-aprendizagem-treinamento. **Revista de Ciencias del Deporte**, v. 12, n. 2, p. 165–176, 2016.

PANDOLFO, K.C.M., AZAMBULA, C.R., MACHADO, R.R, SANTOS, D.L. Nível de ansiedade-estado de atletas masculinos de handebol na final do campeonato gaúcho. **Revista Cinergis**.15 (2): 94 – 97. 2014.

PIRES, D. A.; FLORES, L. J. F.; BRANDÃO, M. R. F. Situações de jogo causadoras de estresse em atletas das categorias de base de handebol: uma abordagem cross-cultural. **Conexões**, v. 6, n. 0, p. 463–476, 2008.

PRADO, P.; VENDITTI JR, R.; SILVA, F.F; SANTOS, J.W.; ASPECTOS PSICOLÓGICOS NA PEDAGOGIA DOS ESPORTES COLETIVOS: análises complementares do estresse psicológico em equipes femininas de handebol do interior do estado de São Paulo. **R. Min. Educ. Fís**, v. Especial, n. 9, p. 1160–1166, 2013.

SALLES, W.N.; OLIVEIRA, C.C.; PACHECO, R.W. Ansiedade pré-competitiva e esporte: estudo com atletas universitários. **Revista da Faculdade de Educação Física da Unicamp**. v. 13. n. 3, 85 – 100, 2015.

SAMULSKI, D. **Psicologia do Esporte**.1ed. São Paulo, Manole, 2002.

SILVA, J. D. DE A.; PADOVANI, R. DA C.; VIANA, M. DE B. O Emprego do Biofeedback como Estratégia de Manejo do Estresse e da Ansiedade em Atletas: um Ensaio Clínico. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 18, n. 3, p. 17–29, 2016.

SPIELBERGER, C.D. Stress and anxiety in sports. In HACKFORT, D., & SPIELBERGER, C.D. **Anxiety in sports: an international perspective**. Nova Iorque, Hemisphere Publishing Corporation, 1989.

VENDITTI JR, R.; PRADO, P.; SANTOS, J.W.; ZAGATTO, A.M.; SILVA, M.P. ASPECTOS

PSICOLÓGICOS NA PEDAGOGIA DOS ESPORTES COLETIVOS: compreendendo o estresse psicológico em equipes femininas de handebol do interior do Estado de São Paulo. **Revista Mineira de Educação Física**, n. Especial, p. 1133–1139, 2013.

WEINBERG, S; GOULD, D. **Fundamentos da psicologia do esporte e do exercício**. 4ºed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

CAPÍTULO 8

EFEITO DO TAMANHO DA QUADRA SOBRE AÇÕES TÉCNICAS E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM JOVENS JOGADORES DE FUTSAL

Matheus Luiz Penafiel

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Educação Física. Programa de Pós-graduação em Ciências da Motricidade Interunidades.

Bauru – São Paulo

Alexsandro Santos da Silva

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Programa de Pós-graduação em Ciências da Motricidade Interunidades.

Bauru – São Paulo

Dagnou Pessoa de Moura

Programa de Pós-graduação em Ciências da Motricidade Interunidades (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru; Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – Unisalesiano de Lins.

Lins – São Paulo

Osvaldo Tadeu da Silva Junior

Programa de Pós-graduação em Ciências da Motricidade Interunidades (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru; Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – Unisalesiano de Lins.

Lins – São Paulo

Bruno Jacob de Carvalho

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Educação Física.

Bauru – São Paulo

Yacco Volpato Munhoz

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de

Educação Física.

Bauru – São Paulo

Julio Wilson Dos-Santos

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Educação Física; Programa de Pós-graduação em Ciências da Motricidade Interunidades.

Bauru – São Paulo

RESUMO: O futsal nasceu de uma adaptação do futebol e no mesmo sentido, o futebol sofreu adaptações para o jogo em campo reduzido no campo (JCR) e ambos JCR e futsal apresentam maior intensidade e contato com a bola que o jogo de futebol. Objetivo desse estudo foi verificar se as ações técnicas e a intensidade do jogo de futsal sofrem alterações quando o jogo é realizado em quadras de tamanho diferentes. Amostra composta por 20 meninos de 08 a 18 anos que frequentam o projeto de extensão universitário Futebol Escola, DEF/FC-Unesp, Bauru. Houve um aquecimento prévio de 5 minutos e os participantes foram analisados em dois jogos de 15 minutos, em duas quadras com tamanhos diferentes (quadra pequena, QP = 26 x 18 m e quadra grande, QG = 40 x 20 m). Os jogos foram filmados para análise das ações técnicas e os jogadores tiveram sua frequência cardíaca (FC) monitorada para análise da intensidade e determinação da carga interna

do jogo (TRIMP, método de Edwards, que considera o tempo de esforço em 5 zonas de intensidade da FC). A análise estatística compreendeu o test-t pareado ($p<0,05$). O jogo foi mais intenso na QG, maior tempo na zona acima de 85% da FC máxima, assim como o TRIMP. O total de ações técnicas não diferiu entre as duas quadras, no entanto, houve maior número de finalizações na QP e mais desarmes na QG. O jogo de futsal apresentou maior intensidade na QG, enquanto que, a predominância das ações técnicas pode variar de acordo com o tamanho da quadra.

PALAVRAS-CHAVE: Futsal, Ações Técnicas, Frequência cardíaca e Jogo em campo reduzido.

EFFECT OF THE SIZE OF THE COURT ON TECHNICAL ACTIONS AND HEART RATE IN YOUTH FUTSAL PLAYERS

ABSTRACT: Futsal was born of an adaptation of the soccer and in the same sense, the soccer suffered adaptations for the small sided games (JCR) and both JCR and futsal present greater intensity and contact with the ball than the football game. The objective of this study was to verify if the technical actions and the intensity of the futsal game have changes when the game is performed in different size courts. Sample composed of 20 boys from 08 to 18 years old who attend the university extension project Futebol Escola, DEF / FC-Unesp, Bauru. There was a previous warm-up of 5 minutes and the participants were analyzed in two 15 minute games in two courts of different sizes (small court, QP = 26 x 18 m and large court, QG = 40 x 20 m). The games were filmed to analyze the technical actions and the players had their heart rate (FC) monitored for intensity analysis and internal game load determination (TRIMP, Edwards method, which considers the effort time in 5 intensity zones of FC in the game). Statistical analysis comprised the paired t-test ($p <0.05$). The game was more intense in the QG, more time in the zone above 85% of the maximum FC, as well as the TRIMP. The total number of technical actions did not differ between the two courts, however, there were more finalizations in QP and more disarms in the QG. The game of futsal presented higher intensity in the QG, whereas, the predominance of the technical actions can vary according to the size of the court.

KEYWORDS: Futsal, Technical Actions, Heart rate and Small-sided games.

1 | INTRODUÇÃO

O futsal surgiu a partir da década de 30 do século passado com uma adaptação do futebol jogado em ginásios (COUTO JUNIOR et al, 2007; ZARATIM, 2012). Atualmente, ele é jogado em uma quadra 40x20 m, medidas oficiais para jogos internacionais, e em dois tempos de 20 minutos cronometrados com 15 min intervalo, com 5 jogadores cada equipe, sendo um deles o goleiro (FIFA, 2014). Embora o futsal seja uma adaptação do futebol para a quadra, suas regras, tais como o peso da bola, número ilimitado de substituições, número de jogadores e espaço menor de jogo, fazem dele um esporte

autêntico, mais dinâmico e de alta intensidade. A intensidade do jogo chega a 90% da frequência cardíaca máxima (FC_{max}) (BARBERO-ALVAREZ et al. 2008), que é superior à média de 85% da FC_{max} verificada no futebol (BANGSBO et al. 2006).

O futsal também pode ser classificado como um jogo em campo reduzido (JCR) adaptado do futebol para a quadra. Nas últimas décadas, os JCRs têm sido estudados como estratégias de treinamento para melhorar o desempenho técnico e tático (JOO et al. 2016), e também a aptidão cardiorrespiratória (IMPELLIZZERI et al. 2006). No JCR os jogadores têm mais contato com a bola e podem jogar mais tempo em alta intensidade em comparação ao jogo de futebol convencional de 11vs11 (HALOUANI et al. 2014). No entanto a intensidade do JCR pode variar de acordo com o tamanho do campo de jogo e número de jogadores, ou seja, o JCR em campo maior e com menos jogadores apresentam maior intensidade (HILL-HAAS et al. 2011). Tal como no JCR do futebol, é possível que a variação do tamanho da quadra possa influenciar na intensidade no futsal.

Além da intensidade, outra característica dos JCR em comparação ao jogo de futebol oficial 11vs11 é o contato com a bola. Estudos com o futebol demonstram que em variações de JCR de 5vs5 e 7vs7 os jogadores têm mais contato com a bola, o que aumentam o número de ações técnicas (CAPRANICA et al. 2001; PSOTTA; BUNC, 2009). Milligan et al. (2007) compararam as ações técnicas do futsal e do jogo em campo reduzido e a quantidade de passes foi maior no futsal do que no jogo em campo reduzido, assim como os chutes ao gol e de desarmes que também foi maior no futsal. Neste caso mesmo reduzindo o campo no futebol (JCR) o futsal apresentou maior contato com a bola e execução de ações específicas.

Segundo Hill-haas et al. (2011), alguns fatores podem alterar a intensidade e no número de ações técnicas em um JCR, entre eles, o espaço de jogo (tamanho da quadra) e o número de jogadores. Se as diferentes configurações de JCR apresentam respostas diferentes e podem auxiliar na preparação física, técnica e tática para o treinamento do futebol, é possível que a variação do tamanho da quadra de futsal também pode apresentar efeitos diferentes sobre parâmetros fisiológicos e ações técnicas. Diferente dos vários estudos de JCR com o futebol, ao nosso conhecimento, não há estudos que investigaram o efeito do jogo de futsal em quadra com diferentes tamanhos com crianças.

Apesar da regra oficial permitir variações na dimensão da quadra, as confederações têm adotado como quadra padrão a medida de 40 x 20 m. Neste contexto, é comum crianças jogarem em quadras oficiais, a qual, ao nosso entendimento, é uma medida inadequada para crianças e jovens e pode, supostamente, apresentar maior intensidade e alterar a dinâmica do jogo. Por outro lado, normalmente, clubes, associações e escolas possuem quadras com dimensões menores daquela oficial. Devido à falta de padrão do tamanho das quadras, as equipes que disputam campeonatos jogam em quadras com dimensões diferentes. Assim, o entendimento do efeito do tamanho da quadra é uma informação importante para a compreensão e desenvolvimento do

futsal. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do tamanho da quadra sobre a intensidade e as ações técnicas do jogo de futsal. Nossa hipótese é que a intensidade seja maior na quadra oficial e que os jogadores tenham maior contato com a bola na quadra menor.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

A amostra foi composta por 20 meninos de 08 a 18 anos (13 ± 3 anos) que participam de um Projeto Educacional, denominado Futebol Escola, da UNESP, FC/Bauru, com aulas somente aos sábados e duração 1h30 para cada turma, as turmas são divididas por horário, a primeira turma até 12 anos e a segunda turma acima de 13 anos. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética local, os voluntários tomaram ciência do estudo e os responsáveis assinaram um termo de consentimento livre esclarecido.

2.2 Desenho e procedimentos experimentais

As coletas de dados aconteceram em 3 dias, entre 9h00 e 12h00. No primeiro dia foram coletados os dados antropométricos, massa corporal, estatura e dobras cutâneas. Nos outros dois dias foram realizados os jogos nas quadras grande (QG) e pequena (QP), aleatoriamente. A massa corporal foi medida em uma balança portátil (TANITA BC553), a estatura com um estadiômetro fixo a parede e as dobras cutâneas, do tríceps e subescapular, medidas com um adipômetro científico (Cescorf, Porto Alegre, Brasil) para o cálculo da densidade corporal, conforme proposto por Slaughter et al. (1988).

Antes dos jogos os participantes executaram um aquecimento de 5 min, compreendendo um minijogo em meia quadra (4vs4), sem goleiros, com o objetivo de manter a posse de bola com o seu time. Após 2-3 min do aquecimento iniciava o jogo de futsal (5vs5, sendo um jogador de cada equipe o goleiro), 15 min de duração. Todos os jogos foram organizados e arbitrados pelos professores responsáveis da equipe, com orientação e incentivo dos respectivos responsáveis por cada equipe. A distribuição dos jogadores dentro das equipes foi equilibrada, de acordo com o nível técnico e feita pelos professores responsáveis.

Os jogos foram realizados em uma quadra grande (QG) com dimensões oficiais (40 x 20 m) e uma quadra pequena (QP) com área total reduzida em 40% (26 x 18 m), esta dimensão da QP tem dimensão similar de quadras de escolas e, por conveniência, haver a quadra com esta dimensão nas dependências da Universidade. Os jogos foram filmados para posterior análise e a frequência cardíaca foi monitorada durante o aquecimento e os jogos.

2.3 Ações técnicas

Os jogos foram filmados com uma Câmera (Sony, HDR-PJ230) e os vídeos foram transferidos para um computador e as ações técnicas foram analisadas posteriormente. As ações técnicas analisadas foram: total de passes (TP = total de passes, quando o jogador bate na bola com os pés direcionando-a ao companheiro da mesma equipe, acertando ou não o passe), finalizações (FIN = chutes à meta adversária), total de desarmes (TD = ações que o jogador sem a bola retira a bola do adversário, ficando ou não com a posse da mesma), domínio (DM = o jogador recebe a bola, mantém-na consigo e da continuidade na ação), contato com a bola (CB = as ações diferentes das citadas acima, tal como o cabeceio, tocar na bola sem dominá-la, rebater a bola sem direção ou objetivo ou “chutão”), total de ações (TA = total de ações técnicas executadas pelo jogador).

2.4 Frequência cardíaca

Para determinar a intensidade do jogo a frequência cardíaca (FC) foi gravada em tempo real, através do monitor de frequência cardíaca Polar Team System 2 (Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia) e, posteriormente, transferidos com um software do mesmo fabricante para o programa Microsoft Office Excel 2010 para análise dos dados. Para agravamento os jogadores tiveram uma fita elástica com o transmissor da FC fixada ao tórax. A intensidade do jogo foi analisada com base em 3 zonas da FC, considerando o tempo de jogo (min) e o percentual (%) do tempo em cada zona de intensidade. As zonas de frequência cardíaca foram estipuladas em: abaixo de 65, 65-85 e maior que 85% da FC máxima (FC_{max}) do jogo (BARBERO-ALVAREZ et al. 2008; DUARTE et al. 2009). A FC média (FC_{med}) dos jogos também verificada e a FC_{max} foi o maior valor da FC registrada dentre os dois jogos. A FC também foi utilizada para calcular a carga interna dos jogadores através do impulso de treinamento (TRIMP) (EDWARDS, 1993), para isso dividimos a FC em cinco zonas de intensidade de acordo com a FC_{max} : zona 1 = 50 a 60%; zona 2: 60 a 70%; zona 3: 70 a 80%; zona 4: 80 a 90%; zona 5: 90 a 100%. O tempo acumulado em cada das cinco zonas de intensidade foi multiplicado pelo valor de cada zona (1-5) e a soma nas cinco zonas de intensidade foi o TRIMP total do jogo.

2.5 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados como o software BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil) e apresentados em média e desvio padrão. A análise estatística foi feita a partir do teste-t para amostras pareadas, com nível de significância pré-fixado em 5% ($p<0,05$).

3 | RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as características da amostra, em relação a peso, altura e percentual de gordura.

Variáveis	
PESO (Kg)	47±15
ALTURA (cm)	160±15
GORDURA (%)	14±4

Tabela 1 – Características antropométricas da amostra.

Valores expressos em média ± desvio padrão.

A tabela 2 apresenta a intensidade dos jogos na QP e QG, comparando a FC_{max} , FC_{med} , e a porcentagem da FC_{med} em relação à FC_{max} dentro das 3 zonas de FC. A intensidade do jogo na QG foi maior do que na QP, assim como a carga interna (TRIMP) dos jogadores.

		QP	QG
FC_{max}	(bpm)	194±10	202±8*
FC_{med}	(bpm)	167±13	180±9*
	(%)	83±6	89±4
<65	(min)	0,9±1	0,2±0,5*
FC_{max}	(%)	6±7	2±4
65-85	(min)	8±4	3±2*
FC_{max}	(%)	50±24	23±17
>85	(min)	7±4	11±3*
FC_{max}	(%)	44±28	75±17
TRIMP	(ua)	3375±537	3914±306*

Tabela 2 – Frequência cardíaca máxima (FC_{max}) e média (FC_{med}), zonas de intensidade <65, 65-85 e >85% da FC_{max} e o impulso do treinamento (TRIMP) nos jogos.

* Diferença significante ($p<0,05$). QP= quadra pequena. QG= quadra grande. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Na Tabela 3 é apresentada a comparação das ações técnicas dos jogadores nos jogos em ambas a quadras. Na QP houve mais finalizações ao gol, enquanto que na QG mais desarmes.

	QP	QG
TP	14,9±7	15,5±5
FIN	3,8±2	2,5±2*
TD	4,5±3	6,4±3*
DM	10,7±6	11±4
CB	3±1	3,2±1
TA	36,8±17	38,5±12

Tabela 3 – Ações técnicas durante o jogo nas quadras grande (QG) e pequena (QP).

* Diferença significante ($p<0,05$). Valores expressos em média \pm desvio padrão. Total de passes (TP). Finalização (FIN). Total de desarme (TD). Domínio (DOM). Contato com bola (CB). Total de ações técnicas (TA).

4 | DISCUSSÃO

O objetivo do estudo foi verificar o efeito do tamanho da quadra sobre a intensidade e ações técnicas no futsal. Nossa hipótese foi de que o jogo seria mais intenso na QG e que na QP os jogadores executariam maior número de ações técnicas. De fato, a intensidade foi maior na QG, e encontramos diferença significante no número de finalizações e total de desarmes entre as duas quadras.

Na QG os participantes ficaram a maior parte do tempo de jogo acima de 85% da FC_{max} . Isso se deve ao espaço para movimentação, quando diminuímos o tamanho da quadra e mantivemos o mesmo número de jogadores, diminuiu o espaço que eles tinham para se movimentar, e o espaço delimitado para a QP não foi suficiente para manter o mesmo ritmo das movimentações. Esse fator fez com que as movimentações da QG fossem maiores. Consequentemente, maior intensidade favorece a melhora da aptidão cardiorrespiratória (IMPELLIZZERI et al. 2006). Um fator que pode ter sido determinante para isso foi a manutenção do número de jogadores, porque a variação do número de jogadores também altera a intensidade do jogo de futebol, e a tendência é que com menos jogadores o jogo fique mais intenso pelo maior espaço disponível (HILL-HAAS et al. 2011). Isso também se refletiu no TRIMP, que mostrou uma carga maior na QG, justamente pela maior movimentação, resultando em maior tempo na zona de maior intensidade. Assim como verificado em estudos no futebol, no futsal, a variação do tamanho da quadra influencia a intensidade do jogo. Esta informação pode ser útil para que treinadores orientarem melhor o treinamento e dosar a intensidade do treino e também para dirigentes esportivos se preocuparem com a intensidade do jogo quando a competição é com crianças ou jovens.

Quando as ações técnicas foram analisadas, os resultados demonstraram que o número total de ações na QG e na QP foram similares. Diferentemente, no futebol, Capranica et al. (2001), Psotta e Bunc (2009) verificaram que o jogo em campo menor aumenta o número de ações técnicas. Analisando mais detalhadamente as ações técnicas, Psotta & Bunc (2009) verificaram que o número de passes, finalizações e contato com a bola foi maior nos jogos de 5x5 do que nos jogos de 8x8 e ambos, 5x5 e 8x8, apresentaram maior número de ações técnicas do que no jogo de campo reduzidos de 11x11, com crianças de 8 anos. Capranica et al. (2001) encontraram um número maior de desarmes em um jogo de 7x7 em relação a 11 x 11, em crianças de 11 anos. Os autores sugeriram que o número de jogadores nas equipes, assim como o tamanho do campo, é determinante para a intensidade e o número de ações técnicas. De fato, com base nestes resultados é possível afirmar que no futebol, o campo reduzido, associado ao número menor de jogadores, proporciona aos jogadores

maior envolvimento com a bola, favorecendo melhor aprimoramento técnico. Por outro lado, nosso objetivo foi comparar apenas a diferença entre o tamanho da quadra, o que difere dos estudos citados acima com futebol. Naqueles estudos, houve alteração do número de jogadores, enquanto que no presente estudo, somente o número de jogadores foi o mesmo, 5 vs 5. Nossos resultados indicam que a QP favorece as finalizações ao gol, enquanto que na QG os desarmes ocorrem em maior quantidade.

Nossos resultados demonstram que, embora o futebol e o futsal possam ser considerados modalidades esportivas similares em relação às ações técnicas, elas têm características e peculiaridades diferentes que ainda precisam ser mais estudadas. Nossos resultados apontam que o jogo de futsal na QP ocorre maior número de finalizações, possivelmente devido a maior proximidade que os jogadores estão da meta, enquanto eu na QG os desarmes ocorrem em maior número na QG.

Considerando os resultados obtidos nessa pesquisa e os resultados dos autores acima citados, vemos que realmente reduzir a área de jogo pode trazer um grande benefício, porém não é a única coisa que deve ser explorada, a variação no número de jogadores também é importante. Como ultimas considerações, no futsal, os resultados mostraram que a QG tem maior intensidade do que a QP, porém dependendo do objetivo do treinamento a QP, quadra reduzida, pode ser utilizada para o aprimoramento de ações técnicas específicas, como a finalização. No entanto, mais estudos ainda são necessários para melhor entendimento das ações técnicas, que envolvam jogadores de faixas etárias diferentes, assim como a variação do número de jogadores.

5 | CONCLUSÕES

O jogo na QG foi mais intenso. A $FC_{\text{máx}}$ e $FC_{\text{méd}}$ foram maiores na quadra QG. Os jogadores ficaram a maior parte do tempo em intensidade acima de 85% da FC_{max} , o que torna o jogo mais intenso, carga que também foi conferida pelo TRIMP. Em relação às ações técnicas, houve diferença significante entre as quadras, com maior número de finalizações na QP e mais desarmes na QG.

Comparando os efeitos da QG e da QP, foi possível verificar que o treinamento em quadras com dimensões diferentes podem ser utilizadas para direcionar as adaptações ao treinamento, seja no aspecto físico como técnico. Estes resultados podem ser úteis para que os treinadores direzionem seus treinamentos, de acordo com os seus objetivos a serem alcançados.

REFERÊNCIAS

BANGSBO, J.; MOHR, M.; KRISTRUP, P. **Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player**. Journal of Sports Sciences, v. 24, n.7, p. 665-74, 2006.

BARBERO-ÁLVAREZ, J. C.; SOTO, V. M.; BARBERO-ÁLVAREZ, V.; GRANDA-VERA, J. **Match**

analysis and heart rate of futsal players during competition. Journal of Sports Sciences, v. 26, n. 1, p. 63-73, 2008.

CAPRANICA, L.; TESSITORE, A.; GUIDETTI L.; FIGURA, F. **Heart rate and match analysis in pre-pubescent soccer players.** Journal of Sports Sciences, v. 19, n. 6, p. 379-84, 2001.

COUTO JUNIOR, J.M.; MORENO, R.M.; SOUZA, A.F.; PRADO, M.M.; MACHADO, A.A. **A influência da torcida na performance de jogadores brasileiros de Futsal: um viés da Psicologia do Esporte.** Revista Motriz, v.13, n.4, p.259-265, 2007.

EDWARDS, S. **The Heart Rate Monitor Book.** Sacramento, C. A: Fleet Feet Press; 1993.

FIFA - Fédération Internationale de Football Association. **Laws of the game**, 2014.

HALOUANI, J.; CHTOUROU, H.; GABBETT, T.; CHAOUACHI, A.; CHAMARI, K. **Small-sided games in team sports training: a brief review.** Journal of Strength and Conditioning Research, v. 28, n.12, p. 3594-3618, 2014.

HILL-HAAS, V.; DAWSON, B.; IMPELLIZZERI, F.M.; COUTTS, A.J. **Physiology of small-sided games training in football.** Sports Medicine, v.41, n.3, p. 199-220, 2011.

IMPELLIZZERI, F.M.; MARCORA, S.M.; CASTAGNA, C.; REILLY, T.; SASSI, A.; IAIA, F.M.; RAMPININI, E. **Physiological and performance effects of generic versus specific aerobic training in soccer players.** International Journal of Sports Medicine, v. 27, n. 6, p. 483-492, 2006.

JOO, C.H.; HWANG-BO, K.; JEE, H. **Technical and physical activities of small-sided games in young Korean soccer players.** The Journal of Strength & Conditioning Research, v.30, n.8, p. 2164-2179, 2016.

MILLIGAN, I.; BORRIE, A.; HORN, R. **Technical analysis of Futebol de Salao and mini-football.** The online F.A. Coaches Association Journal, 2007.

PSOTTA, R.; BUNC, V. **Heart rate response and game-related activity of younger school-age boys in different formats of soccer game.** Ovidius University Annals, Series Physical Education and Sport/science, movement and health, v. 9, n. 1, p. 69-73, 2009.

ZARATIM, S. **Aspectos socioculturais do Futsal.** Revista Eletrônica de Educação da Faculdade Araguaia, v.2, n.4, p. 51-62, 2012.

EFEITOS DO ALONGAMENTO AGUDO SOBRE A FORÇA DE MEMBROS SUPERIORES NO ARREMESSO DO ATLETISMO

Fernando Barbosa Carvalho

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Educação Física
Bauru – São Paulo

Márcio Pereira da Silva

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências, Departamento de Educação Física
Bauru – São Paulo

RESUMO: Analisou-se o efeito do alongamento sobre a força de arremesso entre homens ($34,33 \pm 16,97$ anos de idade; $80,97 \pm 5,59$ kg de massa corporal, $1,79 \pm 0,03$ m de estatura e IMC de $25,14 \pm 2,68$ kg/m²), após 4 sequências envolvendo corridas submáximas (CS), alongamentos estáticos (AE) ou dinâmicos (AD), educativos e medidas de força [(F) aplicadas em 2 momentos (F1 e F2)]: (Seq1)=CS+Educativos+F1+AE+F2; (Seq2)=CS+Educativos+F1+AD+F2; (Seq3)=CS+AE+F1+Educativos+F2; (Seq4)=CS+AD+F1+Educativos+F2. Realizaram-se: 4 séries de alongamento (estático ou dinâmico) para os músculos tríceps e bíceps braquial, peitoral, dorsal e oblíquos; 2 séries de educativos [flexoestensões de cotovelos, extensão unilateral de cotovelos acima da linha do ombro (desenvolvimento) e elevação frontal,

ambos sustentando medicineball de 4kg, num total de 10 movimentos cada lado]. Utilizou-se potenciômetro linear (Peak Power, CEFISE) conectado ao aparelho *Cross Over* (AXCESS), permitindo obter medidas de potência [pico (PP) e média (PM) em watts], força [pico (FP) e média (FM) em newtons] e velocidade (V, m/s) na fase concêntrica do movimento de arremesso executado com mecânica similar ao arremesso do peso (analisando-se a melhor de 3 tentativas). Para comparação dos dados utilizou-se análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Newman-Keuls, com nível de significância de $p < 0,05$. Não foram observadas diferenças significativas para PP, PM, FP, FM e V, nas 2 sequências envolvendo AE e educativos (Seq1 e Seq3), nem nas 2 sequências envolvendo AD e educativos (Seq2 e Seq4). Conclui-se que o alongamento prévio, conforme o protocolo aqui aplicado, não altera as medidas de força e velocidade na execução de arremessos como o do peso.

PALAVRAS-CHAVE: alongamento estático; alongamento dinâmico; força muscular; arremesso.

EFFECTS OF ACUTE STRETCHING ON UPPER LIMB STRENGTH IN SHOT PUT

ABSTRACT: The effect of the stretching on the throwing force between men (34.33 ± 16.97 years old, 80.97 ± 5.59kg of body mass, 1.79 ± 0.03m of height and BMI of 25, was analyzed after 4 sequences involving submaximal run (SR), static (SS) or dynamic (DS) stretching, educational exercises (EE) and force measurements [(F) applied in 2 moments (F1 and F2)],: (Seq1)=SR+EE+F1+SS+F2; (Seq2)=SR+EE+F1+DS+F2; (Seq3)=SR+SS+F1+EE+F2; (Seq4)=SR+DS+F1+EE+F2. There were: 4 sets of stretching (static or dynamic) for the triceps and biceps brachial, pectoral, dorsal and oblique muscles; 2 sets of educational [elbow flexion stretches, unilateral extension of elbows above the shoulder line (development) and frontal elevation, both supporting 4kg medicineball, in a total of 10 movements each side]. A linear potentiometer (Peak Power, CEFISE) connected to the Cross Over (AXCESS) device was used to obtain power (peak (PP) and average (AP) watts], force [peak (PF) and average (AF) in newtons] and velocity (V, m / s) in the concentric phase of the throwing movement performed with mechanics similar to the shot put (analyzing the best of 3 trials). Variance analysis (ANOVA) for repeated measures was used to compare the data, followed by Newman-Keuls post hoc, with a significance level of $p < 0.05$. No significant differences were observed for PP, AP, PF, AF and V in the 2 sequences involving SS and EE (Seq1 and Seq3), nor in the 2 sequences involving DS and EE (Seq2 and Seq4). It is concluded that the previous stretching, according to the protocol applied here, does not alter the measures of force and speed in the execution of pitch like that of the shot put.

KEYWORDS: static stretching; dynamic stretching; muscle strength; pitch.

1 | INTRODUÇÃO

A força muscular, em suas diferentes manifestações (estática/isométrica e dinâmica) e níveis de exigência (máxima, explosiva e resistência), está comumente associada ao desempenho em uma grande variedade de atividades físicas, esportivas ou não.

Embora um programa adequado de treinamento seja determinante para promover melhorias no desempenho de força, intervenções agudas voltadas à preparação para suportar tais demandas, como aquelas envolvendo aquecimentos e/ou alongamentos previamente às atividades alvo, podem afetar negativamente o seu desenvolvimento/desempenho.

Sessões de aquecimento, realizadas no início de programas de exercícios (treinos) ou previamente à participação em competições, tem por objetivo preparar o organismo para as exigências provenientes dessas atividades.

Aumentos na temperatura muscular, decorrentes do aquecimento, podem favorecer melhoria no desempenho em eventos de curta duração, devido ao alcance de movimento em torno das articulações, aumento na estimulação nervosa e alteração favorável na relação força-velocidade (BISHOP, 2003).

No meio esportivo, em geral, o aquecimento é composto por corrida submáxima em distâncias variadas, seguida de alongamento dos principais grupamentos musculares e de exercícios específicos que envolvem habilidades relacionadas com a modalidade para a qual se destina a preparação (TAYLOR et al., 2008).

O alongamento muscular, frequentemente realizado antes das atividades atléticas, tem por objetivo reduzir o risco de lesões, diminuir a dor muscular pós-exercício e melhorar o desempenho atlético (SWANSON, 2006).

Enquanto a importância do aquecimento para a prática esportiva está consolidada e bem documentada (DI ALENCAR e MATIAS, 2008), não há consenso na literatura sobre os benefícios do alongamento prévio para o desempenho esportivo, especialmente quando realizado antes de atividades com exigência de força e potência musculares.

Existem evidências que indicam ocorrer redução no desempenho de força imediatamente após o alongamento estático, destacando-se efeitos negativos sobre a força máxima dinâmica (KOKKONEN et al., 1998), força isométrica (POWER et al., 2004), resistência de força (NELSON et al., 2005a; ENDLICH et al., 2009), força explosiva nos saltos verticais (YOUNG e BEHM, 2003; BEHM et al., 2006; YOUNG et al., 2006; VETTER, 2007; MALMONGE FILHO, 2011), e desempenho em sprints (NELSON et al., 2005b; STEWART et al., 2006; SIM et al., 2009; CHAOUACHI et al., 2010; KLISTER et al., 2010).

Em contrapartida, outros trabalhos defendem que o alongamento estático prévio não promove mudanças significativas nos níveis de potência muscular (POWER et al., 2004), principalmente quando realizado em nível submáximo (CARVALHO et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2010), talvez em razão do baixo ponto de desconforto muscular utilizado durante o alongamento submáximo.

Por outro lado, estudos apontam melhora no tempo de sprints após o alongamento dinâmico (FLETCHER e JONES, 2004), bem como no desempenho de saltos após alongamento estático (GOMES, 2008) ou dinâmico (HOUGH et al., 2009).

Considerando trabalhos que analisam os efeitos do alongamento sobre os níveis de força em tarefas executadas com os membros superiores, Nogueira e Del Vecchio (2008) identificaram piora na precisão do arremesso de 9 metros entre 50% das jogadoras de handebol após o alongamento estático, quando comparadas à condição sem estímulos prévios (exercício resistido ou alongamento). Arruda et. al. (2006) observaram queda no número de repetições máximas para o exercício supino durante o teste de 10RM quando este foi precedido por alongamento estático. Pereira, et al (2011) também identificaram efeitos redutores do alongamento estático (34,7%) sobre o desempenho na resistência de força em membros superiores (cargas no supino horizontal para 10RM), atribuídos à influência do alongamento sobre a rigidez musculotendínea.

Evertovich et. al. (2003) avaliaram o efeito de uma sessão aguda de alongamento estático do bíceps braquial sobre o torque, eletromiografia (EMG) e mecanomiografia

(MMG) durante ações musculares isocinéticas concêntricas, cujos resultados sugerem que a realização de atividades que reduzem a rigidez muscular (como alongamento), pode ser prejudicial para o desempenho.

A ausência de consistência nos resultados desses estudos pode ser decorrente dos diferentes protocolos utilizados, em que se observa variação quanto: (a) a duração, intensidade e modalidade do alongamento empregado; (b) aos grupos musculares envolvidos; (c) a aplicação isolada do alongamento ou em conjunto com outras estratégias no aquecimento; (d) a ordem de execução do alongamento quando associado a outras estratégias para aquecimento, e (e) às condições climáticas durante as intervenções, dentre outros fatores.

Na área esportiva, são poucos os trabalhos que têm como foco a avaliação de parâmetros de força relacionados aos membros superiores, especialmente quanto à força explosiva.

Considerando-se o fato de que estimular habilidades específicas para uma determinada exigência esportiva possa contornar ou minimizar a perda de rendimento após a aplicação prévia de alongamento, faz-se importante observar quais os efeitos decorrentes da inclusão de educativos e alongamentos no aquecimento do atletismo, sobre o desempenho na força empregada durante a realização do arremesso.

Desse modo, o presente projeto possibilitou esclarecer se tais rotinas de aquecimento, envolvendo diferentes métodos de alongamento, favorecem melhoria de desempenho no arremesso do peso, auxiliando arremessadores na preparação para suas sessões de treinamento e competições.

2 | OBJETIVOS

2.1 Geral

Este estudo teve por objetivo principal analisar o efeito de protocolos de aquecimento envolvendo diferentes métodos de alongamento sobre o desempenho de força no arremesso do atletismo.

2.2 Específicos

- Analisar os efeitos agudos do alongamento estático prévio sobre o desempenho no arremesso;
- Analisar os efeitos agudos do alongamento dinâmico prévio sobre o desempenho no arremesso.

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

A amostra desse estudo foi composta por participantes homens com $34,33 \pm 16,97$ anos de idade; $80,97 \pm 5,59$ kg de massa corporal, $1,79 \pm 0,03$ m de estatura e IMC de $25,14 \pm 2,68$ kg/m², praticantes de atividades físicas da cidade de Bauru. Para inclusão no estudo, os participantes atenderam aos seguintes critérios: (a) possuir experiência em rotinas e mecânicas de movimentos semelhantes a do arremesso, (b) não estar lesionados durante a realização dos testes, e (c) assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da instituição, relacionado ao projeto de pesquisa.

3.2 Procedimentos

Para caracterização dos participantes, seus pesos (kg) e alturas (m) foram registrados para cálculo do IMC (kg/m²). Todos os participantes foram orientados a evitar a prática de atividades físicas intensas por 24 horas antes das sessões de protocolos.

Os protocolos envolvendo corridas submáximas (CS), alongamentos, educativos e os testes para medidas da força de arremesso (F), obedeceram quatro sequências distintas:

1 – CS + Educativos + F1 + Alongamento Estático + F2;

2 – CS + Educativos + F1 + Alongamento Dinâmico + F2;

3 – CS + Alongamento Estático + F1 + Educativos + F2;

4 – CS + Alongamento Dinâmico + F1 + Educativos + F2.

Em cada uma das quatro sequências propostas, o teste aplicado no momento 1 (F1-inicial) foi o mesmo aplicado no momento 2 (F2-final).

3.2.1 Educativos

Os exercícios educativos realizados foram:

(a) flexoextensões de cotovelos no solo, cuja amplitude correta de movimento teve por referência a extensão completa dos cotovelos na fase ascendente do movimento, e flexão de cotovelos até encostar (sem descansar) o peito no solo durante a fase descendente do movimento. O número de repetições realizadas deverá corresponder a 30% do número máximo conseguido até a exaustão (medida realizada fora dos dias de teste). Foram realizadas 2 séries de movimentos intercaladas por 3 minutos de intervalo.

(b) extensão de cotovelos acima da linha do ombro, alternando um lado e outro, sustentando medicineball de 5 quilos, num total de 10 movimentos para cada lado.

Foram realizadas 2 séries de movimentos intercaladas por 3 minutos de intervalo.

(c) elevação frontal, sustentando medicineball com alça (4kg), partindo da posição de braço estendido ao lado da coxa. Ocorre movimentação simultânea dos braços, de modo que a mão que sustenta o medicineball se encontra com a mão livre à frente do tórax, o medicineball troca de mão e os braços retornam para lateral do tronco ao lado da coxa. Foram realizados 10 movimentos resistidos para cada lado, num total de 2 séries de movimentos intercaladas por 3 minutos de intervalo.

O intervalo entre o último educativo realizado e a 1^a tentativa dos testes de força foi de 3 minutos.

3.2.2 Alongamentos

O alongamento estático compreendeu estímulos para 5 grupos musculares: tríceps braquial, bíceps braquial, peitoral, dorsal e oblíquos. Foram realizadas 4 séries de estímulos para cada grupo muscular, com intervalo de 5 segundos entre as séries. O participante manteve cada posição durante 6 segundos no limite normal de sua amplitude articular e após um novo forçamento, com a maior amplitude de movimento possível, mantendo por mais 10 segundos.

O alongamento dinâmico compreendeu os mesmos 5 grupos musculares, com os estímulos sendo realizados de forma dinâmica (movimento de vai e vem). Foram realizadas quatro séries de 10 -15 repetições para cada movimento, com intervalo de 10 segundos entre as séries.

O intervalo entre o último alongamento realizado e a 1^a tentativa dos testes de força deve ser de 3 minutos.

3.2.3 Medidas de força

Considerando-se que, no atletismo, o arremesso peso possue mecânica específica de execução, os testes de força que foram empregados buscaram reproduzir os padrões de movimento realizados pelos membros superiores e tronco durante a fase final do arremesso.

O arremesso foi realizado com o participante posicionado lateralmente para a coluna de pesos do equipamento. A mão empunha a alça conectada ao cabo de tração da coluna de pesos, e foi mantida próxima à lateral da face (bochecha). O braço, do mesmo lado, mantem com o cotovelo flexionado e levemente afastado da lateral do tronco. No início do movimento, o tronco realiza um semi giro de modo que o participante se posiciona de costas para a coluna de pesos, enquanto o cotovelo é estendido e a mão direcionada à frente, finalizando o movimento com o braço posicionado à frente do corpo, formando um ângulo aproximado de 45º acima da linha do ombro. Durante todo o movimento, os participantes foram mantidos sentados em uma cadeira ou banco com altura regulável, que permita o semi giro do tronco, também com o objetivo

de inibir a participação dos membros inferiores na transmissão de força ao movimento realizado.

Foi realizada medida da potência gerada nos arremessos, por meio de um potenciômetro linear (Peak Power, CEFISE) conectado à coluna de pesos do aparelho *Cross Over* (AXCESS). O potenciômetro emite um sinal elétrico a cada revolução realizada e, uma vez conhecida a distância percorrida entre dois sinais emitidos, obteve-se o deslocamento da coluna de pesos. O equipamento permitiu obter medidas de potência, força e velocidade na fase concêntrica de cada movimento.

Os participantes foram orientados a realizar o movimento o mais rápido possível sem perder o contato com a alça que será empunhada. Foram realizadas 3 tentativas de arremesso, com três minutos de intervalo entre elas. Para reproduzir o posicionamento do tronco, braços e mãos em cada tentativa, foram utilizadas como referência posições previamente gravadas quando da familiarização dos participantes com o protocolo.

Em cada sequência, ao final das corridas submáximas, dos educativos e dos alongamentos (estático e dinâmico) foi mensurada a frequência cardíaca (FC) dos participantes. O acompanhamento da FC após os estímulos em cada sequência permitiu acompanhar suas intensidades e possíveis interferências sobre os resultados dos testes de força. O intervalo mínimo entre uma sequência e outra foi de 48 horas.

3.3 Tratamento Estatístico

Os dados (expressos em média \pm desvio padrão) foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa/software estatístico InStat.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada a FC após as corridas submáximas, educativos e protocolos de alongamentos estáticos e dinâmicos, com objetivo de monitorar a intensidade das atividades realizadas previamente ao teste de força em cada sequência de aquecimento.

Não foi observada diferença significativa na FC obtida após as corridas submáximas nos 4 protocolos e não houve diferença significativa inter ou intra sequências para os valores de FC obtidos pós-educativos e pós-alongamentos estáticos ou dinâmicos.

Os valores correspondentes aos arremessos nas sequências de 1 a 4 encontram-se apresentados na Tabela 1.

Sequência	Medida	PP (watt)	PM (watt)	FP (newton)	FM (newton)	V (m/s)
1	pós-educativos	239,52 $\pm 61,20$	138,38 $\pm 32,11$	150,01 $\pm 27,56$	123,58 $\pm 16,93$	1,11 $\pm 0,11$
	pós-along. estático	236,39 $\pm 61,48$	133,63 $\pm 31,98$	141,23 $\pm 9,56$	110,54 $\pm 3,54$	1,14 $\pm 0,19$

	pós-educativos	215,30 ±43,13	111,47 ±25,13	125,55 ±11,03	106,02 ±8,74	1,05 ±0,15
2	pós-along. dinâmico	209,32 ±15,28	107,15 ±2,88	123,69 ±4,94	103,54 ±3,25	1,04 ±0,02
3	pós-along. estático	236,55 ±53,77	123,22 ±25,07	136,32 ±10,99	114,78 ±8,57	1,07 ±0,16
	pós-educativos	201,10 ±33,99	104,03 ±12,58	121,15 ±2,07	105,46 ±3,04	1,00 ±0,10
4	pós-along. dinâmico	219,17 ±53,92	109,22 ±32,14	150,01 ±27,56	108,30 ±14,61	1,04 ±0,20
	pós-educativos	209,90 ±49,37	104,64 ±21,64	141,23 ±9,56	103,49 ±6,71	1,01 ±0,16

Tabela 1- Medidas de potência, força e velocidade obtidas em cada uma das 4 sequências

PP=potência pico; PM= potência média; FP= força pico; FM= força média; V= velocidade

Na sequência 1, não foram encontradas diferenças significativas nas medidas obtidas pós-educativos e pós-alongamento estático, assim como na sequência 3, nas medidas obtidas pós-alongamento e pós educativos. O mesmo comportamento foi observado na sequência 2 (pós-educativos e pós-alongamento dinâmico) e sequência 4 (pós-alongamento dinâmico e pós-educativos).

Curiosamente, observaram-se semelhanças no comportamento dos resultados encontrados nos quatro protocolos, onde nota-se uma tendência quanto às tentativas realizadas após os primeiros estímulos terem melhores médias do que as tentativas realizadas após os segundos estímulos.

Quando ocorrem alterações plásticas no tecido, verifica-se um enfraquecimento agudo do mesmo seguido de uma reorganização molecular. Se as tensões de alongamento forem muito acentuadas e não houver tempo de recuperação é que ocorrerá perda de força. (ACHOUR JÚNIOR, 2006).

É possível que alterações na plasticidade das estruturas mioarticulares das regiões envolvidas nos alongamentos empregados neste estudo, decorrentes da intensidade, duração e número de séries destes alongamentos tenham sido totalmente revertidas até o momento de execução dos arremessos, de modo a não comprometer seus desempenhos.

Conclui-se, portanto, que o alongamento prévio, conforme o protocolo aqui aplicado, não altera as medidas de força e velocidade na execução de arremessos tal como o arremesso do peso.

Novos estudos envolvendo protocolos relacionados à força de membros superiores de diversas modalidades seriam de grande importância para ajudar a desenvolver procedimentos de treino e de preparação de atletas em competições.

REFERÊNCIAS

ACHOUR JÚNIOR A. **Exercícios de Alongamento.** Anatomia e fisiologia, 2ed, Barueri, SP, Manole, 2006.

ACHOUR JÚNIOR A. **Bases para exercícios de alongamento:** relacionado com a saúde e no desempenho atlético. 2.ed. Londrina: Phorte Editora, 1999.

ARNHEIM DD, PRENTICE WE. Técnicas de treinamento e de condicionamento. In: ARNHEIM DD, PRENTICE WE. **Princípios de treinamento atlético.** 10^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002 (cap.4).

ARRUDA F.L.B. et al. A Influência do Alongamento no Rendimento do Treinamento de Força. **Revista Treinamento Desportivo** v. 7, p.1-5, 2006.

BEHM DG et al. Flexibility is not related to stretch-induced deficits in force or power. **J Sports Sci Med** 2006; **5**: 33–42.

BISHOP D. Warm-up II. Performance changes following active warm-up and how to structure the warm-up. **Sports Med.** 2003; **33**: 483-98.

CARVALHO FLP et al. Efeitos agudos do alongamento estático e da facilitação neuromuscular proprioceptiva no desempenho do salto vertical de tenistas adolescentes. **Fit Perf J.** 2009; **8**(4): 264-8.

CHAOUACHI A et al. Effect of warm-ups involving static or dynamic stretching on agility, sprinting, and jumping performance in trained individuals. **J Strength Cond Res.** 2010; **24**(8): 2001-11.

CONCEIÇÃO MCSC et al. Efeitos de quatro tempos diferentes de permanência de flexionamento estático na flexibilidade de adultos jovens. **Fit Perf J.** 2008; **7** (2): 88-92.

DANTAS EHM. **Flexibilidade, alongamento e flexionamento.** 5 ed. Rio de Janeiro: Shape, 2005.

DI ALENCAR TAM, MATIAS KFS. Princípios fisiológicos do aquecimento e alongamento muscular na atividade esportiva. **Rev Bras Med Esporte.** 2010; v. 16, n 3: 230-34.

ENDLICH PW et al. Efeitos agudos do alongamento estático no desempenho da força dinâmica em homens jovens. **Rev Bras Med Esporte.** 2009; v. 15, n. 3: p.200-203.

EVERTOVICH T. K. et al. Effect of static stretching of the biceps brachii on torque, electromyography, and mechanomyography during concentric isokinetic muscle actions. **J Strength Cond Res** 2003; **17**:484-8.

FLETCHER IM, JONES B. The effect of different warm-up stretch protocols on 20 meter sprint performance in trained rugby union players. **J Strength Cond Res.** 2004; **18**(4): 885-8.

GALDINO LAS et al. Comparação entre os níveis de força explosiva de membros inferiores antes e após flexionamento passivo. **Fitness & Performance Journal**, v.4, n.1, p. 11-15, 2005.

GOBBI S, VILLAR R, ZAGO AS. **Bases teórico-práticas do condicionamento físico.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

GOMES LS. A influência do alongamento estático no teste de salto vertical e na corrida de 400 metros em atletas jovens de basquetebol do sexo masculino. **Arquivos em Movimento.** 2008; v4 (2):56-63.

HOUGH PA, ROSS EZ, HOWATSON G. Effects of dinymic and static stretchinh on vertical jump performance and electromyographic activity. **J Strength Cond Res** 2009; **23**(2): 507-12.

- KAY, A. D.; A. J. BLAZEVICH. Effect of Acute Static Stretch on Maximal Muscle Performance: A Systematic Review. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n. 1, p. 154–164, 2012.
- KISTLER BM et al. The Acute Effects of Static Stretching on the Sprint Performance of Collegiate Men in the 60- and 100-m Dash After a Dynamic Warm-Up. **J Strength Cond Res.** 2010; 24(9): 2280-4.
- KOKKONEN J, NELSON A, CORNWELL A. Acute muscle stretching inhibits maximal strength performance. **Res Q Exerc Sport** 1998;69:411–5.
- NELSON AG, KOKKONEN J, ARNALL DA. Acute muscle stretching inhibits muscle strength endurance performance. **Strength Cond Res.** 2005a; 19(2): 338-43.
- NELSON AG et al. Acute effects of passive muscle stretching on sprint performance. **J Sports Sci.** 2005b; 23(5): 449–54.
- NOGUEIRA MQ; DEL VECCHIO FB. Efeitos do treino de flexibilidade e força funcional na precisão em teste de handebol. **Coneções**. 2008; 6: 122-131.
- NOGUEIRA CJ et al. Efeito agudo do alongamento submáximo e do método de Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva sobre a Força Explosiva. **HU Revista**. 2009; v. 35, n. 1: p. 43-48.
- NOGUEIRA CJ et al. Efeito agudo do alongamento estático sobre o desempenho no salto vertical. **Motriz**. 2010; v.16, n.1: p.10-16.
- POWER K et al. An acute bout of static stretching: effects on force and jumping performance. **Med Sci Sports Exerc** 2004; **36**:1389–96.
- SIM AY et al. Effects of static stretching in warm-up on repeated sprint performance. **J Strength Cond Res.** 2009; 23(7): 2155-62.
- STEWART M et al. Warm-up or stretch as preparatiom or sprint performance? **J Sci Med Sport**. 2007; 10: 403-410.
- SWANSON J. A functional approach to warm-up and flexibility. **Strength Cond J.** 2006; 28: 30-36.
- TAYLOR KL et al. Negative effect of static stretching restored when combined with a sport specific warm-up component. **J Sports Sci Med.** 2008, 12: 657-661.
- VAREJÃO RV, DANTAS EHM, MATSUDO SMM. Comparação dos efeitos do alongamento e do flexionamento, ambos passivos, sobre os níveis de flexibilidade, capacidade funcional e qualidade de vida do idoso. **R. Bras. Ci. e Mov.** 2007; 15(2): 87-95.
- VASCONCELLOS FVA et al. Efeitos do flexionamento dinâmico agudo na impulsão vertical de jogadores de futebol. **Fit Perf J.** 2010; 9(1): 5-9.
- VETTER RE. Effects of six warm-up protocols on sprint and jump performance. **J Strength Cond Res.** 2007; 21(3): 819-23.
- YOUNG WB, BEHM DG. Effects of running, static stretching and practice jumps on explosive force production and jumping performance. **J Sports Med Phys Fitness**. 2003; 43(1): 21-7.
- YOUNG W, ELIAS G, POWER J. Effects of static stretching volume and intensity on plantar flexor explosive force production and range of motion. **J. Sports Med Phys Fitness**. 2006; 46(3): 403-11.

INFLUÊNCIA DA CARGA TABAGÍSTICA SOBRE O TRANSPORTE MUCOCILIAR NASAL DE TABAGISTAS ATIVOS

Alessandra Mayumi Marques Masuda

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Iara Buriola Trevisan

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Tamara Gouveia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Caroline Pereira Santos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Guilherme Yassuyuki Tacao

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Tamires Veras Soares

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Ercy Mara Cipulo Ramos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e

Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

Dionei Ramos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologias FCT-UNESP Campus de Presidente Prudente/SP – Departamento de Fisioterapia.

RESUMO: O tabagismo é um dos principais fatores de risco para as doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares. A exposição crônica à fumaça do cigarro também leva ao comprometimento do transporte mucociliar, principal mecanismo de defesa das vias aéreas. Tabagistas apresentam maior tempo de trânsito da sacarina comparada a não fumantes, sendo a carga tabagística um dos principais fatores causadores.

Objetivo: Verificar a resposta do transporte mucociliar frente a carga tabagística de fumantes leves e moderados.

Método: Participaram 27 indivíduos tabagistas, independente do sexo, divididos em dois grupo de acordo com sua carga tabagística: fumantes leves (G1; n=10; $9,1 \pm 1,5$ cigarros/dia) e fumantes moderados (G2; n=17; $18,9 \pm 2,7$ cigarros/dia). Foram coletados dados pessoais, antropométricos e histórico tabagístico, realizado teste de função pulmonar por meio da espirometria, coleta de

monóxido de carbono no ar exalado (COex:<10 ppm) e realizado o teste de tempo de trânsito da sacarina (TTS) para avaliação do transporte mucociliar nasal (TMC nasal). Dados de umidade e temperatura do ar foram registrados para manter o ambiente controlado. **Análise estatística:** A normalidade dos dados foi dada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Na comparação entre os grupos foi utilizado teste T de Student para amostras independentes ou teste de Mann-Whitney dependendo da normalidade dos dados. Nível de significância adotado de $p<0,05$. **Resultados:** G1 apresentou tempo de TTS de $7,5 \pm 3,6$ minutos e G2 de $11,7 \pm 3,9$ minutos ($p=0,011$). **Conclusão:** Indivíduos que consomem maior número de cigarros por dia apresentam lentidão do TMC nasal e consequentemente comprometimento desse mecanismo de defesa.

PALAVRAS-CHAVE: tabagismo, uso de tabaco, depuração mucociliar.

ABSTRACT: Smoking is a major risk factor for chronic noncommunicable diseases such as cancer, lung diseases and cardiovascular diseases. Chronic exposure to cigarette smoke also leads to compromised mucociliary transport, the main defense mechanism of the airways. Smokers have a longer saccharin transit time compared to non-smokers, with smoking being one of the main causative factors. **Methods:** Twenty-seven smokers, both gender, were divided into two groups according to their smoking load: mild smokers (G1; $n = 10$; $9,1 \pm 1,5$ cigarettes / day) and moderate smokers (G2; $n = 17$; $18,9 \pm 2,7$ cigarettes / day). Personal data, anthropometric data and smoking histories were collected, pulmonary function test spirometry, carbon monoxide exhaled air (COex: <10 ppm) and the saccharin transit time test (TTS) was performed to evaluate the nasal mucociliary transport (nasal MCT). Humidity and air temperature data were recorded to maintain the controlled environment. **Statistical analysis:** Normal data was used for the Shapiro-Wilk test. In the comparison between the groups, Student's T-test was used for independent samples or test of Mann-Whitney depending on the normality of the data. The significance was adopted $p <0,05$. **Results:** G1: TTS time of $7,5 \pm 3,6$ minutes and G2 of $11,7 \pm 3,9$ minutes ($p = 0,011$). **Conclusion:** Individuals who consume the largest number of cigarettes per day have a slow nasal CT scan and compromising this defense mechanism.

KEYWORDS: smoking, tobacco use, mucociliary clearance.

1 | INTRODUÇÃO

O tabagismo é um dos principais fatores de risco para as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como câncer, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares. Sendo responsável por mais de sete milhões de mortes anualmente, dentre estas mais de seis milhões ocorrem devido ao uso direto do tabaco (ONU, 2018; ONU, 2019).

A exposição crônica à fumaça do cigarro também leva ao comprometimento do transporte mucociliar (TMC), conhecido por ser o principal mecanismo de defesa das vias aéreas contra patógenos e agentes nocivos que adentram o trato respiratório como os componentes presentes no cigarro. Isto pode ser explicado por alterações

como, aumento do número de células caliciformes, responsáveis pela produção de muco e redução das células ciliadas com diminuição do batimento ciliar, dentre outras (PAGLIUCA, 2015; RAMOS, 2011; ZHOU, 2016).

Contudo, a eficácia desse sistema mucociliar depende da interação da frequência e coordenação do batimento ciliar com a qualidade do muco e suas propriedades viscoelásticas. E dessa forma a alterações no epitélio respiratório comprometem o funcionamento desse mecanismo de defesa, propiciando maior vulnerabilidade à afecções respiratórias (GOHY, 2916; ADMIRALL, 2014; BENNETT, 2014).

Estudos prévios mostram que o transporte mucociliar nasal em indivíduos tabagistas é lentificado comparado a indivíduos não fumantes, quando avaliado pelo teste de tempo de trânsito da sacarina (TTS) (STALEY 1986; RAMOS, 2011; ITO, 2015).

Dessa forma, o objetivo do estudo foi comparar o comportamento do TCM nasal entre de fumantes leves e moderados.

2 | CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Amostra

Foram avaliados 27 indivíduos tabagistas com idade entre 18 e 60 anos. independente do sexo, convidados por meio de divulgação digital e folhetos,

Os indivíduos foram classificados e divididos em dois grupos de acordo com sua carga tabágica: G1: tabagistas leves (consomem de 1 a 10 cigarros/dia) e G2: tabagistas moderados (consomem de 11 a 20 cigarros/dia) (KONDO, 2011).

Foram excluídos: (1) indivíduos clinicamente instáveis, com alterações em medicações por pelo menos 30 dias; (2) indivíduos com doenças cardiorrespiratórias crônicas pré-existentes, com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) diagnósticas por médico; com história de cirurgia ou trauma nasal, desvio de septo nasal; (3) indivíduos com qualquer outra condição patológica que possa influenciar o processo inflamatório sistêmico (doenças metabólicas ou reumáticas); (4) indivíduos que faziam uso de medicamentos para reposição de nicotina e/ou antidepressivos como auxílio na parada do fumo; (5) indivíduos que faziam uso abusivo de álcool.

Todas as avaliações foram realizadas nas dependências da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, Campus de Presidente Prudente, no setor de fisioterapia aplicada à pneumologia. Todos os participantes foram previamente comunicados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e, após concordância, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição – (CAAE: 51340615.6.0000.5402).

2.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um ensaio clínico não randomizado de amostragem por conveniência.

O protocolo foi realizado em dois dias. No primeiro dia os participantes realizaram a avaliação inicial (dados pessoais e antropométricos), histórico tabagístico (número de cigarros/dia, tempo de tabagismo, anos-maço e nível de dependência à nicotina de Fagerström) e a avaliação da função pulmonar pela espirometria. No segundo dia foi realizado a avaliação do monóxido de carbono no ar exalado (COex) utilizando ponto de corte <10 ppm para a realização do TTS. (BENOWITZ, 2002).

Durante os dois dias de avaliações foi solicitado que os voluntários não ingerissem bebidas alcoólicas e substâncias a base de cafeína e que permanecessem em abstinência tabagística por 12 horas antes das avaliações. As avaliações foram realizadas em uma sala com temperatura entre 22° C a 25° C e umidade relativa do ar de 50% a 60%. Foram executados sempre no período da manhã entre às 7h00 e 12h00.

2.3 Avaliação inicial

Os indivíduos responderam a uma entrevista inicial contendo: dados pessoais, dados antropométricos, histórico de saúde, medicações em uso e histórico tabagístico.

2.4 Teste de dependência nicotínica de Fagerström

O grau de dependência à nicotina foi avaliado por meio do Teste de Dependência Nicotínica de Fagerström. O instrumento consiste em um questionário com seis itens, facilmente entendido e rapidamente aplicado. Os escores obtidos no teste permitem a classificação da dependência à nicotina em cinco níveis: muito baixo (0 a 2 pontos); baixo (3 a 4 pontos); moderado (5 pontos); alto (6 a 7 pontos); e muito alto (8 a 10 pontos) (HEATHERTON, 1991).

2.5 Avaliação da função pulmonar (espirometria)

Foi realizada por meio de um espirômetro portátil MIR-Spirobank versão 3.6. A interpretação foi realizada de acordo com as normas da *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society* com valores de normalidade relativos à população brasileira. Esta avaliação foi realizada a fim de verificar a normalidade da função pulmonar. (MILER, 2005; NEDER, 1999).

2.6 Monóxido de carbono no ar exalado (COex)

Foi mensurado por um monoxímetro (Micro Medical Ltd., Rochester, Kent, Reino Unido). Os voluntários realizaram uma inspiração profunda seguida de pausa inspiratória de 15-20 segundos, com expiração constante e lenta. A concentração de COex foi expressa em ppm. (JATLOW, 2005)

Essa avaliação tem como objetivo de comprovar o período de abstinência do

cigarro, tendo como ponto de corte 10 ppm; e mensurar e associar a concentração de monóxido de carbono após cada momento. (BENOWITZ, 2002)

2.7 Transporte mucociliar nasal (Teste do Tempo de Trânsito da Sacarina)

Foi realizado por meio do TTS, que avalia a transportabilidade mucociliar nasal. Os participantes foram posicionados sentados com a cabeça estendida cerca de 10° e aproximadamente 250 microgramas de sacarina sódica granulada foi depositada sob controle visual a aproximadamente dois centímetros no interior da narina direita por meio de um canudo plástico. O tempo de colocação da sacarina até a primeira percepção de um sabor diferente na boca foi registrado em minutos por um cronômetro digital (Modelo 1046, Kenko, Ciudad del Este, Paraguai). O sabor não foi informado ao voluntário antes da realização do teste. O teste é encerrado após 60 minutos. Quando o gosto não foi apreciado em até 60 minutos, o teste foi interrompido e a sacarina foi depositada diretamente na língua para que o voluntário verificasse o gosto; e para que assim pudesse ser repetido na mesma narina no dia seguinte (DEBORAH, 2014).

3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi comprovada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Na comparação entre os grupos foi utilizado teste T de Student para amostras independentes ou teste de Mann-Whitney dependendo da normalidade dos dados. O teste qui-quadrado com correção de Fisher foi utilizado para analisar dados categóricos (sexo, nível de dependência à nicotina). O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p<0.05$

4 | RESULTADOS

Foram avaliados 27 tabagistas, sendo G1 com 10 fumantes leves e G2 com 17 fumantes moderados.

A Tabela 1 apresenta os dados antropométricos, histórico tabagístico, valores espirométricos, teste de dependência a nicotina eCOex. Observou-se maior proporção de indivíduos do sexo feminino em ambos os grupos, porém sem significância estatística. Quanto ao consumo de cigarros por dia o grupo G1 apresentou consumo médio de $9,1\pm1,5$ cigarros/dia, enquanto o G2 apresentou um consumo médio de $18,9\pm2,7$ cigarros/dia ($p<0,0001$), o que resultou em uma diferença também com relação aos anos-maço ($p=0,004$).

	G1 (n=10)	G2 (n=17)	p-valor*
Sexo (F), (%) ^b	90%	59%	0,087 ^b
Idade (anos)	45,4±9,7	44,4±10,3	0,808 ^a
Peso (Kg)	60,6±25,3	74,3±28,0	0,133 ^a
Altura (cm)	1,4±0,5	1,6±0,4	0,182 ^a
IMC (Kg/m ²)	23,2±9,2	26,5±8,8	0,379 ^a
Histórico Tabagístico, média±DP			
Tempo de Tabagismo (anos)	24,7±9,1	24,0±13,3	0,884 ^a
Cigarros/dia	9,1±1,5	18,9±2,7	<0,0001 ^{a*}
Anos-maço	11,2±4,3	23,3±14,3	0,004 ^{a*}
Valores Espirométricos, média±DP			
CVF (%pred)	100,1±24,2	100,8±18,9	0,937 ^a
VEF ₁ (%pred)	95,0±22,2	100,6±26,6	0,509 ^a
CVF/VEF ₁ (%pred)	78,2±6,0	80,9±4,3	0,192 ^a
PFE (%pred)	77,2±14,2	91,2±22,2	0,083 ^a
FEF _{25-75%} (%pred)	91,1±30,6	99,2±38,9	0,581 ^a
Fagerstrom, (%)			
Muito baixo	20	0	
Baixo	40	35	
Médio	20	24	0,301 ^b
Elevado	20	29	
Muito Elevado	0	12	
Monóxido de carbono no ar exalado, média±DP			
PPM	6,9±3,1	6,2±3,0	0,559 ^a
HbCO	1,1±0,5	1,0±0,5	0,650 ^a

Tabela 1. Caracterização da amostra

Legenda: %: porcentagem, DP: desvio padrão CVF: capacidade vital forçada; VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF/VEF₁: relação CVF/VEF₁; PFE: pico de fluxo expiratório; FEF_{25-75%}: fluxo expiratório forçado entre 25 e 75%; PPM: partes por milhão; HbCO: carboxihemoglobina. ^a: teste T de Student para amostras independentes; ^b: teste qui-quadrado;

*diferença significativa ($p<0,05$)

A Figura 1 apresenta os resultados do TTS em minutos. O grupo G2 apresentou tempo elevado de TTS comparado com o G1 (11,7±3,9 min vs. 7,5±3,6 min, respectivamente; $p=0,011$)

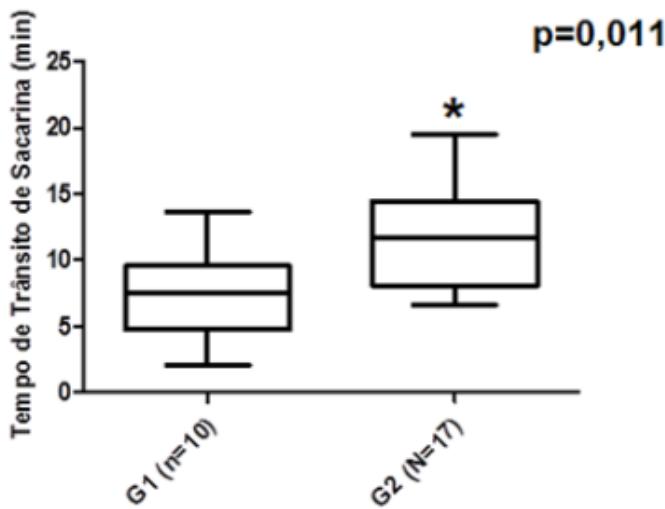


Figura 1. Teste do Tempo de Trânsito da Sacarina. $p = 0,011$ G1($7,5 \pm 3,6$ min) vs G2($11,7 \pm 3,9$ min).

5 | DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo indicaram que fumantes moderados apresentam lentidão no TMC nasal quando comparados com fumantes leves. Os estudos de PROENÇA (2011) e XAVIER (2013) corroboram com os nossos resultados, onde encontraram uma associação entre o TTS com o número de cigarros fumados por dia, sugerindo que indivíduos que fumam mais apresentam lentidão do TMC nasal e consequentemente maiores danos a esse mecanismo de proteção.

O TMC nasal em indivíduos cronicamente expostos a fumaça do cigarro está associado a remodelação epitelial que provoca anormalidades estruturais dos cílios, metaplasia das células caliciformes e hipertrofia das células mucosas, prejudicando assim a eficácia desse sistema de defesa (SEARS, 2015; RAMOS, 2011).

Estudos pioneiros avaliaram os batimentos ciliares em *vitro*, e observaram que compostos tais como cianeto de hidrogênio, acroleína, formaldeído, amônia e fenóis presentes na fumaça do tabaco, eram tóxicos para os cílios e causavam ciliostase (KENSLER, 1963; BALLENGER, 1960).

STALEY (1986) mostrou que tabagistas apresentavam o dobro do tempo de TTS nasal, sendo em média de 21 minutos de transportabilidade em fumantes e 11 minutos em indivíduos saudáveis não tabagistas, tempo superior ao encontrado no presente estudo. Porém sua amostra era predominante de indivíduos que fumavam mais de 20 cigarros/dia, os classificando em fumantes graves.

Com isso, de forma indireta é possível observar que os fumantes graves do estudo de STALEY (1986) apresentaram maior TTS que os indivíduos classificados em leves e moderados em nossa amostra. Reforçando o achado que indivíduos que consomem maior número de cigarros por dia, apresentam maior lentidão na TMC nasal.

Outro fator relevante em nossos resultados foi a característica da população

em estudo que apresentou predominância do sexo feminino. Sabe-se que mulheres tabagistas apresentam maior predisposição para doenças tabaco relacionadas quando comparadas aos homens (LANGHAMMER, 2003). Entretanto UZELOTO (2017), mostrou que o TMC nasal por meio do TTS foi semelhante entre homens e mulheres, mesmo após estratificação por idade, índice de massa corpórea, escolaridade, carga tabágica e função pulmonar. Dessa forma, a desproporção entre os sexos na amostra do presente estudo, não compromete a análise e resultados encontrados.

Com relação a dependência à nicotina houve uma desproporção para os níveis de dependência. A dependência classificada como muito baixo foi encontrada somente para o grupo de tabagistas leves, assim como a classificação de dependência muito levado foi encontrada somente no grupo de tabagistas moderados. Sendo possível verificar que o indivíduo que consome maior número de cigarros tende a apresentar maior dependência à nicotina. Entretanto não houve significância estatística para esse resultado. Outro fator importante é o tempo de tabagismo que não foi diferente entre os grupos indicando que a lentidão no TMC nasal se deu principalmente pelo número de cigarros consumidos por dia e não pelo tempo do consumo do mesmo.

Como limitação do estudo podemos indicar a falta de um grupo de fumantes graves (> 20 cigarros/dia), além de um grupo de não fumantes. Sugere-se novas pesquisas que verifiquem além da carga tabagística a influência do tempo e aspectos de estilo de vida como nível de atividade física e alimentação que podem influenciar o TMC nasal.

CONCLUSÃO

Indivíduos que consomem maior número de cigarros por dia possuem lentificação na transportabilidade mucociliar, tornando esse sistema de defesa deficitário o que leva a predisposição à afecções respiratórias.

REFERÊNCIAS

- ADMIRALL, J; BLANQUER, J; BELLO, S. Community-Acquired Pneumonia Among Smokers. *Arch Bronconeumol*. 2014; 50 (6):254.
- BALLENGER, J.J. Experimental effect of cigarette smoke on human respiratory cilia. *N Engl J Med* 1960; 263:832-5.
- BENOWITZ, N.L; JACOB, P.; AHIEVYCH, K. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*. 2002;4(2):149-59.
- BENNETT, W.D; ALEXIS, N.E; ALMOND, M, et al. Effect of inhaled endotoxin on mucociliary clearance and airway inflammation in mild smokers and nonsmokers. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2014; 27(6):459-65.

DEBORAH, S; PRATHIBHA, K.M. Measurement of Nasal Mucociliary Clearance. *Clin Res Pulmonol*. 2014; 2(2):1019.

GOHY, S.T; HUPIN, C.; PILETTE, C. Chronic inflammatory airway diseases: the central role of the epithelium revisited. *Clin Exp Allergy*. 2016; 46(4):529-42.

HALTY, L.S; HÜTTNER, M.D.; NETTO, I.C; et al. Análise da utilização do Questionário de Tolerância de Fagerström (QTF) como instrumento de medida da dependência nicotínica. *J Pneumol*. 2002; 28:(4).

HEATHERTON, T.F; KOZLOWSKI, L.T; FRECKER, R.C; et al. The Fagerström test for nicotine dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict Alcohol Other Drugs*. 1991; 86: 1119-27.

ITO, J. T; RAMOS, D.; LIMA, F.F.; et al. Nasal mucociliary clearance in subjects with COPD after smoking cessation. *Respir Care*. 2015; 60(3):399-405.

JATLOW, P.; TOLL, B.A; LEARY, V.; et al. Comparison of expired carbon monoxide and plasma cotinine as markers of cigarette abstinence. *Drug Alcohol Depend* 2008; 98: 203-09.

KENSLER, G.J. BATTISTA, S.P. Components of cigarette smoke with ciliary depressant activity. *N Engl J Med* 1963; 269 (1):161-6.

KONDO, T; OSUGUI, S.; SHIMOKATA, K.; et al. Smoking and smoking cessation in relation to all-cause mortality and cardiovascular events in 25,464 healthy male Japanese workers. *Circ J*. 2011; 75: 2885-92.

LANGHAMMER, A.; JOHNSEN, R.; GULSIVK, A; et al. Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking. *Eur Respir J*. 2003; 21:1017-23.

MILLER, M.R.; HANKINSON, V.; BRUSASCO, F.; et al. Standardization of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26(2): 319-38.

NEDER, J.A.; ANDREONI, S.; CASTELO-FILHO, A.; et al. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(6): 703-17.

PAGLIUCA, G.; ROSATO, C.; MARTELucci, S; et al. Cytologic and functional alterations of nasal mucosa in smokers: temporary or permanent damage? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152(4):740-5.

PROENÇA, M.; PITTA, F.; KOVELIS, D.; et al. Mucociliary clearance and its relation with the level of physical activity in daily life in healthy smokers and nonsmokers. *Rev Port Pneumol*. 2012; 18(5):233-8.

RAMOS, E.M.; DE TOLEDO, A. C.; XAVIER, R.F.; et al. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. *Respirology*. 2011;16(5):849-55.

SALAH, B.; DINH XUAN, A.T.; FOUILADIEU, J.L.; et al. Nasal Mucociliary transport in healthy subjects is slower when breathing dry air. *Eur Respir J*. 1988; 1 (9): 852-5.

STALEY, P. J.; WILSON, R.; GREENSTONE, M.A.; et al. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary. *Thorax* 1986; 41:519-23.

UZELOTO, J.; RAMOS, D.; FREIRE, A.P.; et al. Nasal mucociliary transportability of male and female smokers. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2017; 84(3): 311-17.

XAVIER, F.R.; RAMOS, D.; ITO, J.; RODRIGUES, F.M.; et al. Effects of cigarette moking intensity on

the mucociliary clearance of active smokers. *Respiration*. 2013; 86(6):479-85.

ZHOU, Z.; CHEN, P.; PENG, H. Are healthy smokers healthy? *Tobacco induced diseases*. 2016; 14: 35.

World Health Organization. Tobacco – Health Topics. Disponível em <https://www.who.int/topics/tobacco/en/>. Acesso em 22 mar. 2019.

World Health Organization. Tobacco – Key Facts. Mar.2018. Disponível em <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. Acesso em 22 mar. 2019.

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES CRÍTICOS

Lais Maria Bellaver de Almeida

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Isabella Gonçalves Pierri

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Karina Zanchetta Cardoso Eid

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Welder Zamoner

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Daniela Ponce

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP, Dpto de Nefrologia.
Botucatu - São Paulo

André Balbi

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP, Dpto de Nefrologia.
Botucatu - São Paulo

intensiva (UTI), com mortalidade próxima a 70% dos casos. A ocorrência de LRA por vancomicina ocorre em cerca de 8 a 45% dos casos. Ainda não há quantidade significativa de estudos relacionando a incidência da LRA e o uso de vancomicina em pacientes internados em UTI.

Objetivos: avaliar a incidência da LRA por vancomicina em pacientes adultos internados em UTI, identificar fatores de risco associados, comparar a sobrevida de pacientes em uso de vancomicina que desenvolveram com aqueles que não desenvolveram, identificar os fatores de risco associados ao óbito em pacientes com LRA por vancomicina e comparar a sobrevida de pacientes com LRA por vancomicina e aqueles que desenvolveram LRA de outras etiologias.

Métodos: durante 12 meses, pacientes em uso de vancomicina internados nas Unidades do Serviço de Terapia Intensiva (SETI) de adultos de um Hospital Universitário foram acompanhados prospectivamente desde o momento da admissão até desfecho –alta ou óbito. **Resultados:** a incidência de LRA encontrada na população admitida em UTI foi elevada, de 44,4% e que, com relação à classificação da LRA, KDIGO 3 foi a mais frequente (46,4%), seguida de KDIGO 2 (35,7%), e então 1 (17,8%). A mortalidade geral foi de 46%. Foram identificados como fatores de risco os níveis elevados de vancocinemia entre 48 e 96 horas.

RESUMO: A Lesão Renal Aguda (LRA) é uma síndrome onde ocorre declínio súbito da taxa de filtração glomerular, sendo frequente no ambiente hospitalar e atingindo até 40% dos pacientes internados em unidades de terapia

PALAVRAS-CHAVE: unidade terapia intensiva, sepse, lesão renal aguda, vancomicina, nefrotoxicidade.

ACUTE RENAL INJURY FOR VANCOMYCIN: PROSPECTIVE STUDY ON INCIDENCE, RISK FACTORS AND MORTALITY IN CRITICAL PATIENTS

ABSTRACT: Acute Kidney Injury (AKI) is a common and complex syndrome defined as sudden decline of glomerular filtration rate. It reaches up to 40% of patients in intensive care units (ICU) and is associated with high mortality (about 70% of the cases). The occurrence of AKI due to vancomycin use occurs in about 8-45% of cases. There is still no significant amount of studies relating the incidence of AKI and the use of vancomycin in ICU patients. **Objectives:** The main objectives of this study are to evaluate the incidence of AKI associated with vancomycin use in adult patients admitted to ICU, to identify risk factors for this clinical condition, compare the survival of patients that use vancomycin that developed AKI with those who did not develop, identify risk factors for death of patients with AKI associated with vancomycin and compare the survival of patients with AKI associated with vancomycin and those who developed AKI of other etiologies. **Methods:** During 12 months, patients in the use of vancomycin hospitalized in the Intensive Care Unit (SETI) of adults of a University Hospital were prospectively matched from the time of admission until discharge-discharge or death. **Results:** The incidence of AKI in the ICU admission population was high (44.4%), and KDIGO 3 was the most frequent (46.4%), followed by KDIGO 2 (35, 7%), and then 1 (17.8%). Overall mortality was 46%. Elevated levels of vancocinemia between 48 and 96 hours were identified as risk factors.

KEYWORDS: intensive care units, sepsis, Acute Kidney Injury, vancomycin, nephrotoxic.

1 | INTRODUÇÃO

A Lesão Renal Aguda (LRA) é uma síndrome definida pela diminuição súbita da taxa de filtração glomerular, sendo uma patologia com incidência e prevalência altas no ambiente hospitalar e que atinge até 40% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), com mortalidade próxima a 70% dos casos.

São conhecidos inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento da LRA em pacientes no ambiente hospitalar, sendo os principais comorbidades como doença renal crônica (DRC), diabetes mellitus (DM) e hipertensão arterial (HA), presença de sepse ou uso de drogas nefrotóxicas, tais como os contrastes iodados e alguns antibióticos.

Nas UTIs diversos pacientes apresentam sepse grave ou choque séptico, portanto, podem estar infectados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ou Oxacilina (ORSA). Nesses casos utiliza-se a vancomicina, porém por ser um medicamento nefrotóxico pode provocar LRA em cerca de 8 a 45 % dos casos. Os principais fatores de risco associados à administração vancomicina são uso por

período de sete dias ou mais, dosagem sérica elevada, com valores variando entre 15mg/L e 30mg/L, uso simultâneo de outros medicamentos nefrotóxicos, internação em UTI, doença renal crônica prévia, acidose metabólica e depleção de sódio.

2 | OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram avaliar a incidência da LRA por vancomicina em pacientes adultos internados em UTI, identificar os fatores de risco associados a esta condição clínica, comparar a sobrevida de pacientes em uso de vancomicina que desenvolveram com aqueles que não desenvolveram, identificar os fatores de risco associados ao óbito em pacientes com LRA por vancomicina e comparar a sobrevida de pacientes com LRA por vancomicina e aqueles que desenvolveram LRA de outras etiologias.

3 | MÉTODO

O estudo realizado foi prospectivo observacional do tipo coorte de pacientes em uso de vancomicina internados nas Unidades do Serviço de Terapia Intensiva (SETI) de adultos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, durante 12 meses ininterruptos, foi iniciado em 01 de setembro de 2016 e finalizando em 30 de junho de 2017. Os dados foram obtidos por um único observador, através de consulta ao paciente e ao seu prontuário médico, desde sua admissão nos leitos da SETI até o término do uso da vancomicina ou seu desfecho e transferidos para um protocolo específico.

Foram acompanhadas as seguintes unidades da SETI: UTI Central e UTI do Pronto Socorro. Foram excluídos pacientes: menores de 18 anos, gestantes com qualquer idade gestacional, portadores de DRC estádio 5 (classificado de acordo com a depuração de creatinina sérica estimada ou medida $< 15 \text{ ml/min}$) ou submetidos a transplante renal em qualquer período, admitidos na SETI com quadro de LRA instalada de qualquer etiologia ou em uso de vancomicina iniciada anteriormente, em uso de vancomicina que desenvolvem LRA de outra etiologia (pré-renal, pós renal ou renal), com LRA nas primeiras 48 horas da admissão hospitalar ou do uso da vancomicina, uma vez que tais indivíduos já apresentariam função renal alterada por outras causas.

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão, de acordo com as características de normalidade de cada variável. Foi estabelecida como variável dependente a ocorrência de LRA e utilizados diferentes testes estatísticos, de acordo com as particularidades estudadas: para a análise de variáveis categóricas foi utilizado o Teste do QuiQuadrado, e para a comparação de variáveis contínuas, o Teste t. Em todos os testes realizados, foi considerado o nível de significância de 5%. Foram realizadas análises multivariadas, pela construção de modelo de regressão logística,

com cálculos dos Odds Ratio (OR), sendo incluídas no modelo todas as variáveis independentes que mostraram associação com o desfecho, com $p \leq 0,20$.

4 | RESULTADOS

Foram avaliados 189 pacientes durante o período de 01 de setembro de 2016 a 01 de julho de 2017 nas Unidades do Serviço de Terapia Intensiva (SETI) de adultos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Destes, foram incluídos no estudo 63 pacientes, pois muitos pacientes foram excluídos por apresentarem LRA prévia à admissão na SETI, uso de vancomicina por período inferior a 48h ou DRC estádio 5 ($\text{Cl Cr} < 15 \text{ ml/min}$), conforme mostra a figura 1.

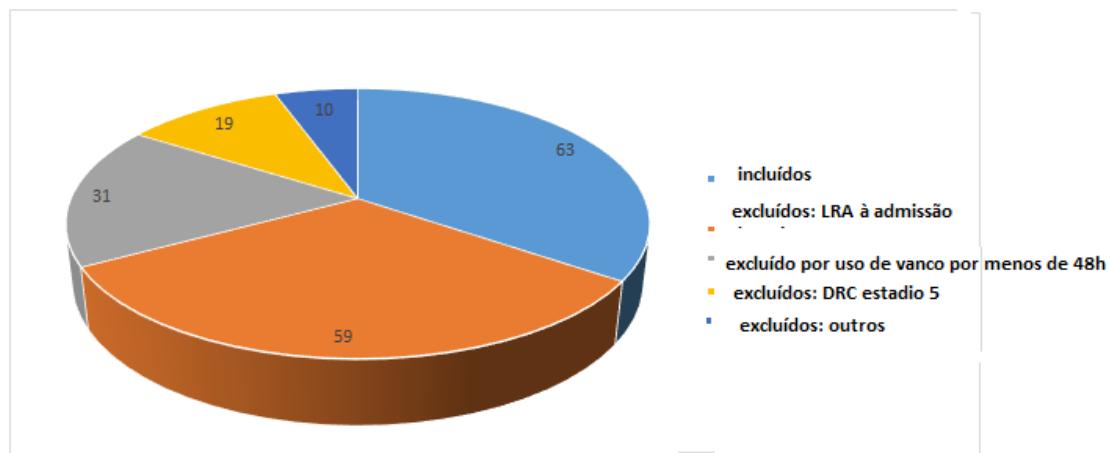


Figura 1: Distribuição dos pacientes incluídos no estudo

Para análise dos dados, foram estabelecidas as características clínicas e laboratoriais do N total de 63 pacientes. Pode-se observar que 92 % da população geral incluída no estudo tiveram realizada a dosagem de vancocinemia sérica, 58,7% dos pacientes apresentaram nível sérico tóxico, sendo a média do valor de vancocinemia colhida $25,5 \pm 11,90\text{mg/L}$. Dos 63 pacientes, 44,4% apresentaram LRA e 46% foram a óbito.

Em seguida, o N total de 63 pacientes foi dividido em 2 grupos: G1 e G2, e analisado de duas formas distintas, sendo observadas as características clínicas e laboratoriais dos pacientes. Assim, os pacientes foram comparados quanto à presença ou não de LRA (G1: LRA x G2: sem LRA) e também quanto ao desfecho hospitalar (G1: não óbito x G2: óbito).

4.1 Análise quanto à presença ou não de Ira

Da população total de 63 pacientes acompanhados pelo estudo, 44,4% evoluíram com LRA. Quanto à classificação da LRA, KDIGO 3 foi mais frequente (46,4%), seguida

da KDIGO 2 (35,7%) e por fim, KDIGO 1 (17,9%).

Ao analisar a população quanto à presença ou não de LRA, os pacientes que desenvolveram LRA apresentaram, comparativamente àqueles sem LRA, maiores valores de creatinina basal ($0,7 (0,55-0,85) \times 0,6(0,425-0,6)$ p=0,007), maior uso de diurético ($15(53,571) \times 9(25,714)$ p=0,04), de droga vaso ativa ($20 (71,429) \times 15 (42,857)$ p=0,04), maior porcentagem de nível sérico tóxico ($22 (78,571) \times 15 (42,857)$ p=0,009), de nível subterapêutico ($30(85,714) \times 12(42,857)$ p<0,001) e maior vancocinemia entre 48 horas e 96 horas ($22,11(9,133-29,6) \times 9,1(6,038-13,483)$ p=0,002). Além disso, apresentaram menor CKD-EPI ($98,443 \pm 29,32 \times 117,351 \pm 26,144$ p=0,009).

Os grupos com e sem LRA foram semelhantes quanto à idade ($58,107 \pm 17,197 \times 51,914 \pm 19,730$ p= 0,19), peso ($71,42 \pm 17,052 \times 73,52 \pm 19,991$ p=0,66), diurese ($1,088 \pm 0,539 \times 1,180 \pm 0,532$ p=0,50), PCR ($16,26(11,766-25,829) \times 12,944(6,4-23,667)$ p=0,13), pressão arterial media ($78,747 \pm 8,737 \times 80,826 \pm 9,365$ p=0,37), dias de internação ($33,5 \pm 20,5 \times 30 \pm 20,25$ p=0,71), hipertensão arterial ($46,4 \times 51,4\%$, p=0,88), diabetes mellitus ($28,57 \times 28,5$ p=0,77), doença renal crônica ($7,14 \times 2,85$, p= 0,58), doenças cardiovasculares $14,28 \times 8,51$, p= 0,69, ventilação mecânica ($89,28 \times 74,28$, p= 0,24), contraste ($10,71 \times 11,42$, p= 1), uso de outras drogas nefrotóxicas ($10,71 \times 5,71$, p= 0,65). Além disso, foram semelhantes também quanto ao diagnóstico de internação: infecção ($42,85 \times 28,57\%$, p= 0,36), cardiovascular ($10,71 \times 2,85$, p= 0,31), PO ($25 \times 42,8$, p=0,22); tempo de uso da vancomicina ($10(7,5-15) \times 9(6-13,75)$ p= 0,25), dose de ataque ($24,42 \pm 5,15 \times 25,13 \pm 4,93$ p= 0,58), primeira dose de vancomicina ($15,27(13,36-18,33) \times 15,76(14,66-19,20)$ p= 0,21) , número de ajustes ($1(0,5-3) \times 2(0-3)$ p= 0,88), conforme mostram as tabelas 1 e 2.

VARIÁVEIS	GERAL (N=63)	COM LRA (N=28)	SEM LRA (N=35)	p
Idade (anos)*	$54,67 \pm 18,758$	$58,107 \pm 17,197$	$51,914 \pm 19,730$	0,19
Sexo Masculino*	42(66,7)	19 (67,8)	23 (65,7)	0,89
Peso*	$72,59 \pm 18,625$	$71,42 \pm 17,052$	$73,52 \pm 19,991$	0,66
Creatinina Basal (mg/dL)	$14,519 \pm 14$	$0,7 (0,55-0,85)$	$0,6(0,425-0,6)$	0,007
CKD-EPI*	$108,948 \pm 28,964$	$98,443 \pm 29,32$	$117,351 \pm 26,144$	0,009
Diurese ml/kg/h*	$1,139 \pm 0,533$	$1,088 \pm 0,539$	$1,180 \pm 0,532$	0,50
PCR*	$16,455 \pm 9,8574$	$16,26(11,766-25,829)$	$12,944(6,4-23,667)$	0,13
Pressão arterial média*	$105,925 \pm 11,933$	$78,747 \pm 8,737$	$80,826 \pm 9,365$	0,37
Dias de Internação*	$36,11 \pm 21,149$	$33,5 \pm 20,5$	$30 \pm 20,25$	0,71
Hipertensão arterial (%)	32 (50,8)	14 (40)	18 (51,429)	0,88

Diabetes Mellitus (%)	18 (28,6)	8(28,571)	10(28,571)	0,77
Doença renal crônica (%)	3 (4,8)	2(7,143)	1(2,857)	0,58
Doença cardiovascular (%)	7 (11,1)	4(14,286)	3(8,571)	0,69
Ventilação Mecânica (%)	51(81)	25 (89,286)	26(74,286)	0,24
Droga Vaso Ativa (%)	35(55,6)	20 (71,429)	15 (42,857)	0,04
Contraste(%)	7(11,1)	3 (10,714)	4 (11,429)	1
Diurético (%)	24(38,1)	15(53,571)	9(25,714)	0,04
Outras drogas nefrotóxicas (%)	5(7,9)	3 (10,714)	2(5,714)	0,65
Diagnóstico de internação:				
Infecção (%)	22(34,9)	12 (42,857)	10 (28,571)	0,36
Cardiovascular (%)	4(6,34)	3(10,714)	1(2,857)	0,31
PO (%)	22(34,9)	7 (25)	15(42,857)	0,22
Outros (%)	15(23,8)	6(21,429)	9 (25,714)	0,92
Óbito (%)	29 (46)	15(51,7)	14(58,33)	0,34

TABELA 01- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes internados em UTI quanto à presença ou não de LRA

SETI: Unidades do Serviço de Terapia Intensiva, KDIGO: ClinicalPracticeGuideline for AcuteKidneyInjury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão

VARIÁVEIS	GERAL	COM LRA (N=28)	SEM LRA (N=35)	p
Tempo de uso da vancomicina (dias)*	11,43 ±7,332	10(7,5-15)	9(6-13,75)	0,25
Dose de ataque mg/kg*	24,82 ±5,007	24,42±5,15	25,13±4,93	0,58
Dose de vancomicina (1 ^a) mg/kg*	15,38 ±3,547	15,272(13,36-18,33)	15,766(14,66-19,20)	0,21
Número de ajustes	1,84 ±1,850	1(0,5-3)	2(0-3)	0,88
Nível sérico tóxico (%)	34(54)	22 (78,57)	15 (42,85)	0,009
Nível subterapêutico (%)	39(61,9)	30(85,71)	12(42,85)	<0,001
Vancocinemia T0-T2 (mg/l)*	16,08±8,34	17,45±11,710	14,71±5,58	0,73
Vancocinemia T2-T4 (mg/l)**	19,11(7,13-26,6)	22,11(9,13-29,6)	9,1(6,03-13,48)	0,002
Vancocinemia T4-T6 (mg/l)*	17,14 ±8,962	20,479±11,045	14,027±5,083	0,05
Vancocinemia T6-T8(mg/l)**	18,44±10,22	18,42(11,99-29,66)	15,2(9,57-17,16)	0,24
Vancocinemia T8-T10 (mg/l)*	17,88 ±6,301	17,24(12,67-19)	17,45(12,96-25,54)	0,77

TABELA 02: Características clínicas e laboratoriais relacionadas à vancomicina dos pacientes internados em UTI quanto à presença ou não de LRA

SETI: Unidades do Serviço de Terapia Intensiva, KDIGO: ClinicalPracticeGuideline for AcuteKidneyInjury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão ** mediana e quartis

À análise de regressão logística, pode-se observar que o parâmetro vancocinemia T2-T4 (OR= 1,139, p = 0,01) foi identificado como fator de risco para LRA, conforme indica tabela 03. Já as demais variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos.

VARIÁVEIS	OR	Intervalo de confiança	P
Creatinina Basal (mg/dL)	2,693	0,144-50,215	0,41
Droga vaso ativa	5,019	0,515-48,887	0,15
Vancocinemia T2-T4 (mg/kg)	1,139	1,027-1,264	0,01
Diurético	1,136	0,981-1,316	0,88

TABELA 03: Regressão Logística das variáveis associada à presença de LRA

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II, LRA: Lesão Renal Aguda

4.2 Análise quanto ao desfecho

Dos 63 pacientes incluídos no projeto, 46,03% evoluíram para óbito e 53,96% tiveram desfecho não óbito.

Comparativamente aos pacientes com desfecho não óbito, os pacientes que evoluíram para óbito apresentaram idade mais elevada ($64,55 \pm 17,047$, $x\ 46,24 \pm 15,981$, $p=0,02$), maior valor de creatinina basal ($0,793 \pm 0,5120$ x $0,579 \pm 0,1839$, $p=0,02$), maior PCR ($20,669 \pm 10,856$ x $12,879 \pm 7,35$, $p= 0,002$) , maior uso de diurético ($16(55,2)$ x $8(23,5)$, $p=0,02$) e maior frequência de foco infeccioso em urina associada à corrente sanguínea ($13,79$ x 0% $p=0,04$), conforme mostra as tabelas 4 e 5.

O grupo de pacientes que não foi a óbito apresentou maior CKD-EPI ($119,921 \pm 21,3069$ x $96,083 \pm 31,7004$ $p=0,001$), maior tempo de internação ($41,09 \pm 17,601$ x $30,28 \pm 23,664$ $p= 0,04$), maior tempo de uso de vancomicina ($13,15 \pm 8,053$ x $9,41 \pm 5,901$) e maior número de ajustes ($2,50$ x $1,07$, $p= 0,002$).

Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos quanto à idade, sexo, peso, diurese, pressão arterial média, Hipertensão arterial, diabetes Mellitus, doença renal crônica, doença cardiovascular, ventilação mecânica, uso de droga vaso ativa, contraste, uso de outras drogas nefrotóxicas diagnóstico de internação, lesão renal aguda, dose de ataque, dose da primeira dose de vancomicina, número de ajustes, nível sérico tóxico, nível subterapêutico e níveis vancocinemia, conforme mostram as tabelas 4 e 5.

VARIÁVEIS	GERAL (N=63)	ÓBITO (N=29)	NÃO ÓBITO (N=34)	P
Idade (anos)*	54,67±18,758	64,55 ± 17,047	46,24 ± 15,981	0,02
Sexo Masculino (%)	42(66,7)	19(65,5)	23(67,6)	1
Peso*	72,59 ±18,625	69,12 ± 15,545	75,55 ± 20,666	0,17
Creatinina Basal (mg/dL)*	14,519 ±14	0,793 ± 0,5120	0,579 ± 0,1839	0,02
CKD-EPI*	108,948 ± 28,964	96,083 ±31,7004	119,921± 21,3069	0,001
Diurese ml/kg/h*	1,139 ±0,533	1,040 ± 0,5584	1,224 ± 0,5029	0,17
PCR*	16,455 ±9,8574	20,669 ±10,856	12,879 ± 7,35	0,002
Pressão arterial média*	105,925 ±11,933	103,648 ±12,2943	107,867± 11,4392	0,16
Dias de Internação*	36,11 ±21,149	30,28 ±23,664	41,09 ± 17,601	0,04
Hipertensão arterial (%)	32 (50,8)	17(58,6)	15 (44,1)	0,37
Diabetes Mellitus (%)	18 (28,6)	9(31)	9(26,5)	0,90
Doença renal crônica (%)	3 (4,8)	3(10,3)	0(0)	0,18
Doença cardiovascular (%)	7 (11,1)	4(13,8)	3(8,8)	0,82
Ventilação Mecânica (%)	51(81)	24(82,8)	27(79,4)	0,98
Droga Vaso Ativa (%)	35(55,6)	17(58,6)	18(52,9)	0,84
Contraste (%)	7(11,1)	4(13,8)	3(8,8)	0,82
Diurético (%)	24(38,1)	16(55,2)	8(23,5)	0,02
Outras drogas nefrotóxicas (%)	5(7,9)	1(3,4)	4(11,8)	0,45

Diagnóstico de internação:

VARIÁVEIS	GERAL (N=63)	ÓBITO (N=29)	NÃO ÓBITO (N=34)	P
Outros (%)	15(23,8)	5(17,241)	10(29,412)	0,40
Foco da Infeção				0,71
Cutâneo (%)	11 (17,5)	4(13,793)	7(20,588)	
Urinário+cc (%)	4 (13,793)	4(13,793)	0(0)	0,04
Pulmonar (%)	32 (50,8)	12(41,379)	21(61,765)	0,17
LRA (%)	28 (44,44)	15(51,7)	13(38,12)	0,34

KDIGO (%)					
	1	2	3	2(15)	0,99
	5(17,8)	10 (35,7)	13 (46,4)	3(20)	2(15)
				6(40)	4(30)
				6(40)	7(53)
					0,72

TABELA 04: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes internados em UTI quanto ao seu desfecho

SETI: Unidades do Serviço de Terapia Intensiva, KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda *Média e Desvio Padrão

VARIÁVEIS	GERAL	ÓBITO (N=)	NÃO ÓBITO (N=)	p
Tempo de uso da vancomicina (dias)*	11,43 ±7,332	9,41 ± 5,901	13,15 ± 8,053	0,04
Dose de ataque mg/kg*	24,82 ±5,007	24,90 ± 4,460	24,75 ± 5,496	0,33
Dose de vancomicina (1ª) mg/kg*	15,38 ±3,547	14,81 ± 2,597	18,12 ± 4,173	0,90
Número de ajustes*	1,84 ±1,850	1,07 (1,193)	2,50(2,078)	0,002
Nível sérico tóxico (%)	34(54)	16(55,2)	18(52,9)	1
Nível subterapêutico(%)	39(61,9)	14 (48,3)	25(73,5)	0,07
Vancocinemia T0-T2 (mg/l)*	16,08±8,34	17,91 ± 11,025	14,25 ± 6,508	0,65
Vancocinemia T2-T4 (mg/l)*	41,68±24,54	12,41±12,47	66,65 ± 34,28	0,39
Vancocinemia T4-T6 (mg/l)*	17,14 ±8,962	20 ± 9,075	14,08 ± 8,051	0,07
Vancocinemia T6-T8(mg/l)*	18,44±10,228	23,13 ± 9,184	16,22 ± 10,160	0,09
Vancocinemia T8-T10 (mg/l)*	17,88 ±6,301	21,41 ± 5,801	16,9 ± 6,227	0,16

TABELA 05: Características clínicas e laboratoriais relacionadas à vancomicina dos pacientes idosos quanto ao seu desfecho

SETI: Unidades do Serviço de Terapia Intensiva, KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda *Média e Desvio Padrão

Ao se analisar os dois grupos por meio da regressão logística, pôde-se observar que as variáveis: idade (OR= 1,065, p= 0,029), número de ajustes (OR=-0,475, p= 0,05) e nível subterapêutico (OR= -0,744, p= 0,05) foram identificadas como fatores de risco para óbito, como mostra a tabela 06.

Os demais parâmetros como creatinina basal, dose de manutenção, tempo de uso de vancomicina, PCR e uso de diurético não diferiram estatisticamente entre os dois grupos estudados.

VARIÁVEIS	OR	Intervalo de confiança	P
Idade (anos)	1,065	1,006-1,128	0,029
Creatinina Basal (mg/dL)	0,262	0,0219-3,132	0,29
Dose de manutenção	0,784	0,605-1,015	0,06
Tempo de uso de Vancomicina (dias)	0,948	0,830-1,082	0,42
Número de ajustes	-0,475	0,225-1,003	0,05
PCR	0,997	0,186-5,326	0,99
Nível subterapêutico	-0,744	1,008-3,807	0,05
Diurético	3,661	0,738-18,173	0,11

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II, LRA: Lesão Renal Aguda, HGT: * - Média ± Desvio Padrão

TABELA 06: Regressão Logística das variáveis associada ao óbito

5 | DISCUSSÃO / CONCLUSÕES

Com base nas análises e resultados apresentados, pode-se observar que a grande maioria dos pacientes (92%) teve pelo menos uma dosagem de vancocinemia realizada durante o uso da vancomicina. Destes, 73% receberam ajustes de dose e 58,7% apresentaram nível sérico de vancomicina tóxico. A média dos maiores valores de vancocinemia foi de $25,5 \pm 11,90$ mg/L.

A partir das análises e resultados apresentados, pode-se concluir que a incidência de LRA encontrada na população admitida em UTI foi elevada, de 44,4% e que, com relação à classificação da LRA, KDIGO 3 foi a mais frequente (46,4%), seguida de KDIGO 2 (35,7%), e então 1 (17,8%). A mortalidade geral foi de 46%.

À análise de regressão logística, foram identificados como fatores de risco para LRA na população crítica em uso de vancomicina, os níveis elevados de vancocinemia entre 48 e 96 horas. Embora não tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes à análise multivariada, maiores níveis de creatinina basal, maior uso de droga vaso ativa e de diurético relacionaram-se à LRA.

É importante ressaltar que o diagnóstico da LRA ocorreu em média no sexto dia de antibioticoterapia com vancomicina, enquanto a vancocinemia em níveis tóxicos precedeu esses diagnóstico em torno de 2 dias, no período entre 48-96 horas. Essa associação necessita ser mais estudada, e, em breve, esse grupo pretende estudar o papel da vancocinemia como preditor diagnóstico e prognóstico da LRA em pacientes críticos, construindo a curva ROC, assim como determinando os valores de *cutt-off*.

A mortalidade encontrada foi também elevada, de 46%, sendo que a regressão logística identificou como variáveis associadas ao óbito a idade, o menor número de ajustes e a menor frequência de nível subterapêutico. Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significantes à análise multivariada, relacionam-se à maior

mortalidade: maior nível de creatinina basal e PCR, maior dose de manutenção de vancomicina, maior tempo de uso de vancomicina e o uso de diurético.

É importante salientar que embora a LRA não tenha sido associada à maior mortalidade, a população que teve LRA apresentou 13% maior de mortalidade daquela que não teve LRA (51,7 vs 38,1%).

Deste modo, os dados são interessantes por retratarem a incidência de LRA e óbito em população de pacientes críticos internados em UTI em uso de vancomicina, além de identificarem os fatores associados a essas variáveis, dados esses escassos na literatura, principalmente nacional.

Ressalta-se a importância da monitorização dos níveis séricos de vancocinemia durante a antibioticoterapia, visto que seus níveis tóxicos foram identificados como fator de risco independente para LRA. Desta forma, a identificação precoce de níveis séricos tóxicos de vancocinemia pode possibilitar intervenções terapêuticas adequadas, como ajuste da dose ou do intervalo da administração, com a finalidade de prevenir a LRA ou modificar a história natural desta síndrome, com possível redução da mortalidade.

Por fim, mais estudos são necessários para explorar a LRA associada à nefrotoxicidade por vancomicina, assim como seus preditores diagnósticos e prognósticos.

REFERÊNCIAS

- G. A. Brito, A. L. Balbi, J. M. G. Abrão, and D. Ponce, “**Long-Term Outcome of Patients Followed by Nephrologists after an Acute Tubular Necrosis Episode**”, International Journal of Nephrology, vol. 2012, Article ID 361528, 7 pages, 2012.
- GUPTA A, Biyani M, Khaira A. **Vancomycin nephrotoxicity; myths and facts.** The Netherlands J Med 2011;69(9):379-83.
- PAZHAYATTIL GS, Shirali AC. **Drug-induced impairment of renal function.** Pazhayattil, International Journal of Nephrology and Renovascular Disease. 2014;7:457-468.
- SRISAWAT N, Kellum JA. **Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome.** Curr Opin Crit Care. 2011 Dec;17(6):548-55.
- YU L, Santos BFC, Burdmann EA, Suassuna JHR, Batista PBP. **Insuficiência Renal Aguda. Diretriz da AMB - Sociedade Brasileira de Nefrologia.** 2007.

LESÃO RENAL AGUDA POR VANCOMICINA: ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE A INCIDÊNCIA, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE EM PACIENTES NÃO CRÍTICOS

Isabella Gonçalves Pierri

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Lais Maria Bellaver de Almeida

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Karina Zanchetta Cardoso Eid

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

Welder Zamoner

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP.
Botucatu - São Paulo

André Balbi

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP, Dpto de Nefrologia.
Botucatu - São Paulo

Daniela Ponce

Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB -
UNESP, Dpto de Nefrologia.
Botucatu - São Paulo

de LRA, destacando-se a vancomicina entre as drogas mais utilizadas, cuja incidência de LRA associada ao seu uso varia de 5 a 35% na literatura. Ainda são escassos os estudos que exploram a LRA associada à nefrotoxicidade por vancomicina. Este trabalho tem por objetivo avaliar a incidência de LRA associada ao uso da vancomicina em pacientes hospitalizados em enfermarias clínicas e cirúrgicas, identificar os fatores de risco para o seu desenvolvimento e associados a óbito. Foi desenvolvido um estudo do tipo coorte de pacientes em uso de vancomicina admitidos em quatro enfermarias de um hospital universitário durante período de 10 meses, avaliados diariamente desde sua admissão até o desfecho – alta ou óbito. Foram avaliados 225 pacientes, excluídos 90 e incluídos 135. A prevalência de LRA foi de 27,4% e sua mortalidade foi de 20,7%. A prevalência de nível sérico tóxico de vancomicina ($>20\text{mg/l}$) nesses pacientes foi elevada ($>50\%$) e identificada como um dos fatores de risco para LRA, o que ressalta a importância da monitorização e ajuste dos níveis séricos de vancocinemia, já que a LRA associada à vancomicina foi identificada como fator de risco para o óbito.

PALAVRAS-CHAVE: Lesão renal aguda; Nefrotoxicidade; Vancomicina; Fatores de risco; Mortalidade.

RESUMO: A lesão renal aguda (LRA) é uma das mais importantes complicações observadas em pacientes hospitalizados, além de fator de risco independente de morte. A toxicidade é a segunda etiologia mais frequente

ACUTE RENAL INJURY FOR VANCOMYCIN: PROSPECTIVE STUDY ON INCIDENCE, RISK FACTORS AND MORTALITY IN NON-CRITICAL PATIENTS

ABSTRACT: Acute renal injury (AKI) is one of the most important complications observed in hospitalized patients, as well as an independent risk factor for death. Toxicity is the second most frequent AKI etiology, with vancomycin being the most commonly used drug, with a prevalence of AKI in the literature ranging from 5 to 35%. There are still few studies that explore AKI associated with vancomycin nephrotoxicity. This study aims to evaluate the incidence of AKI associated with the use of vancomycin in hospitalized patients in clinical and surgical wards, to identify the risk factors for its development and association with death. A cohort study of patients in antibiotic therapy with vancomycin admitted in four university hospital wards and evaluated for a period of 10 months, from admission to discharge or death, was performed. A total of 225 patients were evaluated, 90 were excluded and 135 were included. The prevalence of AKI was 27.4% and the mortality rate was 20.7%. The prevalence of toxic serum levels of vancomycin ($> 20\text{mg/L}$) in these patients was high ($> 50\%$) and identified as one of the risk factors for AKI, which emphasizes the importance of monitoring and adjusting serum levels of vancocinemia. since vancomycin-associated AKI was identified as a risk factor for death.

KEYWORDS: Acute kidney injury; Nephrotoxicity; Vancomycin; Risk factors; Mortality

1 | INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma das mais importantes complicações observadas em pacientes hospitalizados, além de fator de risco independente de morte. Sua principal etiologia renal é a necrose tubular aguda decorrente de isquemia, seguida da nefrotoxicidade. A incidência de LRA associada ao uso da vancomicina varia de 5 a 35% e diferentes fatores podem potencializar a ocorrência da nefrotoxicidade, os quais podem estar relacionados ao paciente (idade avançada, função renal diminuída); à administração concomitante de outros fármacos nefrotóxicos e meios de contraste intravenosos; e ao tratamento como duração prolongada, dosagem elevada, fracionamento da dose. Também há fatores de risco que, frequentemente, atuam como fatores de confusão, entre eles a presença de sepse, as grandes queimaduras e a pancreatite aguda. A utilização da vancomicina deve ser acompanhada da correção de sua dose para pacientes com comprometimento renal e da monitorização de seu nível sérico em pacientes com alto risco de disfunção renal. Apesar de concentrações elevadas causarem preocupação, recomenda-se manter o nível da vancomicina no período de vale sempre acima de 10mg/L , para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana e minimizar o risco do insucesso do tratamento.

2 | OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram avaliar a incidência da LRA por vancomicina em pacientes adultos internados enfermarias clínicas e cirúrgicas, identificar os fatores de risco associados a esta condição clínica, comparar a sobrevida de pacientes em uso de vancomicina que desenvolveram LRA com aqueles que não desenvolveram e identificar os fatores de risco associados ao óbito em pacientes com LRA por vancomicina.

3 | MÉTODO

O estudo realizado foi prospectivo observacional do tipo coorte de pacientes em uso de vancomicina internados em quatro enfermarias clínicas e cirúrgicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, durante 10 meses ininterruptos, foi iniciado em 1 de setembro de 2016 e finalizado em 1 de julho de 2017. Para cada paciente foi preenchido um protocolo com informações clínicas e laboratoriais, dados obtidos pelo mesmo observador desde a admissão do paciente nas enfermarias até o término do uso da vancomicina ou seu desfecho (alta ou óbito). A avaliação de função renal foi realizada por meio da dosagem da creatinina sérica e verificação de débito urinário diárias e o diagnóstico de LRA pelos critérios do KDIGO 2012.

Foram acompanhadas as seguintes enfermarias: clínica médica, cirurgia vascular, neurocirurgia e ortopedia. Foram excluídos pacientes: menores de 18 anos, gestantes com qualquer idade gestacional, aqueles que não receberem vancomicina durante a internação, portadores de DRC estádio 5 ($\text{ClCr} < 15 \text{ ml/min}$), transplantados renais, pacientes com choque de qualquer etiologia, em uso de droga vasoativa e de outros medicamentos nefrotóxicos, bem como aqueles com LRA nas primeiras 48h da admissão hospitalar ou do início do uso da vancomicina.

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão, de acordo com as características de normalidade de cada variável. Foi estabelecida como variável dependente a ocorrência de LRA e utilizados diferentes testes estatísticos, de acordo com as particularidades estudadas: para a análise de variáveis categóricas foi utilizado o Teste do QuiQuadrado, e para a comparação de variáveis contínuas, o Teste t. Em todos os testes realizados, foi considerado o nível de significância de 5%. Foram realizadas análises multivariadas, pela construção de modelo de regressão logística, com cálculos dos Odds Ratio (OR), sendo incluídas no modelo todas as variáveis independentes que mostraram associação com o desfecho, com $p \leq 0,20$.

4 | RESULTADOS

Foram avaliados 225 pacientes durante o período de 01 de setembro de 2016

a 01 de julho de 2017 em quatro enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Destes, foram incluídos no estudo 135 pacientes, pois muitos foram excluídos do projeto por apresentarem DRC estádio 5 ($\text{Cl Cr} < 15 \text{ ml/min}$), LRA nas primeiras 48h da admissão hospitalar ou do uso da vancomicina, choque de qualquer etiologia, uso de outros medicamentos nefrotóxicos e transplante renal, conforme mostra a figura 1.

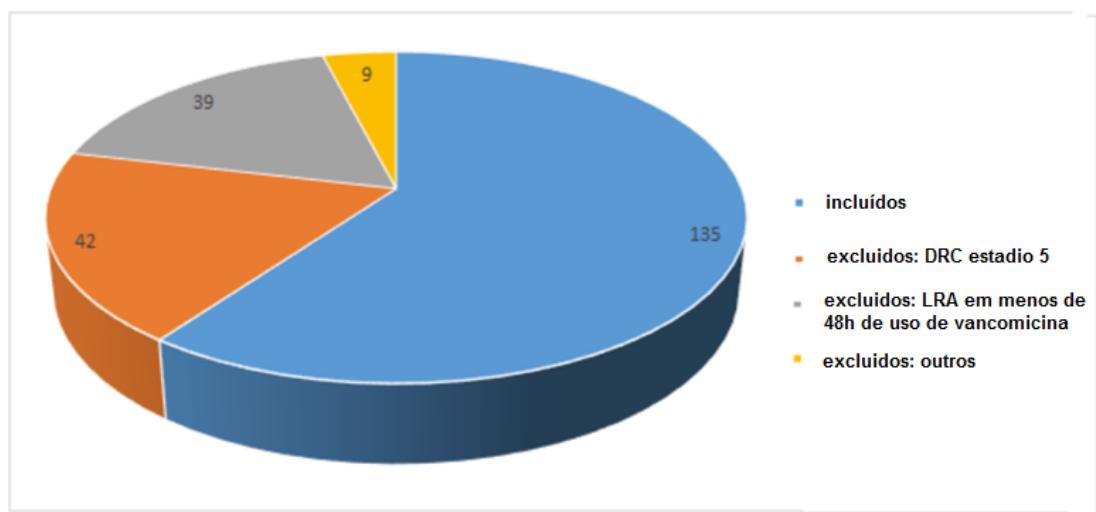


Figura 1: Distribuição dos pacientes incluídos no estudo

Para análise dos dados, foram estabelecidas as características clínicas e laboratoriais do N total de 135 pacientes não críticos. Pode-se observar que a grande maioria dos pacientes (94,1%) teve pelo menos uma dosagem de vancocinemia realizada durante o uso de vancomicina. Destes, 75,6% receberam ajustes de dose e 59,3% apresentaram nível sérico de vancomicina tóxico. A média dos maiores valores de vancocinemia foi de $22,07 \pm 14,77 \text{ mg/L}$. Dos 135 pacientes, 27,4% apresentaram LRA e 20,7% foram a óbito.

Em seguida, o N total de 135 pacientes foi dividido em 2 grupos: G1 e G2, e analisado de duas formas distintas, sendo observadas as características clínicas e laboratoriais dos pacientes. Assim, os pacientes foram comparados quanto à presença ou não de LRA (G1: LRA x G2: sem LRA) e também quanto ao desfecho hospitalar (G1: não óbito x G2: óbito).

4.1 Análise quanto à presença ou não de Ira

Da população total de 135 pacientes acompanhados por esse estudo, 27,4% evoluíram com LRA. Quanto à classificação da LRA, observou-se que KDIGO 1 foi mais frequente (54,05%), seguida de KDIGO 3 (27,03%) e então KDIGO 2 (18,92%).

Dos pacientes com LRA, 37,84% evoluiu para óbito, número consideravelmente superior quando comparado a 14,28% dos pacientes sem LRA ($p=0,006$).

De 37 pacientes que apresentaram LRA, houve necessidade de seguimento

nefrológico de 12 pacientes (32,43%), sendo a média do tempo de seguimento nefrológico destes de $3,78 \pm 7,789$ dias. A média de dias de tratamento com vancomicina até o diagnóstico de LRA foi de $9,32 \pm 6,45$ dias e o cálculo de ATN-ISS desses pacientes foi $0,23 \pm 0,19$.

Ao analisar a população quanto à presença ou não de LRA, os pacientes que desenvolveram LRA apresentaram, comparativamente àqueles sem LRA, maior peso ($72,345 \pm 16,8977$ x $65,621 \pm 15,8824$, $p=0,036$), maior necessidade de VM ($27,03$ x $2,04\%$, $p<0,001$) e de DVA ($18,91$ x $4,08\%$, $p=0,014$), maior uso de diurético ($45,94$ x $16,33$, $p=0,001$), maior tempo de internação ($29,95 \pm 17,86$ x $24,27 \pm 15,36$, $p=0,05$), maior média de número de ajustes de dose realizados ($2,38 \pm 1,72$ x $1,65 \pm 1,58$, $p=0,021$), maior ocorrência de nível sérico tóxico ($86,49$ x $48,98\%$, $p<0,001$), maior dose de ataque absoluta (mg) ($1651,35 \pm 320,42$ x $1513,01 \pm 414,18$, $p=0,031$), maior média dos valores de vancocinemia ($32,65 \pm 17,34$ x $20,89 \pm 12,32$, $p<0,001$), maiores valores de vancocinemia após 96 a 144 h de uso ($21,52 \pm 7,38$ x $16,50 \pm 7,77$, $p=0,014$), e maior mortalidade ($37,84$ x $14,28\%$, $p=0,006$), conforme exposto nas tabelas 01 e 02.

Os grupos com e sem LRA foram semelhantes quanto a idade, IMC, prevalência de sexo masculino, creatinina basal, CKD-EPI, prevalência de HAS, DM, DRC, DCV, DAOP, uso de contraste, uso de outras drogas nefrotóxicas, prevalência de foco de infecção cutâneo, urinário, corrente sanguínea, pulmonar e SNC, tempo de uso de vancomicina, dose de ataque (mg/kg), ajuste de dose, nível subterapêutico e número de vancocinemias colhidas, conforme mostrado nas tabelas 01 e 02.

VARIÁVEIS	Geral	COM LRA		p
	(N=135)	(N=37)	(N=98)	
Idade (anos)*	$60 \pm 17,349$	$56,03 \pm 17,529$	$56,15 \pm 17,372$	0,836
Peso (kg)*	$65 \pm 16,4065$	$72,345 \pm 16,8977$	$65,621 \pm 15,8824$	0,036
IMC*	$24,21 \pm 5,0278$	$26,183 \pm 5,4114$	$24,179 \pm 4,7869$	0,15
Sexo masculino (%)	93 (68,9)	28 (75,67)	65 (66,33)	0,402
Creatinina Basal (mg/dL)*	$0,6 \pm 0,22$	$0,662 \pm 0,29$	$0,651 \pm 0,1922$	0,827
CKD-EPI*	$106 \pm 25,7139$	$106,66 \pm 28,446$	$108,50 \pm 24,741$	0,811
Hipertensão arterial (%)	62 (45,9)	15 (40,54)	47 (47,96)	0,563
Diabetes Mellitus (%)	44 (32,6)	13 (35,13)	31 (31,63)	0,856
DRC (%)	4 (3)	1 (2,7)	3 (3,06)	1
DCV (%)	14 (10,4)	4 (10,81)	10 (10,2)	1
DAOP (%)	8 (5,9)	2 (5,4)	6 (6,12)	1
Ventilação Mecânica (%)	12 (8,9)	10 (27,03)	2 (2,04)	<0,001
Droga vaso ativa (%)	11 (8,1)	7 (18,91)	4 (4,08)	0,014

Contraste (%)	21 (15,6)	6 (16,22)	15 (15,3)	1
Diurético (%)	33 (24,4)	17 (45,94)	16 (16,33)	0,001
Outras drogas nefrotóxicas (%)	18 (13,3)	8 (21,62)	10 (10,2)	0,145
Categoria de internação:				0,36
Cirúrgica (%)	70 (51,9)	19 (51,35)	51 (52,04)	
Clínica (%)	65 (48,1)	32 (49,5)	33 (50,8)	
Diagnóstico de internação:				
Infecção (%)	76 (53,6)	15 (40,54)	61 (62,24)	0,038
CV (%)	5 (3,7)	3 (8,1)	2 (2,04)	0,248
PO (%)	28 (20,7)	8 (21,62)	20 (20,4)	1
Outros (%)	26 (19,3)	11 (29,73)	15 (15,3)	-
Foco da infecção:				
Cutâneo (%)	53 (39,3)	14 (37,84)	39 (39,79)	0,992
Urina (%)	5 (3,7)	0	5 (5,1)	0,374
ICS (%)	4 (3)	0	4 (4,08)	0,497
Pulmão (%)	27 (20)	9 (24,32)	18 (18,37)	0,596
Abdome (%)	6 (4,4)	-	-	-
Ósseo (%)	4 (3)	-	-	-
SNC (%)	21 (15,6)	6 (16,22)	15 (15,3)	1
Indeterminado (%)	15 (11,1)	-	-	-
Tempo de internação (dias)*	22±16,223	29,95±17,862	24,27±15,369	0,053
Óbito (%)	28 (20,7)	14 (37,84)	14 (14,28)	0,006

TABELA 01- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes internados em enfermarias quanto à presença ou não de LRA

KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão

VARIÁVEIS	Geral (N=135)	COM LRA (N=37)	SEM LRA (N=98)	p
Tempo de uso da vancomicina (dias)*	11±7,42	13,14±7,707	12,3±7,336	0,478
Dose de ataque absoluta (mg)*	1500±394,46	1651,35±320,42	1513,01±414,18	0,031
Dose de ataque (mg/kg)*	24,31±6,29	23,95±5,51	23,36±6,61	0,27
Valor da 1ª dose de manutenção (mg/kg)*	15,45±4,39	15,55±4,60	16,90±4,27	0,049
Média das doses de manutenção (mg/kg)*	16,96±5,69	16,29±5,53	18,64±5,65	0,047
Ajuste de dose (%)	102 (75,6)	32 (86,49)	70 (71,43)	0,112

Número de ajustes de dose*	2±1,65	2,38±1,722	1,65±1,58	0,021
Nível sérico tóxico (%)	80 (59,3)	32 (86,49)	48 (48,98)	<0,001
Nível subterapêutico (%)	75 (55,6)	17 (45,94)	58 (59,18)	0,235
Maior valor de Vancocinemia (mg/L)*	22,07±14,77	32,65±17,34	20,89±12,32	<0,001
T0-T2*	13,14±6,99	18,60±8,10	10,85±5,29	0,09
T2-T4*	11,64±11,92	16,158±15,25	11,30±10,18	0,138
T4-T6*	17,93±7,94	21,52±7,38	16,50±7,77	0,014
T6-T8*	0,00±11,98	7,115±10,88	10,11±12,32	0,183
T8-T10*	18,65±9,93	23,095±12,87	17,52±8,22	0,192
Número de vancocinemias colhidas*	4±3,034	4,46±3,07	3,77±3,015	0,171

TABELA 02: Características clínicas e laboratoriais relacionadas ao uso de vancomicina dos pacientes internados em enfermarias quanto à presença ou não de LRA

KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão

À análise quanto à regressão logística, pode-se observar que foram identificados como fatores de risco para LRA os seguintes parâmetros: uso de droga vasoativa (OR=1,124, p=0,045), nível sérico tóxico (OR=3,208, p=0,002) e dose de ataque absoluta (OR=3,722, p=0,022), como mostrado na tabela 03. Já as demais variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos.

VARIÁVEIS	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA	p
Droga vasoativa	1,124	1,016-1,253	0,045
Nível sérico tóxico	3,208	1,274-8,081	0,002
Dose de ataque absoluta	3,722	1,166-14,345	0,022
Dose de manutenção	3,722	0,966-14,345	0,056
Ventilação mecânica	1,385	0,979-3,162	0,275
Número de ajustes	1,251	0,919-3,662	0,159

TABELA 03: Regressão Logística das variáveis associada à presença de LRA

4.2 Análise quanto ao desfecho

Dos 135 pacientes incluídos no projeto, 20,7% evoluíram para óbito e 79,3% tiveram desfecho não óbito.

Os pacientes que evoluíram para óbito, em comparação com aqueles que não faleceram, apresentaram maior necessidade de droga vasoativa ($21,43 \times 4,67\%$, $p=0,013$), maior prevalência de internação clínica ($75 \times 41,12\%$, $p=0,003$), maior prevalência de foco de infecção pulmonar ($39,28 \times 14,95\%$, $p=0,009$), maior necessidade de seguimento nefrológico ($21,43 \times 6,54\%$, $p=0,044$), maior prevalência de LRA (50 x 21,49%, $p=0,006$) e de LRA KDIGO 3 ($42,86 \times 13$, $p=0,05$), maior vancocinemia em T4-T6 ($22,72 \pm 9,12 \times 16,52 \pm 7,15$, $p=0,005$) e tendência a maior vancocinemia em T8-T10 ($25,48 \pm 12,66 \times 17,61 \pm 8,73$, $p=0,065$), conforme as tabelas 04 e 05.

Já os pacientes que não evoluíram a óbito, apresentaram maior tempo de uso da vancomicina em dias ($13,31 \pm 7,56 \times 9,54 \pm 6,07$, $p=0,016$) e tendência a maior vancocinemia em T6-T8 ($9,96 \pm 11,78 \times 6,71 \pm 12,57$, $p=0,064$).

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a idade, peso, IMC, prevalência do sexo masculino, creatinina basal (mg/dL), CKD-EPI, prevalência de HAS, DM, DRC, DCV, DAOP, necessidade de ventilação mecânica, uso de contraste, uso de diurético, uso de outras drogas nefrotóxicas, foco de infecção cutâneo, urinário, corrente sanguínea e SNC, tempo de internação (dias), LRA KDIGO 1 e KDIGO 2, dose de ataque absoluta, dose de ataque (mg/kg), valor da 1ª dose de manutenção, média das doses de manutenção (mg/kg), ajuste de dose, número de ajustes de dose, prevalência de nível sérico tóxico, nível subterapêutico, maior valor de vancocinemia (mg/L) e número de vancocinemias colhidas, conforme mostram as tabelas 4 e 5.

VARIÁVEIS	Geral (N=135)	NÃO ÓBITO (N=107)	ÓBITO (N=28)	p
Idade (anos)*	$60 \pm 17,34$	$54,81 \pm 17,23$	$61,11 \pm 17,17$	0,061
Peso (kg)*	$65 \pm 16,40$	$67,38 \pm 16,19$	$68,46 \pm 17,48$	0,783
IMC*	$24,21 \pm 5,02$	$24,77 \pm 4,69$	$24,66 \pm 6,47$	0,683
Sexo masculino (%)	93 (68,9)	71 (66,35)	22 (78,57)	0,311
Creatinina Basal (mg/dL)*	$0,6 \pm 0,22$	$0,66 \pm 0,21$	$0,62 \pm 0,25$	0,681
CKD-EPI*	$106 \pm 25,713$	$108,87 \pm 23,761$	$104,67 \pm 25,72$	0,296
Hipertensão arterial (%)	62 (45,9)	47 (43,92)	15 (53,57)	0,485
Diabetes Mellitus (%)	44 (32,6)	39 (36,45)	5 (17,86)	0,101
DRC (%)	4 (3)	3 (2,8)	1 (3,57)	1
DCV (%)	14 (10,4)	8 (7,48)	6 (21,43)	0,071
DAOP (%)	8 (5,9)	7 (6,54)	1 (3,57)	0,886

Ventilação Mecânica (%)	12 (8,9)	7 (6,54)	5 (17,86)	0,134
Droga vaso ativa (%)	11 (8,1)	5 (4,67)	6 (21,43)	0,013
Contraste (%)	21 (15,6)	19 (17,76)	2 (7,14)	0,277
Diurético (%)	33 (24,4)	24 (22,43)	9 (32,14)	0,414
Outras drogas nefrotóxicas (%)	18 (13,3)	14 (13,08)	4 (14,28)	1
Unidade de internação:				0,003
Clínica (%)	65 (48,1)	44 (41,12)	21 (75)	-
Cirúrgica (%)	70 (51,9)	63 (58,88)	7 (25)	-
Diagnóstico de internação:				
Infecção (%)	76 (53,6)	60 (56,07)	16 (57,14)	1
CV (%)	5 (3,7)	2 (1,87)	3 (10,71)	0,100
PO (%)	28 (20,7)	25 (23,36)	3 (10,71)	0,227
Outros (%)	26 (19,3)			
Foco da infecção:				
Urina (%)	5 (3,7)	4 (3,74)	1 (3,57)	1
ICS (%)	4 (3)	4 (3,74)	0 (0)	0,680
Pulmão (%)	27 (20)	16 (14,95)	11 (39,28)	0,009
Abdome (%)	6 (4,4)	4 (3,7)	2 (7,1)	0,616
Indeterminado (%)	15 (11,1)	11 (10,2)	4 (14,2)	0,510
Seguimento Nefrológico (%)	13 (9,6)	7 (6,54)	6 (21,43)	0,044
Tempo de internação (dias)*	22±16,223	26,09±16,363	24,79±15,924	0,658
LRA (%)	37 (27,4)	23 (21,49)	14 (50)	0,006
KDIGO (%)				
1	21 (56,7)	16 (69,6)	5 (35,71)	0,09
2	7 (19)	4 (17,39)	3 (21,43)	0,316
3	9 (24,3)	3 (13)	6 (42,86)	0,05

TABELA 04: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes não críticos quanto ao seu desfecho

KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão

VARIÁVEIS	Geral (N=135)	NÃO ÓBITO (N=107)	ÓBITO (N=28)	p
Tempo de uso da vancomicina (dias)*	11±7,42	13,31±7,565	9,54±6,070	0,016
Dose de ataque absoluta (mg)*	1500±394,46	1554,67±407,18	1536,60±347,90	0,962

Dose de ataque (mg/kg)*	24,311±6,2931	23,52±6,39	23,59±6,02	0,847
Valor da 1ª dose de manutenção (mg/kg)*	15,455±4,3968	16,51±4,43	16,45±4,34	0,827
Média das doses de manutenção (mg/kg)*	16,968±5,6992	18,02±5,49	17,63±6,51	0,422
Ajuste de dose (%)	102 (75,6)	82 (76,63)	20 (71,43)	0,746
Número de ajustes de dose*	2±1,651	1,83±1,62	1,93±1,76	0,87
Nível sérico tóxico (%)	80 (59,3)	62 (57,94)	18 (64,28)	0,695
Nível subterapêutico (%)	75 (55,6)	61 (57,01)	14 (50)	0,652
Maior valor de Vancocinemia (mg/L)*	22,07±14,77	23,34±13,85	27,06±17,86	0,229
T0-T2*	13,14±6,99	12,36±6,96	18,03±6,9155	0,324
T2-T4*	11,64±11,92	11,93±10,24	15,32±16,87	0,677
T4-T6*	17,935±7,94	16,52±7,158	22,72±9,12	0,005
T6-T8*	0,00±11,98	9,96±11,78	6,71±12,57	0,064
T8-T10*	18,65±9,93	17,61±8,7	25,48±12,66	0,065
Número de vancocinemias colhidas*	4±3,034	4,07±3,04	3,54±3,02	0,29

TABELA 05: Características clínicas e laboratoriais relacionadas ao uso de vancomicina dos pacientes internados em enfermarias quanto ao seu desfecho

KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, LRA: Lesão Renal Aguda

*Média e Desvio Padrão

Ao se analisar os dois grupos por meio da regressão logística, pode-se observar que as variáveis LRA ($OR=3,208$, $p=0,013$), droga vasoativa ($OR=1,024$, $p=0,015$), idade ($OR=3,722$, $p=0,046$) foram identificadas como fatores de risco par o óbito, como mostra a tabela 06.

Os demais parâmetros como unidade de internação, infecção de foco pulmonar e vancocinemia em T6-T8 não diferiram estatisticamente entre os dois grupos estudados.

VARIÁVEIS	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA	p
LRA	3,208	1,274-8,081	0,013
Droga vasoativa	1,024	1,016-1,253	0,015
Idade	3,722	1,661-14,345	0,046

Unidade de internação	1,166	0,571-6,116	0,501
Foco pulmonar	1,023	0,411-2,787	0,415
Vancocinemia T6-T8	1,141	0,388-2,446	0,446

TABELA 06: Regressão Logística das variáveis associada ao óbito

5 | DISCUSSÃO / CONCLUSÕES

Com base nas análises e resultados apresentados, pode-se observar que a grande maioria dos pacientes (94,1%) teve pelo menos uma dosagem de vancocinemia realizada durante o uso de vancomicina. Destes, 75,6% receberam ajustes de dose e 59,3% apresentaram nível sérico de vancomicina tóxico. A média dos maiores valores de vancocinemia foi de $22,07 \pm 14,77 \text{ mg/L}$. A incidência de LRA em pacientes não críticos internados em enfermarias mostrou-se elevada: 27,4%. A classificação KDIGO 1 mostrou-se como a mais prevalente nessa população, correspondendo a 56,7% dos casos, seguida de KDIGO 3 (24,3%) e KDIGO 2 (19%).

Quanto aos fatores associados à LRA, à análise de regressão logística, foram identificados a necessidade de droga vasoativa, maior prevalência de nível sérico tóxico e maiores valores absolutos de dose de ataque de vancomicina. Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significantes à análise multivariada, vale ressaltar que se relacionaram à LRA: a maior necessidade de ventilação mecânica, com diferença entre os grupos LRA e não LRA de 24,99%, maior uso de diurético em 29,61%, maior tempo de internação em 5,68 dias, assim como valores de vancocinemia mais altos, especialmente durante o intervalo entre 96-144h do período de antibioticoterapia em 5,021 mg/L.

Quanto ao desfecho, 20,7% do total de pacientes incluídos no estudo foram a óbito e as variáveis associadas à maior mortalidade foram a idade, a ocorrência de LRA, especialmente KDIGO 3, e o uso de droga vasoativa. Destaca-se que o grupo óbito apresentou prevalência de LRA maior em 28,51% em relação ao grupo não óbito, sendo identificada a LRA como fator de risco independente para óbito na população não crítica em uso de vancomicina.

Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significantes à análise multivariada, demonstram potencial relação com a mortalidade: foco de infecção pulmonar, maior necessidade de seguimento nefrológico, e altos valores de vancocinemia nos intervalos 96-144h e 192-240h.

É importante ressaltar que o diagnóstico da LRA ocorreu em média no nono dia de antibioticoterapia com vancomicina, enquanto a vancocinemia em níveis tóxicos precedeu esses diagnóstico em torno de 4 dias, no período entre 96-144h. Essa associação necessita ser mais estudada, e, em breve, esse grupo pretende estudar o

papel da vancocinemia como preditor diagnóstico e prognóstico da LRA em pacientes não críticos, construindo a curva ROC, assim como determinando os valores de *cutoff*.

Deste modo, os dados são interessantes por retratarem a incidência de LRA e óbito em população de pacientes não críticos internados em enfermarias em uso de vancomicina, além de identificarem os fatores associados a essas variáveis, dados esses escassos na literatura, principalmente nacional.

Evidencia-se a importância da monitorização dos níveis séricos de vancocinemia durante a antibioticoterapia, visto que seus níveis tóxicos foram identificados como fator de risco independente para LRA e a presença de LRA foi fator de risco independente para o óbito. Desta forma, a identificação precoce de níveis séricos tóxicos de vancocinemia possibilitaria a redução da mortalidade por esta síndrome, uma vez que permite a realização de intervenções terapêuticas adequadas, como ajuste da dose ou do intervalo da administração, objetivando prevenir a LRA ou modificar a história natural desta patologia.

Por fim, mais estudos são necessários para explorar a LRA associada à nefrotoxicidade por vancomicina, assim como seus preditores diagnósticos e prognósticos.

REFERÊNCIAS

- Bosso J A, Nappi J, Rudisill C, et al. **Relationship between vancomycin trough concentrations and nephrotoxicity: a prospective multicenter trial.** Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(12):5475-5479.
- Bucovic Em, Ponce D, Balbi Al. **Fatores De Risco Para Mortalidade Na Lesão Renal Aguda.** Rev. Assoc. Med. Bras. 2011; 57 (2): 158-163
- Burdmann EA, Oliveira MB, Ferraboli R et al: Epidemiologia. In Schor N, Boim MA, dos Santos OFP (eds.): **Insuficiência Renal Aguda – Fisiopatologia, Clínica e Tratamento**, p 1. São Paulo, Sarvier, 1997.
- Chertow GM et al. **Acute Kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients.** J Am Soc Nephrol 2005; 16:3365-3370
- Elyasi, S., Khalili, H., Dashti-Khavidaki, S., Mohammaopour, A. (2012). **Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special population. A literature review.** Eur J Clin Pharmacol, pp 13-26
- Iwamoto T, Kagawa Y, Kojima M (2003) **Clinical efficacy of therapeutic drug monitoring in patients receiving vancomycin.** Biol Pharm Bull 26: 876–879

POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL EM BEBÊS A TERMO E PRÉ-TERMO

Dayse Mayara Oliveira Ferreira

Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo – FOB -USP
Bauru – SP.

Letícia Sampaio de Oliveira

Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – FMUSP.
São Paulo – SP.

Rafaela Cristina da Silva Bicas

Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - FFC/UNESP
Marília - SP.

Yara Bagali Alcântara

Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - FFC/UNESP
Marília - SP.

Brena Elisa Lucas

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Centrinho/ USP.
Bauru – SP.

Ana Cláudia Figueiredo Frizzo

Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - FFC/UNESP
Marília - SP.

RESUMO: A escuta é uma habilidade refinada que se desenvolve desde a vida intrauterina

se estende ao longo dos primeiros anos de vida. Diante disso a prematuridade é um dos fatores que interferem de forma significativa na aquisição do desenvolvimento da linguagem e da audição. Os Potenciais evocados auditivos são métodos eletrofisiológicos que investigam as habilidades relacionadas à audição e são utilizados na avaliação mais detalhada da função auditiva central. A Escala ELM (Early Language Milestone Scale) é um método que avalia as respostas comportamentais relativas às áreas auditiva-receptiva, auditiva-expressiva e auditiva-receptiva visual relacionadas à linguagem e audição que tem o objetivo de triar possíveis alterações nos bebês prematuros.

OBJETIVO: Avaliar e comparar os achados eletrofisiológicos e o desenvolvimento de linguagem de neonatos nascidos a termo e prematuros. **MÉTODO:** Trata-se de um estudo descritivo, analítico e transversal. Participaram do estudo 33 bebês de ambos os gêneros com idade de 1 a 24 meses, divididos em dois grupos, sendo o grupo 1 composto por 16 neonatos nascidos pré-termo e o grupo 2 composto por 17 neonatos nascidos a termo. Foi realizado o potencial evocado auditivo cortical para avaliação da função auditiva cortical e aplicada a escala ELM para avaliação da linguagem e audição. **CONCLUSÃO:** Houve diferença nos resultados do potencial evocado auditivo cortical em crianças com e sem prematuridade

e correlação destas medidas com o desempenho obtido pelo resultado da escala ELM.

PALAVRAS-CHAVE: audição; potenciais evocados auditivos; recém-nascido; prematuro.

POTENTIAL EVOCATION CORTICAL HEARING IN BABIES TO TERM AND PRE-TERM

ABSTRACT: Listening is a refined ability that develops since intrauterine life extends throughout the first years of life, because prematurity is one of the factors that significantly interfere with acquisition and slows the development of language and hearing. Auditory evoked powers are electrophysiological methods that investigate the skills related to hearing and therefore employed in the more detailed evaluation of the auditory function. The Early Language Milestone Scale (ELM) is another method that evaluates the behavioral responses related to the auditory-receptive, auditory-expressive and auditory-visual-visual-hearing-related areas very useful in screening for possible changes in preterm infants. **OBJECTIVE:** To evaluate and compare the language development of term and preterm newborns. **METHOD:** This is a descriptive, analytical and cross-sectional study. Thirty-three infants of both genders aged 1 to 24 months, divided into two groups, were composed of 16 infants born to preterm infants and group 2 composed of 17 infants born at term. The cortical auditory evoked potential was used to evaluate the cortical auditory function and applied the ELM scale for language and hearing evaluation. **CONCLUSION:** There were differences in cortical auditory evoked potential in children with and without prematurity and correlation of these measures with the performance of the study children with the ELM scale.

KEYWORDS: hearing; auditory evoked potentials; newborn; premature.

1 | INTRODUÇÃO

A escuta é uma habilidade refinada que o indivíduo possui, e é por meio dela que o recém-nascido entra em contato com o ambiente sonoro em com estrutura da língua. Seu desenvolvimento inicia na vida intrauterina (CURSO, 2010), desde a vigésima semana de gestação o feto apresenta resposta ao estímulo auditivo, observados por meio de alterações na frequência cardíaca e movimentos corporais (NORTHEN E DOWN, 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde o recém-nascido pré-termo ou prematuro é aquele nascido com idade gestacional abaixo de 37 semanas e com baixo peso ao nascimento, nascido com 2.500 gramas (OMS, 2012). A prematuridade é um dos fatores que interferem de forma significativa na aquisição e desenvolvimento da linguagem e da cognição, principalmente nos primeiros anos de vida (LAMÔNICA; PICOLINI, 2009). Em 2010 pesquisadores observaram que crianças prematuras com baixo peso ao nascimento apresentam maiores comprometimentos nas áreas

auditivas receptivas, expressiva e visual, quando comparado a crianças nascidas a termo (LAMÔNICA; CARLINO; ALVARENGA, 2010).

Para obter informações específicas quanto a detecção da alteração auditiva atualmente tem-se utilizado a avaliação eletrofisiológica, que pode trazer uma análise mais completa das estruturas da via auditiva periférica e central, sendo possível avaliar o desenvolvimento auditivo a nível cortical (PEREIRA, 2007), além de serem considerados métodos neurofisiológicos de maior aplicação na investigação cognitiva (LIGHTFOOT, 2016). Na literatura este exame é chamado de potencial evocado auditivo de longa latência (PEALL), que avaliam regiões do tálamo e córtex auditivo (LIÉGEOIS-CHAUVEL et al., 1994). Os PEALL tem se mostrado significativos na avaliação audiológica, por proporcionam informações objetivas e quantitativas quanto à funcionalidade das estruturas auditivas centrais (VENTURA; COSTA FILHO; ALVARENGA, 2009).

O potencial é caracterizado exógeno ou sensorial por mostrarem peculiaridades acústicas e temporais do estímulo. Os complexos P1-N1-P2-N2-P3a transmitem informações do início do estímulo auditivo ao córtex e a chegada do processamento cortical (POLICH, 2009). A maturação do sistema auditivo central em crianças sem alterações auditivas ocorre de forma progressiva, determinado pelo acréscimo da definição morfológica dos PEALL, diminuição dos valores de latência e amplitude dos complexos (VENTURA; COSTA FILHO; ALVARENGA, 2009), que demonstram maior agilidade e eficácia do sistema auditivo nervoso central (SNAC) em responder aos estímulos. Desta forma, caso ocorram alterações quanto aos valores de latência, amplitude e na morfologia das ondas do complexo, é necessário analisar com mais cautela a história clínica do sujeito e as possíveis consequências destas alterações auditivas centrais.

Em bebês e crianças a alteração auditiva pode levar ao prejuízo na aquisição de linguagem, sendo assim é de extrema importância investigar o desenvolvimento auditivo e de linguagem em bebês com fatores de risco para tais alterações. A escala ELM é um instrumento específico de linguagem que determina parâmetros comportamentais para avaliar as funções receptivas, expressivas auditivas e visuais relacionadas à linguagem. A escala é definida como um teste de triagem de fácil aplicação destinada a neonatos de até 36 meses, sendo composta por algumas perguntas direcionada aos pais ou responsável, observação do comportamento do neonato e pelo teste realizado pelo aplicador da escala (COPLAN et al., 1982).

Considerando que o diagnóstico precoce é de suma importância para o desenvolvimento e aquisição da linguagem oral, a literatura têm demonstrado estudos utilizando a escala ELM como método de triagem de possíveis alterações de linguagem na criança prematura (OSCAR D. PÁEZ-PINEDA; CALDERÓN, 2014; SOUZA et al., 2014). Durante os primeiros meses de vida do neonato prematuro é importante o acompanhamento do mesmo com avaliações que possam direcionar o profissional a propor uma reabilitação adequada, visto que a prematuridade é um dos

fatores para alterações nas habilidades cognitivas, motoras, em áreas de atenção, memória, linguagem, coordenação visomotora e visuoespacial, e alterações auditivas. Acredita-se que quando diagnosticados precocemente o prognóstico pode ser positivo (CARAVALE et al., 2005) pois assim pode-se dar inicio a reabilitação precoce.

Assim, frente à necessidade de investigar o desenvolvimento auditivo e de linguagem de crianças recém-nascidas prematuras, o presente estudo tem como objetivo principal de avaliar e comparar os resultados dos achados eletrofisiológicos e da escala ELM de neonatos nascidos a termo e prematuros a fim de verificar a eficácia destes instrumentos para tal diagnóstico e descrever os resultados desta população.

2 | MÉTODO

Trata-se de um estudo descritivo e analítico, transversal. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Instituição de pesquisa (CAAE 63077916.9.0000.5406). Todos os responsáveis pelos sujeitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início das avaliações.

Participaram do estudo 33 neonatos de ambos os sexos com idade de 1 à 24 meses. Os participantes foram divididos em dois grupos selecionados por demanda espontânea do Centro de Estudos da Educação e Saúde (CEES – FFC/UNESP-Marília), sendo o grupo 1 (G1) composto por 16 bebês, nascidos a termo e o grupo 2 (G2) composto por 17 bebês, nascidos pré-termo. Para a inclusão dos indivíduos na pesquisa foram seguidos os seguintes critérios: (1) Assinatura do TCLE; (2) Possuir idade entre 0 a 24 meses; (3) Possuir limiar eletrofisiológico de 20dBnHL; (4) Possuir curva timpanométrica tipo A; (5) Ser nascido a termo, com 38 a 40 semanas de gestação (G1); (6) Ser nascido pré-termo, com 37 semanas de gestação ou período inferior (G2); (7) Possuir histórico clínico de permanecer na incubadora por até 48 horas (Apenas os bebês pré-termo - G2). Para exclusão dos indivíduos na pesquisa foram seguidos os seguintes critérios: (1) Não assinatura do TCLE; (2) Possuir idade superior a 24 meses; (3) Possuir limiar eletrofisiológico superior a 20dBnHL; (4) Possuir curva timpanométrica tipo Ar ou As, B, ou C; (5) Ser diagnosticado com síndrome ou alteração genética; (6) Possuir comprometimento de ordem neurológica, comportamental ou psicológica.

Foram realizados procedimentos pré-coleta de dados para definição dos critérios de inclusão, exclusão e divisão dos grupos. Tal procedimento foi seguido de um protocolo de avaliação objetiva da audição respeitando o princípio cross check: (1) Anamnese audiológica: Foi realizada com um roteiro de perguntas aos familiares ou responsáveis pelos participantes com o intuito de investigar a vida pregressa, determinação da história clínica, confirmar o tempo de gestação a fim de identificar qual grupo que a criança se enquadraria, bem como possíveis fatores de risco para alterações auditivas; (2) Inspeção do conduto auditivo externo: Os participantes foram

submetidos à inspeção do meato acústico externo para verificar as condições para a realização da avaliação audiológica; (3) Timpanometria: Realizada com o objetivo de obter a complacência da orelha média do participante. Foi utilizada a sonda de 1000Hz para crianças de 0 a 6 meses, e a sonda de 226Hz para crianças de 7 meses a 24 meses; (4) Potencial Evocado Auditivo De Tronco Encefálico (PEATE): Realizado com o objetivo de registrar a qualidade da transmissão da atividade elétrica que ocorre no sistema auditivo central em resposta a um estímulo sonoro, estabelecer o limiar mínimo eletrofisiológico auditivo e caracterizar a amostra. Após higienização da pele com gaze e pasta eletrolítica, foram posicionados dois eletrodos na testa (Fz e Terra), dois eletrodos na porção das mastoides do lado direito e esquerdo da criança e um eletrodo na posição central da cabeça (Cz), além de inserir um fone de inserção bilateralmente. Foi considerado dentro dos padrões de normalidade o indivíduo que apresentar registro das ondas I, III e V com latências e interpicos normais para a faixa etária, e resposta eletrofisiológica mínima a 20dBnHL (Sousa et al, 2010). (5) Potencial Evocado Auditivo Cortical (PEAC/PCA): Foi utilizado o equipamento *Biologic Navigator Pro* com registros mediante a utilização de cinco eletrodos descartáveis posicionados em Fz e Cz em referência ao lóbulo direito (Fz e Cz/A2) e depois esquerdo (Fz e Cz/A1), utilizando-se os 2 canais de registro do equipamento, o eletrodo terra foi posicionado em Fpz. A impedância foi mantida em um nível inferior a 5K Ohms. Para a aquisição do PCAs foram utilizados diferentes os estímulos e contrastes /ba/ x /da/, apresentados monoaurais de forma randômica na proporção de 20% de estímulos infrequentes (/da/) de um total de 100 estímulos frequentes (/ba/), apresentados num paradigma oddball registrados numa janela de 500ms com filtragem passa banda de 1-30Hz, amplificação de 50.000x, polaridade alternada e taxa de estimulação de 1.9 estímulos/segundo. Os estímulos de fala natural foram vozes masculinas fluidas com duração de 180ms gravados a 70dBNA, extraídos da segunda sílaba durante a emissão /dada/ e /baba/ em que os formantes F1, F2 e F3 foram obtidos na sua porção inicial e estável. Tais estímulos foram desenvolvidos no Laboratório de Linguística do Instituto de Estudos de Linguagem da Universidade Estadual de Campinas gravados no Praat® (Versão 4.2.31), em 48KHz, posteriormente gravados em CD para a inserção em formato wave para a inserção do Software do equipamento Biologic Navigator®.

Foi realizada a identificação do complexo N1-P2-N2-P3a, primeiras ondas que aparecem na sequência e apresentam polaridade negativa- positiva-negativa, respectivamente, de acordo com a idade cronológica do paciente. Os registros obtidos foram analisados pela pesquisadora e dois juízes experientes na área de eletrofisiologia, a fim de verificar a concordância das análises. Foi considerado para análise estatística quando pelo menos dois juízes marcaram a onda na mesma latência ou muito similares entre elas. O tempo para finalizar cada procedimento de avaliação pré-coleta e o procedimento de pesquisa teve duração de aproximadamente 1 hora.

No momento de aplicação da escala ELM foi delineada uma linha vertical em toda escala, na idade da criança a ser testada, em seguida, foram avaliados todos os itens

que se transpassa esta linha vertical em cada uma das três áreas, para determinar-se os níveis de teto e base. Foram identificados três itens de sucesso ou fracasso em cada função. Considerou-se a testagem direta (T); o relato dos pais (H) ou a observação incidental do comportamento (O). Foi classificado como “desempenho adequado” quando o nível base da criança esteve entre os 90% em todos os itens, sem falhas. Foi classificado como “Passou” na escala ELM o bebê cujo escore foi superior ou igual a 75% em todos os itens para o nível de teto para a idade, e foi considerado como “Falhou” na escala ELM o bebê cujo escore foi inferior a 75% em todos os itens para o nível de base para a idade. Os dados estão descritos pela média e desvio-padrão (DP). As variáveis qualitativas estão descritas pela distribuição de frequência absoluta (f) e relativa (%). A associação entre as variáveis qualitativas foi analisada pelo teste Exato de Fisher. A normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados no software SPSS versão 24.0 para Windows.

3 | RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a análise descritiva dos valores de média e desvio padrão, e comparação entre as orelhas e entre os grupos para os complexos P1-N1-P2-N2-P3a, do grupo G1 e G2.

	G1 (n=16)		G2 (n=17)		p-valor Anova	
	Média	DP	Média	DP	grupo	lado
OD_Cz_LatP1	84,68	16,38	82,79	29,74	0,415	0,715
OE_Cz_LatP1	91,11	31,51	80,32	23,11		
OD_Cz_LatN1	118,05	20,57	109,76	35,15	0,564	0,337
OE_Cz_LatN1	120,93	36,80	121,14	36,02		
OD_Cz_LatP2	183,01	21,38	174,02	51,46	0,199	0,926
OE_Cz_LatP2	173,07	24,23	185,47	51,23		
OD_Cz_LatN2	244,80	33,41	226,92	51,93	0,636	0,704
OE_Cz_LatN2	243,58	39,20	237,99	61,16		
OD_Cz_LatP3a	319,95	38,67	321,46	32,41	0,615	0,979
OE_Cz_LatP3a	324,21	38,68	316,73	56,81		
OD_Cz_AmpP1	1,68	2,23	-0,03	3,06	0,633	0,351
OE_Cz_AmpP1	2,13	2,71	1,36	2,43		
OD_Cz_AmpN1	-2,04	2,72	-3,14	2,86	0,901	0,665
OE_Cz_AmpN1	-1,66	1,570	-2,93	2,85		
OD_Cz_AmpP2	5,14	2,90	2,90	2,61	0,418	0,561
OE_Cz_AmpP2	5,38	3,35	1,50	1,65		
OD_Cz_AmpN2	-3,74	4,10	-3,05	5,68	0,959	0,082
OE_Cz_AmpN2	-2,23	1,78	-1,45	3,78		
OD_Cz_AmpP3	4,28	2,11	2,47	2,19	0,035*	0,352
OE_Cz_AmpP3	2,97	2,35	5,69	5,20		

Tabela 1: Comparação da média e desvio-padrão (DP) entre lado (orelha) e grupo.

Nota: *p<0,05 diferença significa entre os grupos (Anova)

Pode-se observar pouca variação entre os grupos quanto os valores de latência e amplitude para média e desvio padrão, uma vez que ambos os grupos encontram-se com valores dentro dos padrões de normalidade esperado para a idade cronológica. Porém, é possível verificar que, apesar disso, houve diferença estatisticamente significante para amplitude de P3a na OE entre G1 e G2, sendo que para G1 o valor da amplitude é um pouco maior, ou seja, existe uma resposta mais predominante das estruturas envolvidas em comparação ao G2. Na sequência a tabela 2 apresenta a análise de associação da distribuição de frequência da idade, sexo e passa ou falha na escala ELM entre os grupos.

Variável	Categoria	Grupo		F	% G1	F	% G2	p-valor
Idade	0 a 1 ano	15	93,8	15	88,2			1,000
	1 a 2 anos	1	6,3	2	11,8			
Sexo	Feminino	9	56,3	13	76,4			0,282
	Masculino	7	43,8	4	23,6			
ELM	Passou	12	75,0	10	58,8			0,465
	Falhou	4	25,0	7	41,2			

Tabela 2: Análise da associação da distribuição de frequência da idade, sexo e ELM entre os grupos.

Nota: * p<0,05 associação significativa pelo teste Exato de Fisher.

É possível notar um maior número de falha na triagem no G2, demonstrando que as crianças prematuras deste grupo já apresentam indícios de atraso de linguagem em comparação ao G1 onde a taxa de falhas foi menor.

A tabela 3 apresenta a análise da correlação entre a latência e amplitude dos complexos P1-N1-P2-N2-P3a e a escala ELM. Observa-se correlação negativa moderada entre as latências dos complexos P1 e P3a e amplitude de P2.

	ELM	
	r	p-valor
OD_Cz_LatP1	-0,392	0,024*
OE_Cz_LatP1	-0,307	0,082
OD_Cz_LatN1	-0,257	0,150
OE_Cz_LatN1	-0,263	0,139
OD_Cz_LatP2	-0,024	0,896
OE_Cz_LatP2	-0,176	0,328
OD_Cz_LatN2	-0,061	0,737
OE_Cz_LatN2	-0,223	0,213
OD_Cz_LatP3a	-0,238	0,252
OE_Cz_LatP3a	-0,496	0,010*
OD_Cz_AmpP1	-0,108	0,550
OE_Cz_AmpP1	0,142	0,431
OD_Cz_AmpN1	-0,024	0,896

OE_Cz_AmpN1		-0,115	0,525
OD_Cz_AmpP2		-0,365	0,037*
OE_Cz_AmpP2		-0,149	0,409
OD_Cz_AmpN2		0,162	0,368
OE_Cz_AmpN2		0,203	0,258
OD_Cz_AmpP3		-0,048	0,821
OE_Cz_AmpP3		-0,167	0,415

Tabela 3: Análise da correlação entre Potencial evocado auditivo cortical e ELM.

Nota: r coeficiente de correlação de Spearman.* p<0,05 correlação significativa.

Pode-se observar que houve correlação significativa para o componente P1 e P2 da OD, e para o componente P3a da OE. A seguir a tabela 4 apresenta as variáveis quanto a latências e as amplitudes segundo a escala ELM.

	ELM	N	Média	DP	IC 95%		Valor de p
					Interior	Superior	
LatP1	Normal	22	89,4736	24,75274	78,4989	100,4484	0,011*
	Alterado	11	66,3273	19,51760	53,2152	79,4394	
LatN1	Normal	22	120,3232	29,32844	107,3197	133,3267	0,108
	Alterado	11	102,6361	28,07978	83,7718	121,5003	
LatP2	Normal	22	183,7332	37,36463	167,1666	200,2997	0,814
	Alterado	11	180,3655	40,84726	152,9239	207,8070	
LatN2	Normal	22	234,9741	44,82697	215,0989	254,8493	0,772
	Alterado	11	230,3618	37,84373	204,9381	255,7856	
LatP3a	Normal	17	324,6353	35,65536	306,3030	342,9676	0,346
	Alterado	8	310,2263	33,11126	282,5445	337,9080	
AmpP1	Normal	22	1,5536	3,23753	,1182	2,9891	0,680
	Alterado	11	1,0718	2,91436	-,8861	3,0297	
AmpN1	Normal	22	-2,7541	3,67036	-4,3814	-1,1267	0,799
	Alterado	11	-2,4218	3,13460	-4,5277	-,3160	
AmpP2	Normal	22	4,9105	2,61653	3,7503	6,0706	0,048*
	Alterado	11	2,8591	2,85664	,9400	4,7782	
AmpN2	Normal	22	-3,5573	5,60776	-6,0436	-1,0709	0,216
	Alterado	11	-1,3500	1,86390	-2,6022	-,0978	
AmpP3	Normal	17	3,5665	2,02183	2,5269	4,6060	0,874
	Alterado	8	3,4100	2,78191	1,0843	5,7357	

Tabela 4: Análise das variáveis latências e amplitudes, independentes das orelhas, segundo escala ELM alterado ou normal.

* p<0,05 (ANOVA)

Ao analisar novamente os resultados do PEAC com correlação com a escala ELM, nota-se que para a latência de P1 e para a amplitude de P2 há diferenças estatisticamente significantes quando a ELM é normal e quando é alterada, ou seja, as variáveis latência de P1 e amplitude de P2 mudam dependendo do resultado da ELM.

4 | DISCUSSÃO

A partir dos resultados apresentados no presente estudo foi observado que existem diferenças entre os grupos para o complexo de ondas do PEAC.

Na Tabela 1 encontra-se diferença estatisticamente significante entre as orelhas para o componente P3a do lado esquerdo. Tal componente está associado à uma atenção involuntária ao estímulo discrepante, como o de fala utilizado, e pelo fato de não necessitar uma atenção e conhecimentos prévios de linguagem, é possível que este componente seja visível no complexo de ondas de bebês a partir dos 4 meses de idade (HE; HOTSON; TRAINOR, 2009). Os resultados do presente estudo também encontram a onda P3a na população estudada, porém com diferenças estatísticas entre elas, principalmente para o lado esquerdo, assim, pode-se pressupor que a maturação auditiva entre os grupos interferiu nos valores de latência e amplitude deste potencial. Apesar de não ser necessária a atenção ao estímulo o próprio córtex auditivo pode ter capacidade em reconhecer as diferenças do estímulo (TRAINOR et al, 2009). Sendo assim, os resultados podem sugerir que em bebês prematuros existe a possibilidade de uma futura dificuldade de reconhecimento acústico e linguístico (SOUZA; DIDONÉ; SLEIFER, 2017). Outros estudos também comprovaram que a criança pré-termo processa a informação de maneira diferente da criança a termo (MIKKOLA et al., 2010), e com os resultados do presente estudo foi possível identificar que isto ocorre a nível cortical.

Apesar disto, ao analisar os valores isolados de latência e amplitude, assim como os valores médios e de desvio padrão entre os grupos, observa-se que ambos obtiveram valores dentro dos padrões de normalidade esperados (KRAUS et al, 2003). Um estudo realizado anteriormente descreveu PEACs dentro do esperado em crianças prematuras (HÖVEL et al., 2015), porém, a literatura salienta que crianças nascidas com idade gestacional inferior a 25 semanas e muito baixo peso ao nascimento apresentam atrasos mais significativos no desenvolvimento (LIMA et al., 2011), o que não foi encontrado em nenhuma criança analisada no presente estudo, visto que a menor idade gestacional foi entre 27 e 38 semanas.

Em relação aos resultados da escala ELM, foi identificado um predomínio de falha no grupo G2 (Tabela 2), demonstrando um atraso no desenvolvimento auditivo e de linguagem em crianças prematuras, que pode ter ocorrido devido a imaturidade neurológica nestes casos (ANGRISANI et al., 2014), a qual também pode ocasionar atraso no desenvolvimento do sistema sensorial auditivo (RODRIGUES; BOLSONI, 2011).

Na Tabela 3 foi encontrada correlação significativa entre os resultados da escala ELM com os resultados do PEAC, mais especificamente para os componentes P1 e P2 da OD e para o componente P3a da OE.

Sabe-se que os primeiros componentes do complexo de ondas do PEAC são biomarcadores do desenvolvimento auditivo (ALVARENGA et al., 2013) e dependentes

de maior tempo de exposição ao mundo sonoro, porém para que essa exposição cause desenvolvimento auditivo é necessário que o SNAC esteja apto a processar os estímulos. Na literatura encontra-se que o P2 também pode ser considerado um biomarcador em relação ao desenvolvimento do reconhecimento auditivo e é dependente desta estimulação e treinamento prévio, e com isso tende a ter sua latência e amplitude diminuídas ao longo do tempo, demonstrando o efeito da aprendizagem auditiva e de linguagem (TREMBLAY et al., 2014). O valor aumentado da amplitude em crianças prematuras sugerem maior atividade elétrica para a discriminação de estímulos de fala compatíveis com as dificuldades auditivas e lingüísticas em nível cortical (WUNDERLICH; CONE-WESSON; SHEPHERD, 2006). Assim, ao comparar crianças nascidas a termo e pré termo observa-se que existe uma diferença neste aprendizado, o que leva a um maior esforço das regiões corticais em responderem ao estímulo, e consequentemente causa alterações nos valores de amplitude. No presente estudo foi encontrada esta diferença principalmente do lado direito, sustentando mais uma vez a hipótese de diferenças no desenvolvimento auditivo e de linguagem entre as crianças prematuras, devido a relação que o lado direito tem com o córtex e hemisfério esquerdo, responsáveis pelo aprendizado de habilidades de linguagem.

A latência do componente P3a está relacionada à pré-atenção empregada pela criança no momento da discriminação do estímulo lingüístico raro, sendo assim está fortemente ligada ao funcionamento das áreas receptivas da linguagem (MARTIN; TREMBLAY; KORCZAK, 2008) e, como já citado, pode estar presente em bebês a partir de 4 meses de idade (TRAINOR et al, 2009). A correlação deste componente com a escala ELM é outro fator que deve chamar a atenção do leitor e do profissional pois comprova a efetividade dos dois testes utilizados, pois a escala ELM tem como objetivo triar a linguagem receptiva e expressiva de bebês e crianças (OSCAR D. PÁEZ-PINEDA; CALDERÓN, 2014; SOUZA et al., 2014), já o PEAC avalia o desenvolvimento auditivo do SNAC e como os estímulos auditivos estão sendo reconhecidos e compreendidos por aquele sistema (KRAUS et al, 2003). Com isso, a partir dos resultados do presente estudo, podemos afirmar que crianças com prematuridade podem ter atrasos no desenvolvimento do SNAC, confirmadas pela correlação com o P3a, o que consequentemente pode ocasionar dificuldades na aquisição e desenvolvimento de linguagem, também confirmadas pela falha, ou pontuação abaixo do esperado, dessas crianças na escala ELM.

É necessário que o fonoaudiólogo que trabalha com populações prematuras esteja atento a estes resultados, pois no presente estudo mesmo com resultados eletrofisiológicos dentro da normalidade (KRAUS et al, 2003), ao compararmos crianças nascidas a termo e pré termo, e com a aplicação de um teste simples de linguagem, foram encontrados indícios de atraso no desenvolvimento em bebês com poucos anos de vida. Desta forma, reforça-se a necessidade de avaliações específicas nesta população para que seja possível investir e fornecer orientações e reabilitação precoce deste grupo quando necessário.

A análise realizada na Tabela 4 soma com os resultados anteriores já encontrados, pois ela demonstra de forma estatisticamente significante e objetiva o quanto a alteração da escala ELM, ou seja, a alteração do desenvolvimento de linguagem interfere na maturação auditiva, comprovada pela mudança significativa que pode ocorrer nas variáveis dos componentes da onda PEAC, principalmente para latência de P1 e amplitude de P2, que são responsáveis pelo acompanhamento da maturação auditiva (ARAÚJO; LIMA; ALVARENGA, 2013; TREMBLAY et al., 2014), além da correlação dos resultados do teste de linguagem com o componente P3a.

Assim, o presente estudo pôde constatar que a escala ELM é um bom instrumento de linguagem para avaliar o desenvolvimento de linguagem de neonatos e crianças até 24 meses, e se torna ainda mais completo ao ser correlacionado com um exame eletrofisiológico auditivo. Desta forma, pode-se mensurar o desenvolvimento de neonatos desde o nascimento, e caso sejam identificadas alterações, a necessidade de acompanhamento longitudinal e reabilitação precoce de audição e de linguagem.

5 | CONCLUSÃO

Existem diferenças nos resultados das medidas eletrofisiológicas, a nível cortical, e comportamentais, de linguagem expressiva e receptiva, de crianças com e sem prematuridade. Tais resultados estão relacionados entre si, sendo assim, a avaliação auditiva e de linguagem nesta população até os dois anos de idade, é de extrema importância para identificar a necessidade de acompanhamento e reabilitação precoce.

6 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro na execução deste trabalho, aos pacientes e responsáveis pela participação e a todos os autores pela contribuição ao estudo.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, K. D. F. et al. **The influence of speech stimuli contrast in cortical auditory evoked potentials**. Brazilian journal of otorhinolaryngology, v. 79, n. 3, p. 336–41, 2013.
- ANGRISANI, R. G. et al. **Auditory pathway maturational study in small for gestational age preterm infants**. CoDAS, v. 2, n. 2, p. 286–293, 2014.
- ARAÚJO, E. S.; LIMA, F. S.; ALVARENGA, K. F. **Monitoramento de crianças com indicadores de risco para a deficiência auditiva**. Revista CEFAC, v. 15, n. 2, p. 305–313, 2013.
- CARAVALE, B. et al. **Cognitive development in low risk preterm infants at 3-4 years of life**. Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, v. 90, n. 6, p. 474–480, 2005.

COPLAN, J. et al. **Validation of an early language milestone scale in a high-risk population.** Pediatrics, v. 70, n. 5, p. 677–683, 1982.

CURSO, T. DE. **Experiência Auditiva No Meio Intra-Uterino.** p. 1–15, 2010.

GODEY, B. et al. **Neuromagnetic source localization of auditory evoked fields and intracerebral evoked potentials: A comparison of data in the same patients.** Clinical Neurophysiology, v. 112, n. 10, p. 1850–1859, 2001.

HE, C.; HOTSON, L.; TRAINOR, L. J. **Maturation of cortical mismatch responses to occasional pitch change in early infancy: Effects of presentation rate and magnitude of change.** Neuropsychologia, v. 47, n. 1, p. 218–229, 2009.

HÖVEL, H. et al. **Auditory event-related potentials are related to cognition at preschool age after very preterm birth.** Pediatric Research, v. 77, n. 4, p. 570–578, 2 abr. 2015.

KRAUS, N.; NICOL, T. Aggregate neural responses to speech sounds in the central auditory system. **Speech Communication**, 2003. v. 41, n. 1, p. 35–47.

LAMÔNICA, D. A. C.; PICOLINI, M. M. **Habilidades do desenvolvimento de prematuros.** Revista CEFAC, v. 11, n. suppl 2, p. 145–153, 20 mar. 2009.

LAMÔNICA, D.; CARLINO, F.; ALVARENGA, K. **Avaliação da função auditiva receptiva, expressiva e visual em crianças prematuras.** Pró-fono, v. 22, n. 1, p. 19–24, 2010.

LIÉGEOIS-CHAUVEL, C. et al. Evoked potentials recorded from the auditory cortex in man: evaluation and topography of the middle latency components. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/ Evoked Potentials**, v. 92, n. 3, p. 204–214, 1994.

LIGHTFOOT, G. **Summary of the N1-P2 Cortical Auditory Evoked Potential to Estimate the Auditory Threshold in Adults.** Seminars in Hearing, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2016.

LIMA, M. C. M. P. et al. **Comparação do desenvolvimento da linguagem de crianças nascidas a termo e pré-termo com indicadores de risco para surdez.** Distúrbios da Comunicação, v. 23, n. 3, p. 297–306, 2011.

MARTIN, B. A.; TREMBLAY, K. L.; KORCZAK, P. **Speech Evoked Potentials: From the Laboratory to the Clinic.** Ear & Hearing, v. 29, p. 285–313, 2008.

MIKKOLA, K. et al. **Behavioral and evoked potential measures of distraction in 5-year-old children born preterm.** International Journal of Psychophysiology, v. 77, n. 1, p. 8–12, 2010.

OSCAR D. PÁEZ-PINEDA, D. V.-V. Y; CALDERÓN, M. V. O. **Evaluacion del lenguaje mediante la escala de early language milestone y el método de munich.** Journal of Public Health; Vol. 16, nm. 3 (2014); 453-461 Revista de Salud Pública; Vol. 16, nm. 3 (2014); 453-461 0124-0064, v. 16, n. 3, p. 453–461, 2014.

PEREIRA, P. K. S. et al. **Programa de triagem auditiva neonatal: associação entre perda auditiva e fatores de risco.** Pró-Fono Revista de Atualização Científica, v. 19, n. 3, p. 267–278, 2007.

POLICH, J. NIH Public Access. **North**, v. 118, n. 10, p. 2128–2148, 2009.

RITA, R.; RINNE, T.; NÄÄTÄNEN, R. **Maturation of cortical sound processing as indexed by event-related potentials.** Clinical Neurophysiology, v. 113, n. 6, p. 870–882, 2002.

RODRIGUES, O. M. P. R.; BOLSONI, SILVA A. T. **Effects of the Prematurity on the Development of Lactentes.** Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum, v. 21, n. 14, p. 111–121, 2011.

SILVEIRA, K. A.; FIORIM ENUMO, S. R. **Riscos Biopsicossociais para o Desenvolvimento de Crianças Prematuras e com Baixo Peso. Biopsychosocial risks to development in preterm children with low birth weight.** Paidéia, v. 22, n. 53, p. 335–345, 2012.

SOUZA, A.; DIDONÉ, D.; SLEIFER, P. **Longitudinal Comparison of Auditory Steady-State Evoked Potentials in Preterm and Term Infants: The Maturation Process.** International Archives of Otorhinolaryngology, v. 21, n. 03, p. 200–205, 2017.

SOUZA, C. DE et al. **Language abilities performance of children born preterm and low birth weight and associated factors.** Audiol Commun Res., v. 19, n. 2, p. 158–66, 2014.

TRAINOR, L. et al. Changes in auditory cortex and the development of mismatch negativity between 2 and 6 months of age. **International Journal of Psychophysiology**, 2003. v. 51, n. 1, p. 5–15.

TREMBLAY, K. L. et al. **Is the auditory evoked P2 response a biomarker of learning?** Frontiers in systems neuroscience, v. 8, n. February, p. 28, 2014.

VENTURA, L. M. P.; COSTA FILHO, O. A.; ALVARENGA, K. D. F. **Maturação do sistema auditivo central em crianças ouvintes normais.** Pró-Fono Revista de Atualização Científica, v. 21, n. 2, p. 101–106, 2009.

WUNDERLICH, J. L.; CONE-WESSON, B. K.; SHEPHERD, R. **Maturation of the cortical auditory evoked potential in infants and young children.** Hearing Research, v. 212, n. 1–2, p. 185–202, 2006.

PROCEDÊNCIA DOS ENCAMINHAMENTOS À MATERNIDADE DO HC- FMB-UNESP DOS CASOS GRAVES E DE MORTE MATERNA ASSOCIADOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

Eduardo Minoru Nomura

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Botucatu, SP

Victoria de Carvalho Zaniolo

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Botucatu, SP

Ariel Althero Zambon

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Botucatu, SP

Ana Débora Souza Aguiar

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Botucatu, SP

Eduarda Baccari Ferrari

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Botucatu, SP

José Carlos Peraçoli

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp
Botucatu, SP

Correspondência - Rua Dr. Ranimiro Lotufo, 593,
ap14, bloco E, Vila São Judas Thadeu, Botucatu,
SP, Brazil

RESUMO: Objetivo: Determinar a frequência de casos graves e de morte materna, associados à hipertensão arterial, atendidos na Maternidade do HC-FMB-Unesp, no período de dois anos, identificando a origem e diagnóstico de encaminhamento. **Sujeitos e métodos:** Foram identificados, via busca no sistema de prontuário

eletrônico, todos os casos de gestantes ou puérperas com diagnóstico de hipertensão arterial, que receberam assistência obstétrica no biênio 2015/2016. Na população estudada se identificaram as seguintes variáveis: procedência, características demográficas, forma de manifestação da hipertensão arterial e sua gravidade e ocorrência de morte materna. Os resultados obtidos estão apresentados em porcentagem e ilustrados sob a forma de tabelas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-Unesp (CAAE: 59878116.1.0000.5411). **Resultados:** No biênio 2015/2016 foram internadas 4.338 mulheres na M-HC-FMB-Unesp para assistência ao parto, identificando-se 313 casos de hipertensão arterial, que corresponderam a 7,2% (39,9% classificadas como leve, 60,1% como grave). Analisando-se a subpopulação de gestantes hipertensas graves, destacam-se entre as características obstétricas: maior taxa de pré-termo (Leve: 11,2% vs Grave: 40,4%), de cesárea (Leve: 58,4% vs Grave: 72,9%) e de pré-eclâmpsia como forma de hipertensão arterial (Leve: 44,8% vs Grave: 73,4). A gravidade da hipertensão arterial se caracterizou por: valor da pressão arterial sistólica e/ou diastólica $\geq 160 \times 110 \text{ mmHg}$ (72,9%), proteinúria de 24hs $\geq 2 \text{ g}$ (30,9%) e sinais/sintomas de iminência de eclâmpsia (26%), destacando-se que estiveram presentes concomitantemente mais que um

dos parâmetros em 25% dos casos. Não houve caso de morte materna. A identificação da região e município de origem da população estudada mostra que, as gestantes são oriundas principalmente (72,9%) de duas sub-regiões (Polo Cuesta e Vale do Jurumirim) que compõem a DRS VI do estado de São Paulo. **Considerações:** O presente estudo fornece uma “fotografia” da origem dessas mulheres, que em 60,1% manifestaram sintomas e sinais que as caracterizaram estarem em situação de risco de morte. As sub-regiões Polo Cuesta e Vale do Jurumirim contribuíram com a maioria dos acasos da DRS VI do estado de São Paulo.

PALAVRAS CHAVE: gestação de alto risco, hipertensão arterial, morte materna.

ORIGIN OF THE HC-FMB-UNESP MATERNITY REFERRALS OF SEVERE CASES AND MATERNAL DEATH ASSOCIATED TO HYPERTENSION

ABSTRACT: Objective: To determine the frequency of cases of severe cases and maternal death, associated with arterial hypertension, attended at the HC-FMB-Unesp Maternity, in the period of two years, identifying the origin and diagnosis of referral. Subjects and methods: Through the search in the electronic medical record system, all cases of pregnant women or puerperal women diagnosed with arterial hypertension, who received obstetric care in the 2015/2016 biennium were identified. In the study population, the following variables were identified: city of origin, demographic characteristics, form of manifestation of hypertension and its severity and occurrence of maternal death. The results obtained are presented in percentages and are shown in the form of tables. The project was approved by the Research Ethics Committee of FMB-Unesp (CAAE: 59878116.1.0000.5411). Results: In the biennium 2015/2016, 4,338 women were admitted to the M-HC-FMB-Unesp for delivery assistance, with 313 cases of hypertension, which corresponded to 7.2% (39.9% classified as mild and 60,1% as severe). Considering the subpopulation of severe hypertensive pregnant women, the following were among the obstetric characteristics: higher preterm (Mild 11.2% vs Severe: 40.4%), cesarean section (Mild 58.4% vs. Severe: 72.9%) and pre-eclampsia as a form of hypertension (Mild: 44.8% vs Severe: 73.4). The severity of hypertension was characterized by: systolic and/or diastolic blood pressure $\geq 160 \times 110 \text{ mmHg}$ (72.9%), proteinuria of 24hs $\geq 2\text{g}$ (30.9%), and signs / symptoms of imminent eclampsia (26%), highlighting that more than one of the parameters were present concomitantly in 25% of the cases. There was no case of maternal death. The identification of the region and municipality of origin of the studied population shows that the pregnant women come mainly (72.9%) from two sub-regions (Polo Cuesta and Vale do Jurumirim) that make up the DRS VI of the state of São Paulo. Considerations: The present study provides a “picture” of the origin of these women, who in 60.1% had symptoms and signs that characterized them as being at risk of death. The Polo Cuesta and Vale do Jurumirim sub-regions contributed most of the cases of DRS VI in the state of São Paulo.

KEYWORDS: high risk gestation, hypertension, maternal death.

INTRODUÇÃO

Estima-se que 287.000 mortes maternas ocorreram em 2010 em todo o mundo. Apesar da redução substancial em comparação a 1990, muito tem que ser feito para alcançar uma das metas relevantes dos Objetivos de Desenvolvimento do Milénio propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2000, ou seja, a redução da mortalidade materna [OMS, 2012]. A maior porcentagem de mortes maternas acontece em países de baixa renda, porém a mortalidade materna ainda é um problema relevante de saúde pública nos países de média renda. Neste contexto, o aprimoramento dos sistemas e serviços de saúde para fornecer o melhor cuidado às mulheres durante a gestação e o parto é crucial, especialmente para aquelas mulheres que vivenciam complicações agudas [Campbell & Graham, 2006; Costello et al., 2006; Maine, 2007; US, 2012].

Entre 10% e 15% das mortes maternas estão relacionadas às doenças hipertensivas da gestação, sendo que destas, 10% são consequentes à eclâmpsia (Duley, 1992). Nos continentes asiático e africano cerca de um décimo de todas as mortes maternas decorrem de doenças hipertensivas da gestação, enquanto que um quarto das mesmas acontece na América Latina (Khan et al., 2006). No Brasil, a mortalidade materna em gestantes que desenvolvem eclâmpsia varia entre 8,2% e 15% (Neme & Mathias, 1970; Parpinelli et al., 1999). No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, referência da DRS VI do Estado de São Paulo, no período entre 1993 e 2002 a hipertensão arterial (pré-eclâmpsia) foi a principal causa (20,7%) de todas as mortes maternas e a principal causa das mortes diretas (50%) (Maestá et al., 2003). A maioria dessas mortes pode ser evitada pela assistência efetiva e no momento adequado às mulheres que apresentem essas complicações (Campbell & Graham, 2006).

Entre os tipos de hipertensão diagnosticados na gestação merece destaque uma de suas manifestações específicas, a pré-eclâmpsia, que se apresenta isolada ou associada à hipertensão arterial crônica. Segundo a literatura, essa forma de hipertensão é responsável pelos piores resultados maternos e perinatais (Roberts et al., 2003).

É importante ressaltar que, a hipertensão arterial pode persistir após o término da gestação ou surgir no período pós-parto, continuando assim a representar risco à saúde materna. Entre as mulheres que se mantêm hipertensas após o parto relatam-se complicações como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e insuficiência renal aguda (Ojogwu & Ofili, 1993).

Nas últimas décadas desenvolveu-se extensa pesquisa sobre a incidência, fatores de risco, patogenia, previsão, prevenção e controle da hipertensão gestacional e da pré-eclâmpsia (NHBPEP, 2000). Entretanto, são escassas as diretrizes para o controle de hipertensão pós-parto, o que muitas vezes resulta em diagnósticos imprecisos e tratamento incorreto (Ghuman et al., 2009) e existem poucos dados em relação à

avaliação, controle e complicações em mulheres que são reinternadas com diagnóstico de hipertensão pós-parto (Tan & Swiet, 2002; Magee & Sadeghi, 2005; Ghuman et al., 2009).

Cecatti et al. (2016), analisaram 9.555 casos de morbidade materna grave identificados entre 82.388 mulheres, que receberam assistência obstétrica em 27 maternidades de referência de todas as regiões do Brasil, no período de um ano. Identificaram 140 mortes e 770 casos de near miss materno, sendo a principal causa determinante da complicações materna a hipertensão arterial.

No sistema de saúde, o Hospital Terciário/Quaternário é peça chave nos resultados obtidos frente a casos graves ou raros presentes na população. É o centro de referência de recebimento de pacientes que apresentam situações graves que comprometem sua saúde e os colocam em risco de morte.

O sistema de saúde, em sua atenção primária e secundária, encontra na atenção terciária o respaldo para as situações que não conseguem fornecer uma resolução satisfatória.

Assim, a hierarquização do sistema de saúde, em níveis primário, secundário e terciário, é um modelo adequado e de sucesso para o bem-estar, em termos de saúde da população. Entretanto, muitas vezes essa hierarquia não é adequadamente aplicada e os serviços mais complexos recebem pacientes com problemas que poderiam ter sido solucionados em instâncias menos complexas, prejudicando o desempenho do serviço terciário. Esse fato determina sobrecarga de trabalho, uso indevido de profissionais e tecnologia mais qualificados, elevação de custos e falta de leitos para os centros de referência. Soma-se a essa situação o fato que a assistência precária, prestada no primeiro atendimento de um caso grave em nível de assistência primária ou secundária, coloca em risco o prognóstico do paciente.

JUSTIFICATIVA

A Maternidade do HC-FMB-Unesp é o único centro terciário/quaternário de referência para patologias obstétricas do Departamento Regional de Saúde VI (DRS VI) do Estado de São Paulo, que engloba 68 municípios e com uma população estimada de 1.880.000 habitantes. Assim, recebe solicitações de encaminhamento de gestantes portadoras de patologias que, se não forem aceitas podem ser fator determinante de morbidade e mortalidade dessas mulheres. Entre essas patologias destaca-se hipertensão arterial.

A análise do diagnóstico e situação dos casos encaminhados a essa Maternidade poderá refletir a situação da assistência às gestantes no sistema de saúde da DRS VI, fornecendo subsídios para intervenções que melhorem, nos locais de origem das pacientes, a qualidade da atenção à mulher no período da gestação, parto e puerpério. Essas intervenções permitirão um melhor prognóstico materno e fetal, reduzindo-se

assim o risco desse binômio.

OBJETIVO

Determinar a frequência de casos graves e de morte materna, associados à hipertensão arterial, encaminhados à Maternidade do HC-FMB-Unesp, no período de dois anos, identificando a origem, o diagnóstico e a gravidade dos casos.

SUJEITOS E MÉTODOS

Foram identificados e avaliados, por meio de busca no sistema de prontuário eletrônico do HC-FMB-Unesp, todos os casos de gestantes ou puérperas com diagnóstico de hipertensão arterial, que receberam assistência médica no serviço no período de 1º. de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2016.

Na população estudada foram identificadas as seguintes variáveis:

- Características demográficas
 - idade em anos (até 19 anos, 20 a 35 anos e acima de 35 anos)
 - raça (branca e não-branca)
 - estado civil (solteira e relacionamento estável)
 - paridade (nulípara, multípara – 2 a 5 partos e grande multípara – acima de 5 partos)
 - idade gestacional em semanas (pré-termo – inferior a 37 semanas e termo – igual ou maior que 37 semanas)
 - sub-área e município da Divisão Regional de Saúde VI de origem da paciente (Anexo 1)
- Forma de manifestação da hipertensão arterial
 - Hipertensão arterial crônica
 - Pré-eclâmpsia
 - Hipertensão gestacional
 - Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia
 - Gravidade – leve e grave
- Definições (NHBPEP, 2000, Tranquilli et al., 2014)
 - Hipertensão arterial: pressão arterial de pelo menos 140mmHg e/ou 90mmHg, avaliada após um período de repouso, com a paciente em posição sentada e manguito apropriado, considerando-se pressão diastólica o valor obtido no desaparecimento da bulha cardíaca (5º som de Korotkoff). Na falta de manguito apropriado usou-se tabela de correção da pressão arterial segundo a circunferência do braço da paciente.

- Proteinúria: presença de pelo menos uma cruz de proteína em amostra de urina ou 300mg em urina de 24 horas.
- Hipertensão arterial crônica (HAC): quando há história de hipertensão arterial, de qualquer etiologia, anterior à gestação ou registro de pressão arterial de pelo menos 140x90mmHg antes da 20^a semana de gestação.
- Pré-eclâmpsia (PE): quando na ausência de história de hipertensão arterial anterior à gestação, a hipertensão arterial, associada à proteinúria, se manifesta após a 20^a semana de gestação. Também foi considerada pré-eclâmpsia quando, mesmo na ausência de proteinúria ocorrerem outras disfunções de órgãos maternos (insuficiência renal, comprometimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção uteroplacentária ou restrição de crescimento fetal).
- Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia (HAC+PE): quando na presença de HAC, após a 20^a semana de gestação, ocorre exacerbação brusca do valor da pressão arterial e/ou aparecimento de proteinúria/exacerbação do valor de proteinúria prévia.
- Hipertensão gestacional: quando na ausência de história de hipertensão arterial anterior à gestação, a hipertensão arterial, sem proteinúria, se manifesta após a 20^a semana de gestação.
- Hipertensão arterial grave: quando presente pelo menos uma das situações abaixo:
 - pressão arterial de pelo menos 160mmHg e/ou 110mmHg, confirmada em duas medidas, com intervalo de 10 a 15 minutos
 - proteinúria de pelo menos 2g em urina de 24 horas
 - sintomas de eclâmpsia iminente – manifestação clínica do sistema nervoso central (cefaléia, obnubilação, torpor, alteração de comportamento), visual (escotoma, fosfena, fotofobia, turvação/embaçamento) e gástrica (dor epigástrica ou no hipocôndrio direito, náusea, vômito)
 - eclâmpsia: manifestação de crise convulsiva e/ou coma, na ausência de patologia do sistema nervoso central
 - síndrome HELLP: presença de hemólise (anemia, bilirrubina total acima de 1,2mg%, haptoglobina ≤ 0,3g/L ou desidrogenase lática ≥ 600UI/L), aumento da concentração de enzimas hepáticas (TGO e/ou TGP ≥ 70UI/L e/ou desidrogenase lática ≥ 600UI/L) e plaquetopenia (contagem inferior a 100.000 por mm³)
 - oligúria: diurese inferior a 500mL em 24 horas
 - cianose
 - edema agudo de pulmão

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos estão apresentados em porcentagem e ilustrados sob a

forma de tabelas.

ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-Unesp e recebeu o parecer CAAE: 59878116.1.0000.5411.

RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES

A Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (M-HC-FMB) é referência em gestação de alto risco para 68 municípios da Divisão Regional de Saúde 6 (DRS-6) do Estado de São Paulo, com uma população de cerca de

1.800.000 habitantes.

No biênio 2015/2016 foram internadas 4.338 mulheres na M-HC-FMB para assistência ao parto, identificando-se 313 casos de hipertensão arterial, que corresponderam a 7,2% dessas internações. Dentre as gestantes hipertensas 125 (39,9%) foram classificadas como leve e 188 (60,1%) como grave.

As características demográficas da população estudada encontram-se na Tabela 1. Verificamos predomínio da faixa etária entre 20 e 35 anos (69,61%) com 16% de parturientes adolescentes, da raça branca (76,7%), união estável (73,2%) e de parturientes procedentes de outros municípios da Divisão Regional de Saúde VI (62,6%), quando se exclui o município de Botucatu.

Na Tabela 2 encontram-se as características obstétricas da população estudada. Verificamos distribuição semelhante entre nulíparas (47%) e multíparas (53%), predomínio de gestação a termo (71,2%), via de parto cesárea (67,1%), das formas de hipertensão decorrentes da gestação (62% de pré-clâmpsia, 18,9% de hipertensão gestacional e 14,3% de hipertensão arterial crônica sobreposta por pré-clâmpsia).

As características demográficas da população estudada, segundo os critérios de classificação da hipertensão arterial em leve e grave, encontram-se na Tabela 3. Observamos que os parâmetros analisados apresentam distribuição semelhante à da população quando analisada como um todo.

Na Tabela 04 encontram-se as características obstétricas da população estudada, segundo a gravidade da manifestação da hipertensão arterial (leve e grave). Destacamos a maior taxa de nascimentos pré-termo (Leve: 11,2% vs Grave: 40,4%), de resolução de gestação por cesárea (Leve: 58,4% vs Grave: 72,9%) e de pré-eclâmpsia como forma de manifestação da hipertensão arterial (Leve: 44,8% vs Grave: 73,4). A hipertensão gestacional foi a forma de manifestação da hipertensão arterial (Leve: 34,4% vs Grave: 8,5%) mais frequente nos casos leve.

A gravidade da hipertensão arterial se identifica pela presença de um ou mais dos parâmetros avaliados na Tabela 5. Verificamos que os mais comuns foram

valor da hipertensão arterial sistólica e diastólica igual ou maior que 160x110mmHg (72,9%), proteinúria de 24hs igual ou maior que dois gramas (30,9%) e sinais/sintomas que caracterizam a iminência de eclâmpsia (26%). Merece destaque que, estiveram presentes concomitantemente mais que um dos parâmetros em 25% dos casos.

Valores de exames laboratoriais caracterizam alguns parâmetros de gravidade da hipertensão arterial como a proteinúria de 24 horas e a síndrome HELLP (anemia, alteração de enzimas hepáticos e trombocitopenia) e encontram-se na Tabela 6. Verificamos queda dos valores de hematócrito (28,7% dos casos), de hemoglobina (11,7% dos casos) e da contagem de plaquetas (4,3% dos casos). Por outro lado, ocorreu aumento da concentração dos valores séricos de uréia (47,3%), de creatinina (3,2%), de ácido úrico (30,9%), de TGO (9,6%), de TGP (10,6%), de bilirrubina total (3,7%) e de DHL (6,4%). A proteinúria, marcador clássico do diagnóstico de pré-eclâmpsia, esteve presente em 30,9% dos casos, apresentando variação entre 300mg e 36g em urina de 24 horas.

Na Tabela 7 encontram-se as condições ameaçadoras de vida (potencialmente fatais) relativas à hipertensão arterial na gestação. Verificamos que dos casos de hipertensão arterial grave 60,3% se encontravam nessa situação, destacando-se a situação de pré-eclâmpsia grave (88,3%). Não período analisado não houve morte materna decorrente de hipertensão arterial.

A identificação da região e município de origem da população estudada encontra-se na tabela 8 (todos os casos com diagnóstico de hipertensão arterial) e na Tabela 9 (casos graves de hipertensão arterial). As pacientes do presente estudo são oriundas de quatro das cinco regiões que compõem a DRS VI do estado de São Paulo (Polo Cuesta, Vale do Jurumirim, Bauru, Lins e Jaú), não havendo caso da região de Lins. Da região Polo Cuesta procederam pacientes de todos os seus municípios, correspondendo a 245 pacientes (78,3% dos casos), merecendo destaque os municípios de Botucatu (47,3%), São Manuel (15,1%) e Itatinga (9%). Da região Vale do Jurumirim procederam pacientes de todos os seus municípios, com número de casos semelhantes, contribuindo com 18,9% dos casos, destacando-se os municípios de Avaré (11,8%), Fartura (11,8%), Paranapanema (11,8%), Itaí (10,2%) Pirajú (10,2%) e Taguaí (10,2%).

Quando se analisa apenas as pacientes portadoras de hipertensão grave, segundo a região de sua procedência e considerando-se que, a região de Lins não referenciou pacientes, todos os municípios região Polo Cuesta referenciaram pacientes, correspondendo a 137 pacientes (72,9% dos casos), merecendo destaque os municípios de Botucatu (46,8%), São Manuel (16,2%) e Itatinga (8%). Da região Vale do Jurumirim procederam pacientes de quase todos os municípios, correspondendo a 23,9% dos casos. Merecerem destaque os municípios de Avaré, Fartura, Itaí e Taguaí que contribuíram, igualmente, com 11,1% dos casos.

Características		n	%
Idade (anos)	< 20	50	16,0
	20 a 35	218	69,6
	> 35	45	14,4
Raça	Branca	240	76,7
	Não branca	73	23,3
Estado civil	União estável	229	73,2
	Solteira	84	26,8
Procedência	Botucatu	117	37,4
	DRS VI	196	62,6

Tabela 1. Número e percentagem das características demográficas da população estudada.

Características		n	%
Paridade	Nulípara	147	47,0
	Multípara	166	53,0
Idade gestacional na resolução gestação	Pré-termo	90	28,8
	Termo	223	71,2
Tipo de parto	Vaginal	103	32,9
	Cesárea	210	67,1
Condições do recém-nascido	Nativivo	309	98,7
	Natimorto	04	1,3
Tipo de Hipertensão arterial	HAC	15	4,8
	Hipertensão gestacional	59	18,9
	Pré-eclâmpsia	194	62,0
Gravidade da hipertensão arterial	HAC+PE	45	14,3
	Leve	125	39,9
	Grave	188	60,1
Condições potencialmente fatais	Sim	159	50,8
	Não	154	49,2

Tabela 2. Número e percentagem das características obstétricas da população estudada.

HAC: hipertensão arterial crônica

Leve (n: 125)			Grave (n: 188)		
Características	n	%	n	%	
Idade (anos)	14	11,2	36	19,2	
	89	71,2	130	69,1	
	22	17,6	22	11,7	
Raça	89	71,2	151	80,3	
	36	28,8	37	19,7	
Estado civil	90	72,0	139	73,9	
	35	28,0	49	26,1	
Procedência	53	42,4	63	33,5	
	72	57,6	125	66,5	

Tabela 3. Número e percentagem das características demográficas da população estudada, segundo a forma de manifestação leve e grave da hipertensão arterial.

Leve (n: 125)				Grave (n: 188)	
Características		n	%	n	%
Paridade	Nulípara	58	46,4	89	47,3
	Multipara	67	53,6	99	52,7
Idade gestacional na resolução gestação	Pré-termo	14	11,2	76	40,4
	Termo	111	88,8	112	59,6
Tipo de parto	Vaginal	52	41,6	51	27,1
	Cesárea	73	58,4	137	72,9
Condições do recém-nascido	Nativivo	125	100,0	184	97,9
	Natimorto	0	---	04	2,1
Tipo de Hipertensão arterial	HAC	12	09,6	03	1,6
	HG	43	34,4	16	8,5
	Pré-eclâmpsia	56	44,8	138	73,4
	HAC+PE	14	11,2	31	16,5

Tabela 4. Número e percentagem das características obstétricas da população estudada, segundo a gravidade da manifestação da hipertensão arterial (leve e grave).

Características		n	%
Parâmetro de gravidade	PA \geq 160x110mmHg	137	72,9
	Proteinúria \geq 2g/24 horas	58	30,9
	Iminência de eclâmpsia	49	26,0
	Eclâmpsia	06	3,2
	Síndrome HELLP parcial	12	6,4
	Síndrome HELLP	07	3,7
	DPP	09	4,8
	Mais que um dos parâmetros	47	25,0

Tabela 5. Número e percentagem dos parâmetros que caracterizam a hipertensão arterial grave da população estudada.

DPP: descolamento prematuro de placenta

Exame laboratorial		N	%
Hematórito (%)	< 35	54	28,7
Hemoglobina (mg%)	< 11	22	11,7
No. plaquetas/mm3	< 100.000	08	4,3
Uréia (mg%)	\geq 20	89	47,3
Creatinina (mg%)	\geq 1,0	06	3,2
Ácido úrico (mg%)	\geq 6,0	58	30,9
Proteinúria (g/24 hs)	\geq 2	58	30,9
TGO (UI/L)	\geq 70	18	9,6
TGP (UI/L)	\geq 70	20	10,6
Bilirrubina total (mg/dL)	\geq 1,2	07	3,7
DHL (UI/L)	\geq 1200	12	6,4

Tabela 6. Número e percentagem dos valores laboratoriais específicos para identificação da gravidade da hipertensão arterial da população estudada.

Condições		N	%
Distúrbios hipertensivos	Pré-eclâmpsia grave	166	88,3
	Eclâmpsia	06	3,2
	Encefalopatia hipertensiva	--	--
	Síndrome HELLP	07	3,7
Distúrbios hemorrágicos	DPP	09	4,8
	Hemorragia pós-parto	01	0,5
	Rotura uterina	--	--

Tabela 7. Presença de condições potencialmente fatais na população estudada.

Sub-área	Município	N	%
Polo Cuesta	Anhembi	06	2,4
	Areiópolis	11	4,5
	Bofete	11	4,5
	Botucatu	116	47,3
	Conchas	09	3,8
	Itatinga	22	9,0
	Laranjal Paulista	05	2,0
	Pardinho	08	3,3
	Pereiras	10	4,1
	Porangaba	04	1,6
Vale do Jurumirim	Pratânia	04	1,6
	São Manuel	37	15,1
	Torre de Pedra	02	0,8
	Total	245	78,3
	Avaré	07	11,8
	Arandú	01	1,7
	Cerqueira César	03	5,1
	Barão de Antonina	01	1,7
	Coronel Macedo	01	1,7
	Fartura	07	11,8
Bauru	Holambra	01	1,7
	Iaras	02	3,4
	Itaporanga	04	6,8
	Itaí	06	10,2
	Paranapanema	07	11,8
	Piraju	06	10,2
	Sarutaiá	02	3,4
	Taguaí	06	10,2
	Taquarituba	04	6,8
	Tejupá	01	1,7
Jaú	Total	59	18,9
	Bauru	01	33,3
	Lençóis Paulista	01	33,3
	Pirajuí	01	33,3
Jaú	Total	03	0,9
	Bariri	01	25,0

	Barra Bonita	01	25,0
	Itapuí	01	25,0
	Jaú	01	25,0
	Total	04	1,3
Outra	Franca	01	33,3
	Taquaritinga	01	33,3
	Total	02	0,6

Tabela 8. Número e percentagem de casos de hipertensão arterial segundo a procedência das gestantes hipertensas estratificadas pela sub-área da Divisão Regional de Saúde VI.

Sub-área	Município	n	%
Polo Cuesta	Anhembi	03	2,1
	Areiópolis	07	5,1
	Bofete	03	2,1
	Botucatu	64	46,8
	Conchas	07	5,1
	Itatinga	11	8,0
	Laranjal Paulista	04	2,9
	Pardinho	03	2,1
	Pereiras	05	3,7
	Porangaba	03	2,1
	Pratânia	03	2,1
	São Manuel	22	16,2
	Torre de Pedra	02	1,5
	Total	137	72,9
Vale do Jurumirim	Arandú	01	2,2
	Avaré	05	11,1
	Barão de Antonina	01	2,2
	Cerqueira César	02	4,4
	Coronel Macedo	--	--
	Fartura	05	11,1
	Holambra	01	2,2
	Iaras	02	4,4
	Itaporanga	03	6,8
	Itaí	05	11,1
	Paranapanema	04	8,9
	Piraju	04	8,9
	Sarutaiá	02	4,4
	Taguaí	05	11,1
	Taquarituba	04	8,9
	Tejupá	01	2,2
	Total	45	23,9
Jaú	Bariri	01	25,0
	Barra Bonita	01	25,0
	Itapuí	01	25,0
	Jaú	01	25,0
	Total	04	2,1

Outra	Franca	01	50,0
	Taquaritinga	01	50,0
	Total	02	1,1,

Tabela 9. Número e percentagem de casos de hipertensão arterial grave segundo a procedência das gestantes hipertensas graves estratificadas pela sub-área da Divisão Regional de Saúde VI.

A Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp é centro de referência para gestações de alto risco de duas (Polo Cuesta e Vale do Jurumirim) das cinco sub-áreas da Divisão Regional de Saúde 6 (DRS-6) do Estado de São Paulo.

A hipertensão arterial, em suas diferentes formas de manifestação, é a intercorrência clínica mais frequente dessa Maternidade e assim, como ocorre na esfera mundial, é a causa mais importante de morbimortalidade materna e perinatal.

O presente estudo fornece uma “fotografia” da origem dessas mulheres, que em 60,1% manifestaram sintomas e sinais que as caracterizaram estarem em situação de risco de morte.

Considerando que, por estar essa Maternidade vinculada a uma instituição de ensino, com importante papel na assistência e na formação de seus egressos (graduação e pós-graduação lato senso), os resultados obtidos podem servir de referência para que, na formação de recursos humanos se enfoque o conhecimento teórico e prático das síndromes hipertensivas da gestação e, junto as sub-regiões “Polo Cuesta” e “Vale do Jurumirim” se proponham ações no sentido de se aprimorar a assistência pré-natal por elas oferecidas e assim, reduzirmos as taxa de casos graves, o que reduzirá as taxa de risco de morte.

É fundamental ressaltarmos que, segundo a OMS, a maioria dessas mortes é evitável pela assistência efetiva e no momento adequado.

REFERÊNCIAS

Campbell OM, Graham WJ; Lancet Maternal Survival Series steering group. Strategies for reducing maternal mortality: getting on with what works. Lancet. 2006; 368:1284–99.

Cecatti JG, Costa ML, Haddad SM, Parpinelli MA, Souza JP, Sousa MH, Surita FG, Pinto e Silva JL, Pacagnella RC, Passini Jr R, for the Brazilian Network for Surveillance of Severe Maternal Morbidity Study Group. Network for Surveillance of Severe Maternal Morbidity: a powerful national collaboration generating data on maternal health outcomes and care. Br J Obstet Gynaecol. 2016; 123:946–53.

Costello A, Azad K, Barnett S. An alternative strategy to reduce maternal mortality. Lancet. 2006; 368: 1477–9.

Duley L. Maternal mortality associated with hypertensive disorders of pregnancy in Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. Br J Obstet Gynaecol. 1992; 99:547-53.

Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal

death: a systematic review. Lancet. 2006; 367:1066–74.

Maestá I, Rudge CVC, Pérez CD, Peraçoli JC, Rudge MVC. Características demográficas e causas das mortes maternas do Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP, 1993-2002. Anais do 50º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, Recife – PE, 2003, pg 256.

Maine D. Detours and shortcuts on the road to maternal mortality reduction. Lancet. 2007; 370: 1380–2.

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000;183:S1-S22.

Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension during Pregnancy. Hypertens Pregnancy. 2003; 22:109-27.

Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. Pregnancy Hypertens. 2014; 4:97-104.

United Nations. Global Strategy for Women's and Children's Health. New York: United Nations, 2010 (World Health Organization website. Available:http://www.who.int/pmnch/topics/maternal/201009_globalstrategy_wch/en/index.html. Accessed 2012 Aug 3).

World Health Organization, UNICEF, UNFPA and the World Bank. Trends in maternal mortality: 1990 to 2010. Geneva: World Health Organization, 2012.

Anexo 1. Distribuição dos municípios da Divisão Regional de Saúde VI (DRS VI) do estado de São Paulo



SERIA A ANESTESIA UMA INTERFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE ELETROACUPUNTURA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Strongyloides venezuelensis*?

Maria Teresa da Silva Bispo

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde,
UFMT- Universidade Federal de Mato Grosso,
Avenida Valdon Varjão, nº 6.390. CEP: 78600-000
Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil.

Luana dos Anjos Ramos

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde,
UFMT- Universidade Federal de Mato Grosso,
Avenida Valdon Varjão, nº 6.390. CEP: 78600-000
Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil.

RESUMO: A acupuntura é uma técnica de tratamento por punturação em pontos específicos que vem sendo estudada experimentalmente a fim de se entender e comprovar sua eficácia. Diante dos resultados publicados, a acupuntura vem sendo experimentalmente testada para o tratamento de parasitoses como a Estrongiloidíase. Sendo de grande importância a escolha do anestésico a ser utilizado durante o tratamento experimental - para minimizar o estresse animal sem interferir nos resultados - o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da anestesia sobre o tratamento com eletroacupuntura - no ponto E36 (*Zusanli*) - de camundongos infectados com aproximadamente 2.000 larvas de *Strongyloides venezuelensis*. Trinta e quatro camundongos machos, pesando entre 25g e 50g, foram

separados em 4 grupos: Sem anestesia; anestesiados com Acepran+Ketamina; com Xilazina+Ketamina e com Acepran+Xilazina. Dados como consumo de água e ração, o peso dos animais e das fezes e contagem de ovos por grama de fezes, foram coletados de 3/3 dias (dia 0 – controle – pré-infecção; 3º, 6º, 9º, 12º e 15º dpi – dias após a infecção). Nesses dias também foram feitos os tratamentos por eletroacupuntura no acuponto E36. No 15º dpi, os animais foram mortos por aprofundamento da anestesia e feita a retirada do intestino para contagem de vermes. Observou-se que a anestesia com Xilazina+Ketamina não interferiu nos parâmetros analisados, quando comparado ao grupo não anestesiado. Assim conclui-se que a anestesia com Xilazina+Ketamina pode ser utilizada durante o tratamento experimental por eletroacupuntura da infecção por *Strongyloides venezuelensis*, em camundongos, pois não interfere no mesmo.

PALAVRAS-CHAVE: *Strongyloides venezuelensis*; Anestesia; Eletroacupuntura; Acuponto E36; Oviposição.

ABSTRACT: Acupuncture is a treatment by puncturing technique in specifics body marks denominated acupoints, which has been experimentally studied in purpose to understand and verify its effectiveness. Considering the published results, acupuncture has been

experimentally tested for the treatment of parasitic diseases such as Strongyloidiasis. Being of great importance the choice of anesthetic to be used during the experimental treatment, to minimize animal stress without interfering in the results, the objective of this study was to analyze the effect of anesthesia on the treatment with electroacupuncture at point E36 (Zuzanli). Thirty-four male mice, weighing between 25g and 50g were divided into four groups: Without Anesthesia; Anesthetized with Acepran+Ketamine; with Xylazine+Ketamine and with Acepran+Xylazine. Datas as water and food intake, animals and feces weight, and eggs per gram of feces were collected on days 0 (day zero – control – before infection), 3th dpi (days post infection), 6th dpi, 9th dpi, 12th dpi and 15th dpi. In those days were made the treatment through the electrical stimulation in acupoint E36. At the 15th dpi the animals were killed by deepening anesthesia and the small intestine was removed for worms counting. It was analyzed parameters when compared to the non-anesthetized group. Thus, it is concluded that Xylazine+Ketamine anesthesia can be used during the experimental treatment by electroacupuncture of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice since it does not interfere with it.

KEYWORDS: *Strongyloides venezuelensis*; Anesthesia; Electroacupuncture; Acupoint E36; Oviposition.

1 | INTRODUÇÃO

Anestésicos

Esta classe de fármacos vem sendo utilizados desde antes da descoberta de seus efeitos no organismo para alívio de dores e desconfortos (CARVALHO, 1994). Uns dos primeiros anestésicos foram a cocaína, utilizada para substituição da morfina que causava uma grande dependência em seus usuários (FERREIRA e MARTINI, 2001) e o ópio, que promovia anestesia por inalação em procedimentos cirúrgicos (DUARTE, 2005), hoje consideradas drogas ilegais. Contudo, através delas pode-se extrair outras substâncias, como a morfina e a lidocaína, consideradas anestésicas (CARVALHO, 1994; FERREIRA e MARTINI, 2001; DUARTE, 2005). Não obstante, com o passar dos anos, os anestésicos foram sendo melhorados pela indústria farmacêutica devido à sintetização de substâncias opioides, podendo assim agir localmente ou sistemicamente, com base na dose administrada (ALVES e BRAZ, 2002; PASIN e SCHNATH, 2007; MANICA, 2009). A partir do conhecimento dos efeitos e com o auxílio da anatomia comparada os anestésicos foram integrados às práticas de ciência que envolvem procedimentos cirúrgicos e experimentais em animais para se atingir um grau razoável de relaxamento muscular para facilitar a cirurgia e, principalmente, produzir analgesia suficiente a fim de que o animal não sofra mantendo-se assim, o zelo e respeito pela ética na experimentação animal (SCHANAIDER e SILVA, 2004; ANDRADE et al., 2006; JORDAN e WRIGHT, 2010).

Acupuntura

A acupuntura era antigamente um conjunto de métodos empíricos utilizados por vários povoados e passados durante as gerações. O primeiro registro foi um tratado feito há 5.000 anos que reunia todos os conhecimentos que circulavam na China na época (MANN, 1994). Esse tratado auxiliou na disseminação das técnicas de acupuntura que viria a ser difundida e transformada em ciência, ainda que sua chegada no Ocidente tenha provocado dúvidas quanto a aplicação e eficácia do tratamento (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001; WEN, 2006). Com o avanço nas pesquisas envolvendo acupuntura foi possível começar a compreender os mecanismos utilizados e os efeitos obtidos, assim como a descoberta da interferência em outros sistemas como o imunológico (WEN, 2006). A acupuntura pode gerar propriedades analgésicas, a efeitos no sistema cardiovascular, aparelho locomotor e trato gastrintestinal. Neste último, a acupuntura em determinados pontos atua na contratilidade gástrica, peristaltismo, motilidade intestinal, modulação da resposta imunológica e melhora na dispepsia, com um resultado positivo e menor desconforto, já que o uso de fármacos pode provocar efeitos colaterais muitas vezes desagradáveis (SMART et al., 1986; DILL, 1992; JOAQUIM, 2003; PILLA et al., 2008; ANJOS-RAMOS, 2015). Para o estudo mais aprofundado dos seus efeitos, tem se optado pela experimentação animal em acupuntura. Esses experimentos geralmente são feitos sob o efeito de anestésicos, para diminuir o estresse animal e facilitar a imobilização do mesmo para o tratamento. Entretanto, apesar da utilização em larga escala, a literatura científica não tem se atido ao fato de que os mesmos podem vir a alterar os resultados obtidos.

Estrongiloidíase

A Estrongiloidíase é uma parasitose causada pelo nematodo do gênero *Strongyloides* e a espécie *Strongyloides stercoralis* é a responsável pela infecção humana (SCHAD, 1989). Possui grande distribuição mundial com maior incidência em regiões com clima tropical. No Brasil, considerado um país tropical, essa infecção parasitária torna-se um importante problema de saúde e que é descuidada e negligenciada socialmente, podendo gerar situações de hiperinfecção da doença ou sua disseminação no organismo do paciente (SUDRÉ et al., 2006; PAULA e COSTA-CRUZ, 2011). Relatada por Bavay em 1876, essa espécie apresenta um ciclo bastante complexo podendo se desenvolver em meio externo e no hospedeiro. Para investigações científicas a espécie *Strongyloides venezuelensis* é uma das frequentemente utilizadas em roedores (TAKAMURE, 1995). Através das pesquisas feitas é possível conhecer gradualmente a relevância da resposta imune na expulsão das larvas no organismo por meio das interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10), eosinófilos, mastócitos e resposta Th2, as quais contribuem para a eliminação, alterações morfológicas do parasita (KHAN et al., 1993; GONÇALVES et al., 2010; MARRA et al., 2010), entre outros. Os

fármacos anti-helmínticos são utilizados como tratamento (HUGGINS et al., 2001), ainda que alguns apresentem efeitos colaterais. Recentemente, surgiu a expectativa de tratamento através da Eletroacupuntura e, ainda que apresente efeitos diferentes entre os pontos estudados (Anjos-Ramos, 2015), é uma nova vertente a ser incentivada na pesquisa científica já que são poucas as pesquisas que relacionam acupuntura e parasitismo, o que auxiliaria para melhor entender os efeitos da acupuntura em organismos parasitados.

Na escolha de um anestésico em uma experimentação animal é importante se levar em consideração o mecanismo de ação e as interações que podem ocorrer com os parâmetros a serem analisados, ademais do custo e viabilidade. As classes de anestésicos promovem diferentes resultados e suas interações não são detalhadamente descritas para tratamentos por acupuntura. Assim, tornam-se relevantes e necessárias as pesquisas que relatam essa interação, pois grande parte não descreve o uso dos anestésicos em sua metodologia, o que fomenta dúvidas se há ou não interferência desse fármaco, e em quais pontos ou tratamentos o anestésico poderia causar alguma alteração nos resultados obtidos pela acupuntura científica.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados um total de 34 camundongos (*Mus musculus*) machos (uma vez que os hormônios sexuais femininos podem interferir na oviposição em algumas parasitoses) (KLEIN, 2000; RIVERO et al., 2002) jovens, entre 5 e 6 semanas, pesando entre 25 e 50g, provenientes do Centro de Manutenção de Animais de Experimentação (CMAE) da Universidade Federal de Mato Grosso e, mantidos no Laboratório de Acupuntura Científica e Investigações Infecto-Morfológicas (LACIIM) com condições de umidade e temperatura adequados; e água e ração ad libitum, durante os experimentos. O Projeto foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA) da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT (n. 23108.002959/13-3). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: anestesiados com a associação de Xilazina+Ketamina (n=9); anestesiado com Acepran+Ketamina (n=10); anestesiado com Acepran+Xilazina (n=5) e grupo sem anestesia (n=10), todos infectados e tratados em acuponto E36.

Inicialmente, os animais foram vermifugados com ivermectina (Ivomec®) diluído em água (3,5mL/500mL) durante 7 dias. Após um intervalo de mais 7 dias para que a vermiculação não interferisse no experimento e para adaptação dos animais em seus grupos, decorreu a infecção. Coletou-se dos grupos o consumo de água e ração, o peso dos animais e o peso das fezes, das quais foram retiradas 3 amostras de 2,0 gramas cada, para a contagem de ovos, no dia 0 (dia zero – controle – dia da

infecção), 3º dpi (dias após infecção), 6º dpi, 9º dpi, 12º dpi e 15º dpi. Nesses dias aconteceu o tratamento com eletroacupuntura. No 15º dpi os animais foram mortos por aprofundamento da anestesia e realizou-se laparotomia para retirada de vermes do Intestino Delgado (ID).

Parasito e técnicas parasitológicas

A cepa de *S. venezuelensis* utilizada na pesquisa foi oriunda do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, mantida em laboratório desde 1987. A mesma cepa está sendo mantida em Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) no LACIIM – CUA/UFMT, para os experimentos. Por meio de ovos presentes nas fezes dos Gerbilos infectados foi realizada uma coprocultura que foi deixada por um período mínimo de 72 horas em uma incubadora a 27°C. Após esse período, foi utilizada a técnica de Baermann modificada por Moraes (1948) para a recuperação das larvas infectantes por meio de decantação (NEVES et al., 2011). Posteriormente, as larvas foram lavadas, centrifugadas durante 3 minutos (3.000 rotações por minuto) por 3 vezes e fixadas 20 µL da solução com as larvas L3 para contagem e estimativa do número de larvas para infecção. Após a contagem, foram inoculadas aproximadamente 2.000 larvas por via subcutânea em cada camundongo.

Para realizar a contagem de ovos, as fezes de cada grupo foram separadas em um total de três amostras de cada. Essa coleta foi realizada nos dias experimentais (3/3 dias). Para cada amostra utilizou-se 2,0 gramas de fezes e 28 ml de solução saturada, que foram homogeneizadas. A contagem foi efetuada na câmara de McMaster, observando-se os gradeados da câmara, em um aumento de 10 vezes no Microscópio Biológico Binocular LED 1600X LM2100B LUMEN®. Em seguida, calculou-se a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG).

Após a morte dos animais ocorreu a laparotomia, através da qual por uma incisão na linha mediana obteve-se acesso à cavidade abdominal, para a retirada do ID dos animais. Executou-se um corte longitudinal no ID para que a migração das larvas fêmeas adultas (L5) para a placa de Petri acontecesse pelo método de Baermann-Moraes (1948). A recuperação desses vermes no ID durou cerca de 3 horas para que após esse procedimento as larvas obtidas fossem fixadas em formaldeído 10% e, posteriormente, contadas.

Tratamento por Acupuntura e Administração dos Anestésicos

O tratamento de acupuntura aconteceu no 3º dpi, 6º dpi, 9º dpi, 12º dpi e 15º dpi após uma tricotomia dos pelos para melhor acesso ao acuponto. Com base em conhecimentos anatômicos e os indicados pela literatura, foi utilizada uma caneta localizadora de pontos (Acupontoscópio Eletrônico Múltiplo), e assim o ponto pode ser marcado nos camundongos. A eletroacupuntura foi feita por eletroestimulador FesVif 995 QUARK® no acuponto E36 (Zusanli - Estômago 36), localizado abaixo e

lateralmente à patela, à margem lateral da tíbia, e a estimulação teve duração de 15 minutos.

Os animais receberam uma dose via intraperitoneal dos anestésicos, referentes a cada grupo, correspondente ao seu peso nos dias de tratamento. A dose de Acepromazina (Acepran®) foi de 0,2 ml/1000g, enquanto a dose de Xilazina (Anasedan®) foi de 1 mL/1000g e Ketamina (Ketamin®) 0,75mL/1000g. As doses foram calculadas a partir de protocolos já testados anteriormente em outras pesquisas e adequados em experimentos pilotos para que se obtivesse boa sedação (DAMY et al., 2010).

Parâmetros Morfométricos

Após a morte dos animais, foi feita a laparotomia, por uma incisão na linha mediana obteve-se acesso à cavidade abdominal. O ID foi separado e em seguida foram feitas as medidas do comprimento do ID, comprimento e espessura do duodeno. Foram utilizados fita métrica e Paquímetro Digital 150mm Black Bulc® para maior precisão.

Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (SEM). Para comparação dos valores médios dos parâmetros foram empregados Análise de Variância (ANOVA), seguidos de Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, com limite de significância estatística até 5% ($p < 0,05$).

3 | RESULTADOS

Durante o decorrer do experimento podemos observar que todos os grupos apresentam uma redução de peso (Figura 1) nos primeiros dias de parasitose, e que os grupos Acepran+Xilazina, Xilazina+Ketamina e Sem Anestesia apresentam um aumento no último dia, indicando o fim da doença que ocorre nessa espécie. Isso em comparação com o peso no dia de infecção, considerado peso inicial (PI). Porém só podemos notar uma diferença significativa no grupo Sem Anestesia, que pode estar associada tanto ao fim da Estrongiloidíase como ao tratamento de EA, que promovem essa alteração no peso já descrita na literatura.

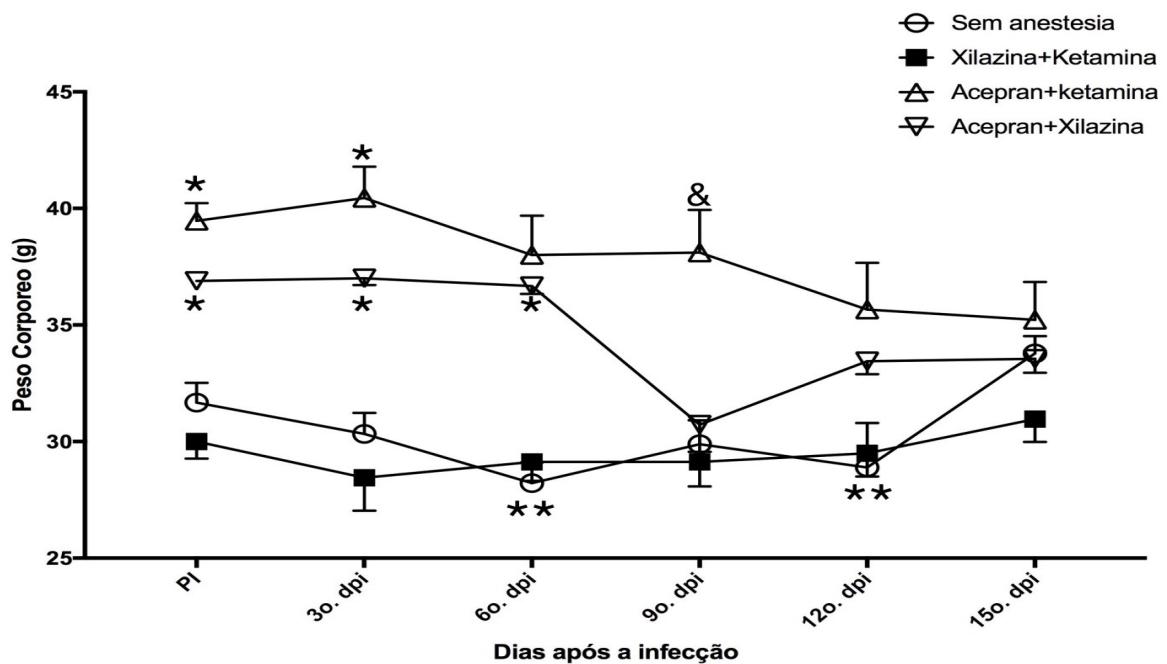


Figura 1: Peso corpóreo dos animais submetidos ao tratamento (Média ± erro padrão)

*p<0,05 PI, 3º e 6º dpi vs 12º e 15º dpi; **p<0,05 6º e 12º dpi vs 15º dpi grupo sem anestesia; &p<0,05 9º dpi do grupo anestesiado com Acepran+Ketamina vs o 9º dpi dos demais grupos no mesmo dia. (ANOVA; pós-teste de Tukey).

Com a realização da coleta das medidas de consumo podemos notar um padrão diferente em se tratando de níveis instáveis para o consumo de ração (Figura 2 A) e estáveis para água (Figura 2 B). Entretanto, o grupo anestesiado com Acepran+Ketamina mostrou um consumo maior de ingestão de água no 9º dpi. As mesmas diferenças são demonstradas pelas tabelas 1 e 2, onde conseguimos observar que no 9º dpi o grupo Acepran+Ketamina apresenta uma diferença significativa do 3º dpi do mesmo grupo na verificação da ingestão de água.

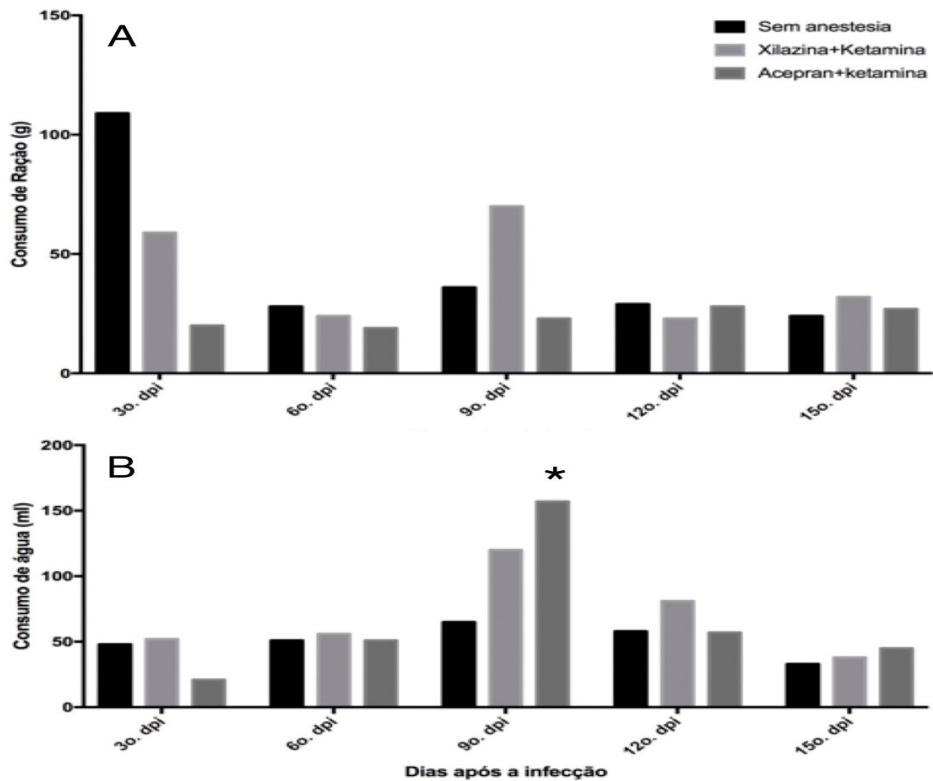


Figura 2: Consumo de ração (A) e água (B) dos animais submetidos ao tratamento

*p<0,05 9º dpi vs o 3ºdpi, grupo Acepran+Ketamina. (ANOVA; pós-teste de Tukey).

Grupos	Dias de Tratamento				
	3º dpi	6º dpi	9º dpi	12º dpi	15º dpi
Acepran+Ketamina	20 g	19 g	23 g	28 g	27 g
Xilazina+Ketamina	59 g	74 g	70 g	23 g	32 g
Sem Anestesia	109 g	28g	36 g	29 g	24 g

Tabela 1: Consumo de ração nos dias de tratamento (g)

Grupos	Dias de Tratamento				
	3º dpi	6º dpi	9º dpi	12º dpi	15º dpi
Acepran+Ketamina	21 mL	51 mL	157 mL *	57 mL	45 mL
Xilazina+Ketamina	52 mL	56 mL	120 mL	81 mL	41 mL
Sem Anestesia	48 mL	51 mL	65 mL	58 mL	33 mL

Tabela 2: Ingestão de água nos dias de tratamento (mL)

* $p<0,05$ vs 3º dpi do mesmo grupo.

Após a infecção, as fêmeas de *S. venezuelensis* seguem para o ID, preferencialmente para o duodeno, onde se encontrarão em fase adulta, completando seu desenvolvimento e amadurecimento, iniciando a deposição e liberação de ovos nas fezes do hospedeiro (FERNANDES et al., 2008; BAEK et al., 2002). Com aproximadamente 2.000 larvas infectantes de *S. venezuelensis*, é possível obter uma estimativa do número de ovos liberados nas fezes e verificar o pico de oviposição do parasito. Os grupos anestesiados com Xilazina+Ketamina, Acepran+Ketamina e grupo Sem Anestesia obtiveram um pico no 9º dpi ao analisarmos os outros dias desses mesmos grupos (Figura 3). A oviposição do grupo anestesiado com Acepran+Ketamina e Acepran+Xilazina apresentaram diferença no 6º dpi quando comparado com os demais grupos no mesmo dia. Entretanto, o grupo de Acepran+Xilazina mostrou, ainda, uma diferença no 9º dpi em relação aos outros grupos que apresentaram picos no mesmo dia.

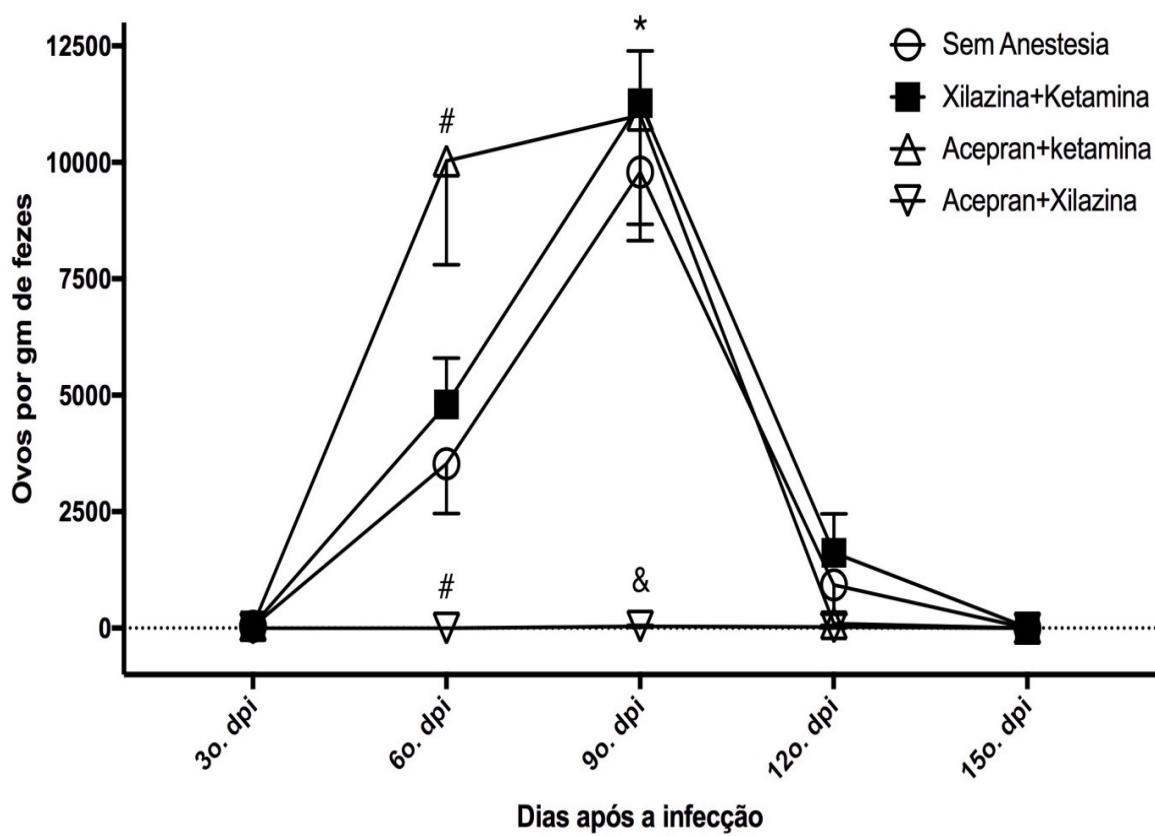


Figura 3: OPG dos animais durante o tratamento (Média ± erro padrão).

* $p<0,05$ o 9º dpi vs 3º dpi, 6º dpi, 12º dpi e 15º dpi dos grupos Xilazina+Ketamina, Acepran+Ketamina e Sem Anestesia; # $p<0,05$ Acepran+Ketamina e Acepran+Xilazina vs os demais grupos no 6º dpi; & $p<0,05$ Acepran+Xilazina no 9º dpi vs os demais grupos no mesmo dia. (ANOVA; pós-teste de Tukey).

Tanto a resposta imunológica dos camundongos como o tratamento com EA ao qual foram submetidos podem estar associados com a falta de vermes adultos no 15º dpi.

Ao ser retirado o ID para contagem de vermes foi notado uma elasticidade atípica nos intestinos dos animais submetidos à dose de anestésicos, porém não houve diferença estatística quanto à morfometria do intestino dos animais (Figura 4).

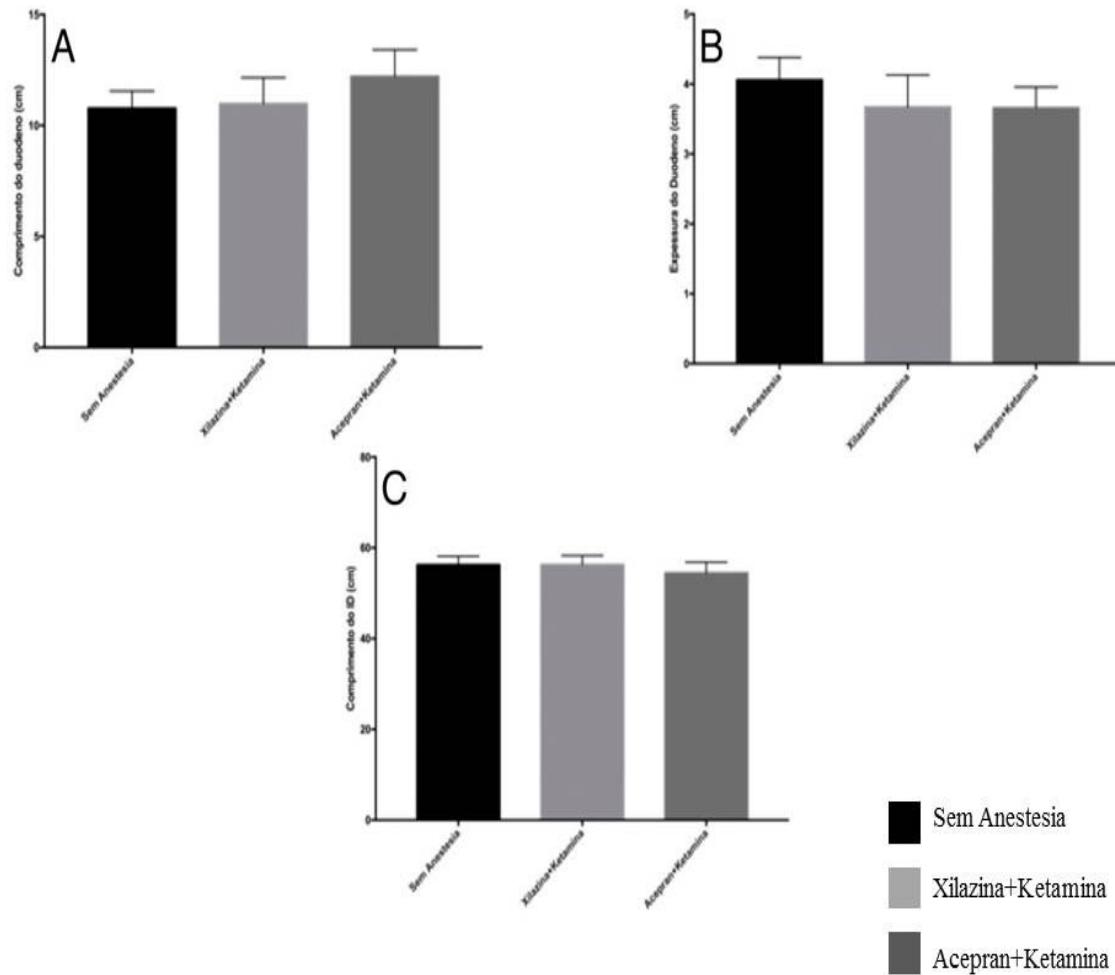


Figura 4: Análise morfométrica do ID quanto à: A) Comprimento do duodeno; B) Espessura do duodeno; C) Comprimento do ID, em centímetros (média ± erro padrão).

4 | DISCUSSÃO

Pela primeira vez, camundongos infectados com *S. venezuelensis*, são tratados com acupuntura no acuponto E36; da mesma forma é a primeira vez que se estuda o efeito de anestésicos sobre o tratamento de acupuntura, independente do modelo experimental. Por ser uma área completamente nova, o estabelecimento de um protocolo adequado para a realização dos experimentos em acupuntura deve ser feito com atenção ao tipo de sedação utilizada. Podemos perceber a importância de tais resultados e sua relevância ao serem apresentados, já que alguns anestésicos podem ocasionar interferência em modelos experimentais de tratamentos e/ou enfermidades gerando efeitos como os mostrados para quase todas as associações de anestésicos.

neste modelo.

Apesar de muitas parasitoses relacionarem-se ao déficit no desenvolvimento físico e cognitivo além da desnutrição (MOTTA e SILVA, 2002), que resulta em uma queda no peso, o acuponto E36 está associado diretamente ao estômago e pode influenciar a diminuição de peso, por meio do tratamento do desequilíbrio do metabolismo nesse meridiano (ALVES, 2012). Tanto o tratamento com acupuntura quanto o uso de anestésico atuam no SNC e podem estar envolvidos no bloqueio de alguns centros importantes, como o centro da fome, por exemplo. Possivelmente, através desse bloqueio, os animais tenham perdido peso. Entretanto, notamos que a associação entre parasitose, acupuntura e uso de anestesia também promoveu queda de peso, é possível apontar que diferentes anestésicos atuam na diminuição do ganho de peso dos animais.

O que se tem discutido é a respeito da redução significativa de peso em hamsters pelo uso de anestésicos inalatórios, como o halotano (BUSSARD et al., 1974; DOMINGUES et al., 2012). Em contrapartida, alguns pontos de acupuntura, como o E36, associados a medicamentos e/ou fitoterápicos também promovem redução de peso (ALVES, 2012). Portanto, se associarmos as três variáveis, podemos sugerir que o grupo Xilazina+Ketamina foi o que menos apresentou alteração no peso dos animais, ou seja, não interferiu. Esse resultado corroboraria na ideia de que as diferentes classes e associações de anestésicos podem promover efeitos nesse parâmetro.

Por outro lado, os anestésicos testados apresentaram alterações no padrão de oviposição deste modelo experimental, comparado ao grupo não anestesiado. O que se conhece é sobre o uso de benzodiazepínicos e uretano em tratamentos de acupuntura do trato gastrintestinal, os quais não interferiram na carga parasitária de *Leishmania major* (SHAKIBAPOUR et al., 2015) e não alterou os resultados obtidos pela acupuntura (SU et al., 2014; WANG et al., 2012; YUXUE et al., 2015), respectivamente. Não obstante, o uso de barbitúricos em tratamentos de acupuntura provoca aumento de contratilidade gástrica (QIAN et al., 1999; JOAQUIM, 2003). A partir disso, e dos resultados expostos podemos sugerir que as alterações parasitológicas observadas neste experimento, foram dependentes do tipo de anestésico utilizado. Sabe-se, através de experimentos feitos previamente que, o pico de oviposição para *S. venezuelensis* em camundongos ocorre entre o 7º e 9º dpi (SATO e TOMA, 1990; AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUERA, 2002) e que em tratamento de acupuntura no acuponto E36 apresenta perfil de oviposição no 9º dpi em ratos (ANJOS-RAMOS et al., 2018). Kobayaashi e Horii (2008) acompanharam a infecção de *Strongyloides papillosum* em coelhos sem o uso de anestésicos ou acupuntura. Esse resultado corrobora com o padrão apresentado pela associação entre Xilazina+Ketamina no qual não observamos interferência.

Após o pico, há uma redução no número de ovos contados indicando a remissão da parasitose no organismo dos animais através da eliminação das larvas adultas, que já foi descrita na literatura que ocorre entre o 10º e 14º dpi e, que após esse período

a eliminação se torna completa (SATO e TOMA, 1990; AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002). Isso ocorre devido ao sistema imunológico do camundongo que possui uma resistência natural a este tipo de parasito (FERNANDES et al., 2008). O sistema imunológico através de interleucinas liberadas por células do tipo Th2 auxilia na ativação de outras células da resposta inata, eosinófilos principalmente, e na produção de imunoglobulinas, IgE e IgG1 em camundongos, que estimularam a produção de muco pelas células caliciformes presentes no epitélio superficial da mucosa (FERNANDES et al., 2008; TAYLOR et al., 2012; YASUDA et al., 2012). A resposta imunológica dos camundongos e o tratamento com EA ao qual foram submetidos podem estar associados com a falta de vermes adultos no 15º dpi.

Contudo, deve-se ter em conta as alterações na ingestão hídrica que seria um indicativo de toxicidade provocada pelos anestésicos (YAO et al., 2007). E em se tratando do intestino, o mesmo pode vir a sofrer alterações morfofisiopatológicas, já que o local de aplicação, via intraperitoneal, pode ter provocado essa toxicidade causada pela absorção exacerbada do fármaco (CARVALHO, 1994), apesar de os níveis de consumo do grupo Xilazina+Ketamina se apresentarem normais, tornando essa associação segura para esse tratamento experimental.

No entanto, outras classes de fármacos como os antibióticos podem causar alterações morfológicas nas criptas duodenais em aves (VIOLA e VIEIRA, 2007). Sendo assim, os anestésicos poderiam causar alterações na parede intestinal pelo fato de a administração no organismo dos animais tratados possuírem um intervalo curto e que a acupuntura não tenha agido sobre essa alteração em específico. Ao mesmo tempo, não é possível relatar o motivo de não encontrarmos diferenças entre as medidas do ID e do duodeno, por falta de estudos semelhantes a este.

Interessantemente, apesar dos dados já publicados na literatura científica, observamos que a associação de Xilazina+Ketamina apresentou resultados semelhantes aos obtidos no grupo não anestesiado, para todos os parâmetros analisados. Uma vez que o objetivo do uso de anestésicos seria minimizar o estresse dos animais durante os experimentos, vemos nesse anestésico um forte candidato a ser utilizado em modelos parasitados e tratados com acupuntura.

5 | CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos afirmar que a associação dos anestésicos Xilazina+Ketamina não foi capaz de alterar os parâmetros analisados do tratamento de electroacupuntura da infecção por *S. venezuelensis*, sendo assim indicada para o uso nesse modelo experimental, afim de minimizar o estresse animal. Entretanto, mais experimentos devem ser realizados para analisar o possível efeito dos anestésicos em outros parâmetros.

6 | AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que gentilmente cedeu a cepa de *S. venezuelensis*, na pessoa do Prof. Dr. Allan Lane de Melo. Ao Centro de Manutenção de Animais de Experimentação (CMAE), pelos animais bem cuidados e cedidos. E à toda equipe do Laboratório de Acupuntura Científica e Investigações Infecto-Morfológicas (LACIIM).

REFERÊNCIAS

- ALVES, C.P. **Uso da acupuntura em crianças com excesso de peso e sintomatologia de ansiedade:** um estudo exploratório. 171f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- ALVES, T.C.A.; BRAZ, J.R.C. Efeitos da associação da clonidina à ropivacaína na anestesia peridural. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 410-419, 2002.
- AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA-SEQUERA, T.C.G. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 273-278, 2002.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Scielo-ed. FIOCRUZ, Manguinhos, p. 247-263, 2006.
- ANJOS-RAMOS, L. **Caracterização do trânsito gastrintestinal e atuação da acupuntura sistêmica em ratos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.** 86 f. Dissertação (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- ANJOS-RAMOS, L. et al. Electroacupuncture in rats infected with *Strongyloides venezuelensis*: effects on gastrointestinal transit and parasitological measurements. **Acupuncture in Medicine** v. 36, n. 1, p. 44-51, 2018.
- ARENA, G. et al. Fenotiazínicos: usos, efeitos e toxicidade em animais de grande e pequeno porte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.
- BAEK, B. et al. Persistent infection with *Strongyloides venezuelensis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **The Korean journal of parasitology**, v. 40, n. 4, p. 181, 2002.
- BUSSARD, D.A. et al. Fetal changes in hamsters anesthetized with nitrous oxide and halothane. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 41, n. 3, p. 275-278, 1974.
- CARVALHO, J.C.A. Farmacologia dos anestésicos locais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 75-82, 1994.
- DAMY, S.B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
- DILL, S.G. Acupuncture for gastrointestinal disorders. **Problems in veterinary medicine**, v. 4, n. 1, p. 144-154, 1992.
- DOMINGUES, C.E. et al. Efeito do halotano sobre a gestação e a viabilidade embrionária em ratos - Estudo experimental. **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n. 4, p. 32-41, 2012.

DUARTE, D.F. Opium and opioids: a brief history. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005.

FERNANDES, A. et al. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite immunology**, v. 30, n. 3, p. 139-149, 2008.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaine: myths, history and abuse. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96-99, 2001.

GONÇALVES, A.L.R. et al. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental parasitology**, v. 125, n. 4, p. 338-341, 2010.

HUGGINS, D. et al. Tratamento da estrongiloidíase humana e outras parasitoses intestinais com dose única de ivermectina. **Pediatrico Mod**, v. 58, p. 168-170, 2001.

JOAQUIM, J.G.F. **Efeito da acupuntura e eletroacupuntura na contração gástrica em cães (Canis familiaris)**. 105 f. Dissertação (Mestrado- Área de Cirurgia Veterinária- Subárea: Acupuntura) – Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu, 2003.

JORDAN, B.D.; WRIGHT, E.L. Xenon as an anesthetic agent. **American Association of Nurse Anesthetists Journal**, v. 78, n. 5, p. 387-392, 2010.

KHAN, A.I. et al. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. **International journal for parasitology**, v. 23, n. 5, p. 551-555, 1993.

KLEIN, S.L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 6, p. 627-638, 2000.

KOBAYASHI, I.; HORII, Y. Gastrointestinal motor disturbance in rabbits experimentally infected with *Strongyloides papillosum*. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 1, p. 67-72, 2008.

MANICA, J. **Anestesiologia: princípios e técnicas**. 3a ed. Porto Alegre, Artmed Editora, p. 227-242, 2009.

MANN, F. **A Antiga Arte Chinesa de Curar**. São Paulo, ed. Hermus, p. 208, 1994.

MARRA, N.M. et al. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 57-61, 2010.

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da Estrongiloidíase no Brasil. **Revista de Serviços Especializados em Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.

MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G.A.P. Parasites induced diarrheas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 2, p. 117-127, 2002.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 12. Ed. São Paulo: ed. Atheneu, p 295-99, 2011.

PASIN, S.S.; SCHNATH, F. Cuidados de enfermagem na analgesia por cateter peridural. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 27, n. 2, p. 69-73, 2007.

PAULA, F.M.; COSTA-CRUZ, J.M. Epidemiological aspects of *strongyloidiasis* in Brazil. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1331-1340, 2011.

PILLA, P.C.; SOLDERA, J.; BERNARDI, L.S. A acupuntura como terapêutica da síndrome do intestino irritável. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 37, n. 3, 2008.

QIAN, L; PETERS, L.J.; CHEN, J.D.Z. Effects of electroacupuncture on gastric migrating myoelectrical complex in dogs. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 1, p. 56-62, 1999.

RIVERO, J.C. et al. Age-and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to *Strongyloides venezuelensis* infection. **Journal of veterinary medical science**, v. 64, n. 6, p. 519-521, 2002.

SCHAD, G.A. Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis*. **Strongyloidiasis: A major roundworm infection of man**, p. 85-104, 1989.

SHAKIBAPOUR, M. et al. Therapeutic effect of acupuncture in BALB/c model of cutaneous leishmaniasis. **Advanced biomedical research**, v. 4, 2015.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 441-7, 2004.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R; BECHARA, G. H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência rural**, v. 31, n. 6, p. 1091-1099, 2001.

SMART, H.L.; MAYBERRY, J.F.; ATKINSON, M. Alternative medicine consultations and remedies in patients with the irritable bowel syndrome. **Gut**, v. 27, n. 7, p. 826-828, 1986.

SU, Y.S. et al. Somatosensory nerve fibers mediated generation of de-qì in manual acupuncture and local moxibustion-like stimuli-modulated gastric motility in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

SUDRÉ, A.P. et al. Diagnóstico da Estrongiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 3, p. 173-84, 2006.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International journal for parasitology**, v. 25, n. 8, p. 907-911, 1995.

TAYLOR, M.D.; VAN DER WERF, N.; MAIZELS, R.M. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. **Trends in immunology**, v. 33, n. 4, p. 181-189, 2012.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1097-1104, 2007.

WANG, X. et al. Are primo vessels (PVs) on the surface of gastrointestinal involved in regulation of gastric motility induced by stimulating acupoints ST36 or CV12? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

WEN, T. S. **Acupuntura clássica chinesa**. 12^a reimpressão da 1^a ed. São Paulo, Cultrix, p. 9-16, 2006.

YAO, M.; RITCHIE, H.E.; BROWN-WOODMAN, P.D. A developmental toxicity screening test of valerian. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 204-209, 2007.

YASUDA, K. et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 9, p. 3451-3456, 2012.

YUXUE, Z. et al. Effect of manual acupuncture on bowel motility in normal Kunming mouse. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 35, n. 2, p. 227-233, 2015.

ESTUDANTES DE ODONTOLOGIA CANHOTOS E OS DESAFIOS ENFRENTADOS EM ATIVIDADES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Julio Martinez Alves Oliveira

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo

Suzely Adas Saliba Moimaz

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo

Artênio José Isper Garbin

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo

Tânia Adas Saliba

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
Araçatuba – São Paulo

objetivo neste trabalho foi verificar o número de estudantes de odontologia canhotos e destros, e investigar o número de equipamentos para destros e canhotos em clínicas e laboratórios da faculdade de odontologia de Araçatuba. Trata-se de uma pesquisa descritiva, realizada na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Foram analisados o número de alunos canhotos matriculados no ano letivo de 2018 e de equipamentos adaptados disponíveis nas clínicas e nos laboratórios. Do total de 604 acadêmicos, 58 são canhotos. Há na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, quatro clínicas de ensino, cada qual com 40 consultórios, totalizando 160 consultórios disponíveis para alunos dos cursos de graduação, sendo 6 adaptados para canhotos. Quanto aos laboratórios multidisciplinares, há dois manequins disponíveis para canhoto em cada um dos dois laboratórios, totalizando quatro equipamentos. Foram levantadas na literatura as dificuldades enfrentadas relacionadas a essa condição. Conclui-se que embora haja equipamentos adaptados para canhotos no curso de odontologia, a quantidade disponibilizada atende parcialmente às necessidades dos acadêmicos, apontando para realização de ações que possibilitem melhorias na infraestrutura física da instituição.

PALAVRAS-CHAVE: Ergonomia, Odontologia, Postura

RESUMO: O julgamento aplicado ao canhoto, em tempos passados, estava associado a um indivíduo cercado de dúvidas referentes à sua capacidade de atuar em sociedade. Atualmente, sabe-se que o canhoto é apenas um sujeito que apresenta suas habilidades mais atuantes com o lado esquerdo do corpo. A universidade, lócus estratégico para a formação profissional, deve prover condições adequadas para tal função. O

LEFT - HANDED DENTISTS AND THE CHALLENGES FACED IN CLINICAL AND LABORATORY ACTIVITIES

ABSTRACT: The judgment applied to the left-handed in the past was associated to a person surrounded by doubts regarding his ability to act in society. Nowadays, it is noticed that the left-handed is only someone that presents his most active abilities using the left side of the body. The university, which is a strategic locus for vocational training, must provide adequate conditions for this function. The objective of this study was to verify the number of left-handed and right-handed dentistry students and also to investigate the number of right-handed equipment in clinics and laboratories at the Dentistry university of Araçatuba. This is a descriptive research carried out at the Dentistry university of Araçatuba - UNESP. We analyzed the number of left-handed students enrolled in 2018 academic year and also the adapted equipment available at clinics and laboratories. We found out that 58 of 604 students are left-handed. At the university there are four teaching clinics, and there are 40 offices, in each one of them, totaling 160 offices available for undergraduate students, and only 6 of those offices are adapted for left-handed students. And about the multidisciplinary laboratories, there are two mannequins available for the left-handed students in each one of the two laboratories, totaling four equipments. The difficulties related to this condition were raised in the literature. It is concluded that although there are adapted equipment for left-handed people in the dentistry course, the quantity available partially meets the needs of the academic, pointing to actions that allow improvements in the physical infrastructure of the institution.

KEYWORDS: Ergonomics, Odontology, Posture

1 | INTRODUÇÃO

Durante a idade média, para a sociedade da época, o canhoto estava ligado a uma força do mal, que por muitas vezes o levava a ser julgado e morto. A religião, referência de vida para muitas pessoas, adotou no budismo tradições que indicavam ao fiel o lado direito para se curvar e realizar suas orações. Peregrinos, que a cada ano vão a Meca, acompanham uma caminhada por um trajeto que os levam ao lado direito do percurso. No cristianismo, Eva surgiu da costela direita de Adão, e na oração “Está sentado à direita de Deus pai todo poderoso” a referência ao lado direito é relatada com maior prestígio (OLIVEIRA, 2016).

Canhoto, sinostromo, e também esquerdo, são termos utilizados para se referir ao indivíduo que atua em sua melhor função com o lado esquerdo do corpo. Por muito tempo, estes indivíduos estiveram cercados de dúvidas, em relação a suas capacidades de atuação (HOLDER, 2017).

O termo ergonomia chegou a europa em torno de 1950 e uma associação foi criada para compreender melhor as ações do indivíduo durante o trabalho. Nos anos 1980 houve a introdução do ensino da ergonomia em cursos de odontologia,

como senso comum entre professores americanos (GARBIN; GARBIN; DINIZ, 2009; HOLLIS, 1985; TROUP; ROUHALA, 1987).

A ergonomia é a ciência que agrupa conhecimentos multidisciplinares a serem aplicados na organização do trabalho, e apresenta o objetivo de garantir um ambiente saudável, seguro, confortável e também prevenir doenças relacionadas ao trabalho, melhorando a efetividade do serviço (DUL; WEERDMEESTER, 2004). Ela coloca o ser humano como foco, sendo assim, avalia suas aptidões e deficiências (GARBIN; GARBIN; DINIZ, 2009; HOLLIS, 1985; TROUP; ROUHALA, 1987).

O conhecimento dos princípios da ergonomia em ambiente profissional, pode diminuir os riscos de se desenvolver as chamadas doenças ocupacionais, que são lesões ocasionadas pela repetição inadequada de movimentos ou postura incorreta durante atividade em trabalho (VICENTE, 2005). O ensino da ergonomia odontológica deve ser calcado nas atividades práticas do cirurgião-dentista e na solidez das normas e diretrizes ergonômicas (GARBIN; GARBIN; DINIZ, 2009; HOLLIS, 1985; TROUP; ROUHALA, 1987).

A odontologia é uma profissão que propicia a ocorrência de doenças relacionadas à posição de trabalho. Portanto, problemas de cabeça, dores, problemas nas mãos, braços, visão, são muito prevalentes entre os cirurgiões dentistas e nos diferentes ambientes de trabalho, como em fábricas, escritórios e ambiente clínico. O indivíduo destro durante atividade em consultório adaptado para destro, exerce suas funções de maneira adequada, contudo, as mesmas condições não podem ser descritas para o profissional canhoto, que ao trabalhar em consultório não adaptado apresenta maiores dificuldades.

A forma de atendimento torna-se com o passar dos anos, uma atividade mecânica, repetitiva. Dessa forma, faz-se necessário que os acadêmicos de odontologia sejam avaliados quanto ao seu posicionamento em atendimento, para que possam, ainda na universidade, reaprender e readequar sua postura, evitando assim a formação de hábitos deletérios (RISING et al., 2005).

A universidade é um lócus fundamental para a formação profissional, devendo, portanto, promover condições adequadas para destros e canhotos, e assim contribuir para a menor prevalência de lesões ocupacionais, e transtornos gerados durante o trabalho. Poucos são os estudos sobre o acadêmico e o profissional de odontologia canhoto, suas dificuldades e necessidades. Conhecer esses fatores é fundamental para o melhor planejamento de clínicas e laboratórios em faculdades de odontologia.

2 | OBJETIVO

O objetivo nesta pesquisa foi verificar o número de estudantes de odontologia canhotos e destros e o número de equipamentos para destros e canhotos disponíveis em clínicas e laboratórios de uma instituição pública de ensino.

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

Trata- se de uma pesquisa transversal observacional, realizada na Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Foram incluídos no estudo todos os alunos regularmente matriculados nos cursos de odontologia dos períodos integral e noturno no ano letivo de 2018.

As variáveis estudadas foram: preconceito por se apresentar na condição de canhoto, riscos de se adquirir complicações musculoesqueléticas, desempenho nos procedimentos odontológicos e o apoio institucional.

Foi realizada a análise da infraestrutura local da faculdade, visando verificar o número de equipamentos odontológicos adaptados para canhotos disponíveis nas clínicas e laboratórios existentes. O material coletado foi analisado e os resultados encontrados estão sendo divulgados para a comunidade acadêmica e científica por meio da publicação de artigos científicos e apresentação em congressos e jornadas acadêmicas. Ademais, convém salientar a importante contribuição deste estudo para a comunidade odontológica.

4 | RESULTADOS

Do total de 604 acadêmicos, 58 (9%) são canhotos. Existem na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, quatro clínicas de ensino, cada qual com 40 consultórios, totalizando 160 consultórios disponíveis para atendimento por alunos dos cursos de graduação.

Na clínica 1, não há consultórios odontológicos adaptados para canhotos; na clínica 2 verificou - se a presença de 3 consultórios odontológicos; na clínica 3 observaram-se 2 e na clínica 4 apenas um consultório adaptado.

Quanto aos laboratórios multidisciplinares, há dois manequins disponíveis para canhotos em cada um dos dois laboratórios, totalizando quatro equipamentos. Foram levantadas na literatura as dificuldades enfrentadas, relacionadas a essa condição.

Conclui-se que embora haja equipamentos adaptados para canhotos na instituição, a quantidade disponibilizada atende parcialmente às necessidades dos acadêmicos, apontando para ações que possibilitem melhorias.

Foi analisado o número de alunos canhotos que estão matriculados no período integral e período noturno no ano letivo de 2018. Do total de 604 acadêmicos, 58 (9%) são canhotos e 546 (91%) destros.

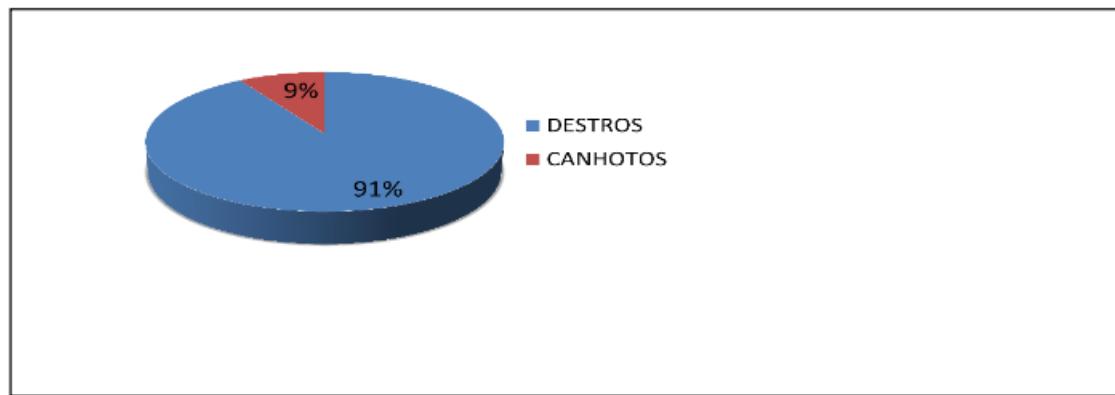


Gráfico 1. Proporção de acadêmicos destros e canhotos. FOA – UNESP, 2018

Existem na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, quatro clínicas de ensino, cada qual com 40 consultórios, totalizando 160 consultórios disponíveis para atendimento por alunos dos cursos de graduação. Na clínica 1, não há consultórios odontológicos adaptados para canhotos; na clínica 2 verificou –se a presença de 3 consultórios odontológicos; na clínica 3 observaram-se 2 e na clínica 4 apenas 1 consultório adaptado.

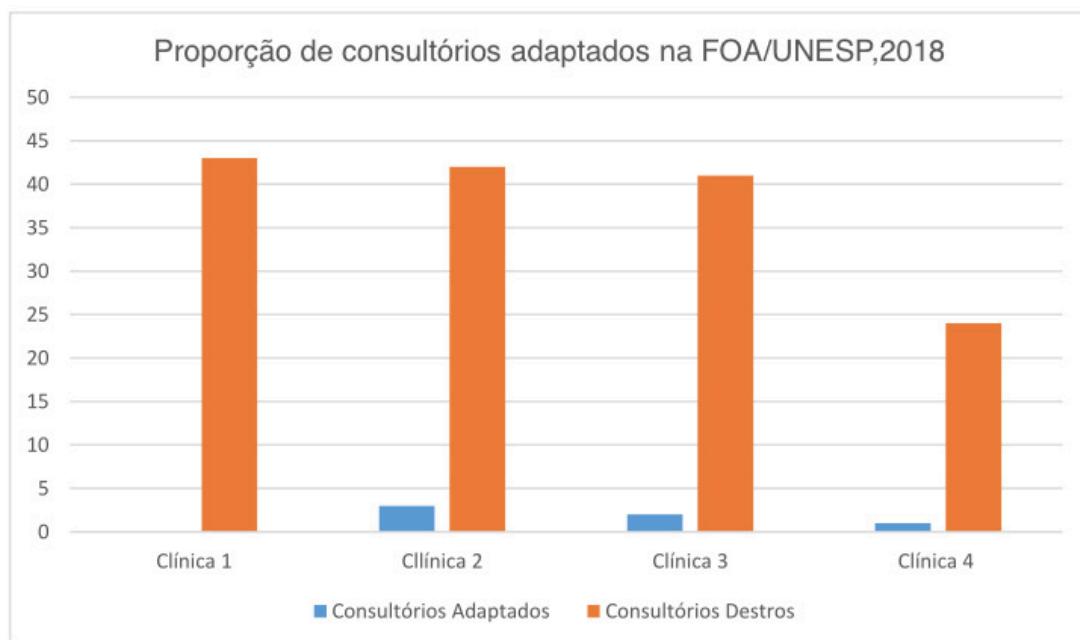


Gráfico 2. Proporção de consultórios adaptados na FOA/UNESP, 2018

5 | DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi possível analisar o número de estudantes de odontologia canhotos, e verificar a quantidade de equipamentos adaptados e equipamentos para destros, disponíveis em clínicas e laboratórios de uma instituição pública de ensino.

O estudo revelou que a proporção de estudantes de odontologia canhotos corresponde a aproximadamente 10% dos acadêmicos da universidade. À vista disso,

considera-se de grande importância, conhecer estes alunos.

O número de equipamentos adaptados para canhotos deve estar de acordo com a quantidade de alunos que apresentam esta condição. A universidade desempenha papel fundamental na formação acadêmica, devendo promover condições adequadas de trabalho para destros e canhotos, e assim contribuir para a menor prevalência de doenças ocupacionais.

6 | CONCLUSÃO

A proporção de canhotos está de acordo com a taxa populacional. Embora haja equipamentos adaptados para canhotos na instituição, a quantidade disponibilizada atende parcialmente as necessidades dos acadêmicos. Sendo assim, devem ser realizadas ações que busquem melhorias na infraestrutura física da instituição.

REFERÊNCIAS

- DUL, J.; WEERDMEESTER, B. **Ergonomia prática**. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.
- GARBIN, A. J. I.; GARBIN, C. A. S.; DINIZ, D. G. Normas e diretrizes ergonômicas em odontologia: o caminho para a adoção de uma postura de trabalho saudável. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 155-161, 2009.
- HOLDER, M. K. **Why are more people right-handed?** 2017. Disponível em: <https://www.scientificamerican.com/article/why-are-more-people-right/>. Acesso em: 14 abr. 2018.
- HOLLIS, M. **Safer lifting for patient care**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985.
- OLIVEIRA, L. H. **Canhotos**: essa sofrida gente de esquerda. 2016. Disponível em: <https://super.abril.com.br/saude/canhotos-essa-sofrida-gente-de-esquerda/>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- RISING, D. W. et al. Reports of body pain in a dental student population. **Journal of the American Dental Association**, v. 136, n. 1, p. 81-86, 2005.
- TROUP, J. D. G.; ROUHALA, H. H. Ergonomics and training. **International Journal of Nursing Studies**, v. 24, n. 4, p. 325-330, 1987.
- VICENTE, K. **Homens e máquinas**: como a tecnologia pode revolucionar a vida cotidiana. Rio de Janeiro: Ediouro, 2005.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DE *MYRTACEAE* CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Juliana Barbosa Succar

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Programa de Pós-graduação de Ciência e Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro – RJ

Gabriele Marques Pinto

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO) -Rio de Janeiro-RJ

Tauana de Freitas Pereira

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Programa de Pós-graduação de Ciência e Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro – RJ

Ida Carolina Neves Direito

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Programa de Pós-graduação Ciência e Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro – RJ

Maria Cristina de Assis

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Programa de Pós-graduação Ciência e Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro – RJ

Cristiane Pimentel Victório

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Programa de Pós-graduação Ciência e Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro – RJ

áreas de restinga. A atividade antibacteriana de óleos essenciais de espécies de *Myrtaceae* foi analisada frente às cepas PAO-1- *Pseudomonas aeruginosa* e ET-12-*Burkholderia cenocepacia*, bactérias Gram negativas de importância clínica e com alto perfil de resistência a antimicrobianos. Os óleos essenciais de folhas das espécies *Neomitrannes obscura*, *Eugenia selloi*, *Eugenia astringens*, *Eugenia arenaria* e *Myrrhinium atropurpureum* foram obtidos pelo método de hidrodestilação. Para os ensaios com as cepas, foi utilizada a metodologia da difusão do disco em agar, segundo normas do Comitê Europeu para Testes de Susceptibilidade e Antimicrobianos (EUCAST 4.0). Para o ensaio foram utilizadas as seguintes concentrações: 3,6 12, 25, 50 e 90% em meio Müller Hinton Broth (MHB) na presença de 0,5% de *tween 80*. Os resultados indicam que os óleos essenciais de *E. arenaria* e *E. astringens* tiveram atividade antibacteriana nas concentrações (v/v) de 25% e 50%, respectivamente para ambas as cepas. O óleo essencial de *M. atropurpureum* também apresentou atividade bactericida nas concentrações de 50% para as duas cepas enquanto que *N. obscura* e *E. selloi* não apresentaram atividade. Estes resultados nos levam a especular que os óleos essenciais de folhas das espécies *E. arenaria*, *E. astringens* e *M. atropurpureum* possuem propriedades bactericidas podendo ser utilizados como

RESUMO: *Myrtaceae* é uma família relevante no domínio Mata Atlântica, e bastante comum em

coadjuvantes nas infecções multiresistentes causadas por *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia*.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antimicrobiana, óleos essenciais, fibrose cística, *Burkholderia cenocepacia*, substâncias voláteis.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF MYRTACEAE PLANTS

AGAINST MULTIRESIST BACTERIA

ABSTRACT: *Myrtaceae* is a relevant family in the Mata Atlântica domain, and quite common in restinga areas. The antibacterial activity of essential oils of *Myrtaceae* species was analyzed against the *Pseudomonas aeruginosa*-PAO-1 and *Burkholderia cenocepacia*-ET-12 strains, Gram-negative bacterias of clinical importance and with high antimicrobial resistance profile. The essential oils were obtained from leaves of *Neomitrantes obscura*, *Eugenia selloi*, *Eugenia astringens*, *Eugenia arenaria* and *Myrrhinium atropurpureum* by the hydrodistillation method. For the assays with the strains, the agar diffusion methodology was used, according to the standards of the European Committee for Susceptibility and Antimicrobial Testing (EUCAST 4.0). For the assay the following concentrations were used: 3, 6 12, 25, 50 and 90% in Müller Hinton Broth medium (MHB) in the presence of 0.5% tween 80. The results showed that the essential oils of the *E. arenaria* and *E. astringens* had bactericidal activity at concentrations (v/v) of 25% and 50%, respectively, for the strains tested. The essential oil from *M. atropurpureum* also showed bactericidal activity at 50% concentrations for both strains, whereas *N. obscura* and *E. selloi* showed no activity. These results lead us to speculate that the leaf essential oils of the *E. arenaria*, *E. astringens* and *M. atropurpureum* have bactericidal properties and can be used as coadjuvants in the multiresistant infections caused by *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia*.

KEYWORDS: antimicrobial activity, essential oils, cystic fibrosis, *Burkholderia cenocepacia*, volatile substances

1 | INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade (4.000-500 a.C.) os óleos essenciais são utilizados em preparos alimentícios, medicamentos, perfumaria, como balsamos em cerimônias religiosas e embalsamento de corpos pelos egípcios. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis extraídos de órgãos vegetais, constituídos principalmente de terpenoides, mono- e sesquiterpenos, oriundos do metabolismo secundário vegetal. Na natureza, têm a importância ecológica de defesa contra herbivoria e atração de polinizadores, por exemplo; e conferem aroma e sabor as plantas (RAUT e KARUPPAYI, 2014).

A família *Myrtaceae* Juss. possui como característica anatômica, cavidades secretoras especializadas na produção e acúmulo de terpenos, principalmente, em folhas e frutos. As espécies são arbóreas e arbustivas, comuns nos domínios de Mata

Atlântica onde há cerca de 50% de espécies endêmicas, e são de importância para fauna devido aos frutos (VICTÓRIO *et al.*, 2011; FRAUCHES *et al.*, 2016). No Brasil, estão catalogados 23 gêneros e 1.026 espécies, sendo 789 endêmicas (SOBRAL *et al.*, 2015). Uma das famílias de maior riqueza de espécies e podem ser encontradas também nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pampa e Pantanal (LOURENÇO e BARBOSA, 2012; SOBRAL *et al.*, 2015). Essa família tem alta prevalência no Brasil, onde o uso alimentício é bastante disseminado por causa dos frutos (*wild berries*).

Eugenia é o maior gênero Neotropical de *Myrtaceae*, ocorrendo no México e no Caribe até o norte da Argentina, e é representada no Brasil por cerca de 350 espécies espalhadas por diferentes habitats por todo país. Este gênero apresenta várias espécies endêmicas e de uso alimentício e medicinal (RAMOS *et al.*, 2010; ARRUDA *et al.*, 2011). *Neomitrantes* é um gênero de plantas de restinga e florestas, como Mata Atlântica, a espécie *Neomitrantes obscura* é a única representante do gênero, presente na Restinga da Marambaia. Essa espécie é rica em óleos essenciais e é utilizada na alimentação e na medicina popular (FRAUCHES *et al.*, 2016; VICTÓRIO *et al.*, 2018). *Myrrhinium atropurpureum*, encontrada nas restingas do Rio de Janeiro, é uma fonte natural de substâncias utilizadas como adstringentes e antimicrobianos (VICTÓRIO *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais têm propriedades bioativas e são bastante visados para os tratamentos terapêuticos. Estudos relatam o uso de óleos essenciais como antimicrobianos, principalmente em casos onde a bactéria produz biofilme, característica que confere resistência à ação de antibióticos (RAUT e KARUPPAYI, 2014). Os óleos essenciais apresentam um baixo risco de resistência microbiana à sua ação já que são substâncias complexas, dificultando a adaptabilidade dos microrganismos (DAFERERA *et al.*, 2003).

Uma alternativa na utilização dos óleos essenciais é a combinação destes com antibióticos sintéticos. A ação conjunta destas substâncias pode aumentar o espectro de ação em comparação com o uso isolado, sendo, portanto uma alternativa no controle de bactérias multirresistentes (BASSOLÉ e JULIANI, 2012).

Dentre os microrganismos considerados patogênicos, bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*s são classificadas como microrganismos oportunistas multirresistentes, frequentemente associados à fibrose cística e a infecções nosocomiais com alta taxa de mortalidade em centros médicos (GIBSON *et al.*, 2003). O Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) é formado por uma variedade de espécies bacterianas de origem ambiental que se relacionam de forma íntima. Algumas espécies possuem potencial para uso como ferramenta biotecnológica na área agrícola para biocontrole, biorremediação e promoção de crescimento. Por outro lado, seu uso é comprometido por se tratarem de microrganismos oportunistas, podendo causar infecções humanas, em especial em pacientes com fibrose cística e imunocomprometidos (MARQUES, 2011).

O Complexo *B. cepacia* (CBc) é formado de 17 espécies que estão associadas à deterioração pulmonar e aumento da mortalidade em pacientes com Fibrose Cística (FC) e imunocomprometidos. Essas espécies variam entre si em relação à prevalência, quadros clínicos e virulência. Pouco é conhecido em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos. Uma vez estabelecida a infecção, a abordagem terapêutica e as medidas de controle atualmente adotadas são baseadas no CBc, sem considerar cada espécie em particular. Segundo Vandamme e Dawyndt (2011), a espécie *B. cenocepacia* subdivide-se em quatro grupamentos filogenéticos apresentados por IIIA, IIIB, IIIC e IIID. Uma das cepas mais estudadas e descritas como altamente transmissível é conhecida como ET-12, espécie *B. cenocepacia* IIIA (SPEERT *et al.*, 2002). Atualmente, são reconhecidas outras estirpes, consideradas de alta virulência, além da ET-12 (MARQUES, 2011).

O gênero *Pseudomonas* é amplamente distribuído na natureza, tem grande predileção por ambientes úmidos (LI PUMA, 2010; HAUSERE *et al.*, 2011). São encontrados em alimentos de origem animal e vegetal, além de ambientes hospitalares (COSTA, 2009). Este gênero possui várias espécies, onde apenas algumas são associadas a infecções oportunistas, como é o caso da *P. aeruginosa* encontrada na microbiota intestinal normal e na pele humana. É a espécie frequentemente associada à casos clínicos de infecção, principalmente em casos de pacientes com fibrose cística e imunocomprometidos (LINCOPAN e TRABULSI, 2004). É considerado o patógeno mais comum na fibrose cística, aumentando sua prevalência com a idade do indivíduo (MARQUES, 2011). Evidências sugerem que a maioria dos indivíduos com FC adquire a *P. aeruginosa* através do contato com reservatórios naturais (LI PUMA, 2010; HAUSER *et al.*, 2011). Dificilmente encontra-se um tratamento efetivo para infecções por esse microrganismo, uma vez que ele é capaz de desenvolver grande resistência aos agentes antimicrobianos conhecidos (COSTA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano das espécies *Neomitrantes obscura*, *Myrrhinium atropurpureum*, *Eugenia selloi*, *Eugenia astringens* e *Eugenia arenaria* frente às estirpes ET-12 de *Burkholderia cenocepacia* e PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*, as duas de origem ambiental, consideradas patógenos oportunistas, uma vez que são capazes de causar infecções em humanos imunocomprometidos, em especial aos acometidos por fibrose cística.

2 | METODOLOGIA

2.1 Extração dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae

Para a extração dos óleos essenciais foram utilizadas folhas das espécies *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira, *Eugenia selloi* (O. Berg) B.D. Jacks (*syn* *E. neonitida* Sobral), *Eugenia astringens* Cambess (*syn* *Eugenia rotundifolia* Casar.), *Eugenia arenaria* Cambess. e *Myrrhinium atropurpureum* Schott, encontradas na

restinga de Massambaba ($22^{\circ}55'33''S$ $42^{\circ}16'17''O$) e na restinga de Grumari ($23^{\circ}02'94''S$, $43^{\circ}31'98''O$) (Figura 1). As folhas foram secas em temperatura ambiente. Entre 50 g e 100 g de folhas secas foram utilizadas para extração dos óleos por hidrodestilação. Após terem sido fragmentadas, as folhas foram imersas em água destilada em um balão volumétrico. Em seguida, o balão foi adaptado ao extrator do tipo *Clevenger*. Ao condensador, foi conectado um sistema de refrigeração cíclico, que funciona com uma bomba de aquário captando água gelada armazenada em uma caixa de isopor, reduzindo o gasto de água. Em seguida, foi ligada a manta aquecedora, regulada à temperatura de ebulação da água, em mistura com a biomassa, dando origem ao processo de extração dos óleos essenciais pelo período de 180 ± 30 min.

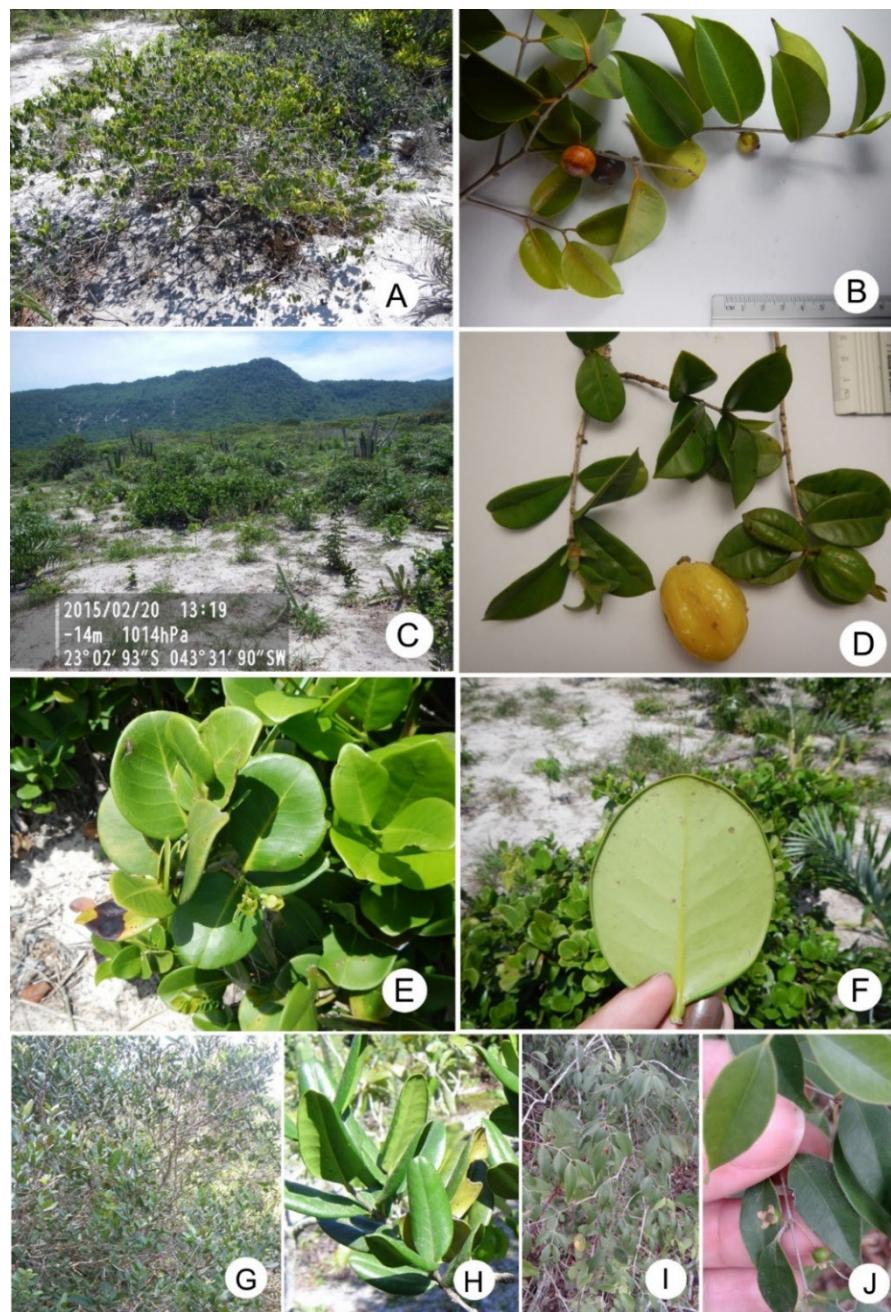


Figura 1: Plantas coletadas nas Restingas. **A.** Restinga de Massmababa, RJ. **B.** Folhas e frutos de *Neomitrannes obscura*. **C.** Restinga de Grumari, **D.** Folhas e frutos de *Eugenia selloi*, **E-F.** *Eugenia astringens*. **G.** Hábito arbustivo *Myrrhinium atropurpureum*. **H.** Folha *M. atropurpureum*. **I.** Hábito arbustivo *Eugenia arenaria*. **J.** Detalhe da folha, flor e fruto de *E. arenaria*.

2.2 Análise dos óleos essenciais

Os óleos obtidos foram analisados por cromatografia a gás com detector por ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia a gás associada à espectrometria de massa (CG-EM). Utilizou-se coluna DB-1 e a programação de temperatura foi de 40°-250°C a 6°C.min⁻¹. Os componentes foram quantificados por CG/DIC e identificados por CG/EM. Os constituintes foram identificados por comparação dos espectros de massas das amostras com a biblioteca de espectros NIST®, e por comparação dos tempos de retenção calculados a partir de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C9 a C24) com os dados disponíveis em literatura especializada (AdamS, 2007).

2.3 Ensaio de atividade antibacteriana

2.3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas as cepas ET-12 de *B. cenocepacia* (amostra J2315 pertencente à genovariante IIIa) e PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa*. As cepas foram cedidas pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

2.3.2 Preparo das suspensões bacterianas

Culturas crioconservadas em freezer (a -4°C) foram inoculadas (25 µL) em 3mL de meio Mueller Hinton II Broth (MHBII-Isofar). As culturas foram homogeneizadas e colocadas no shaker a 150 rpm a 33°C por 18 h. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 4.500 rpm por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, e o pellet formado homogeneizado. Diluições em meio MHII, a partir do pellet bacteriano foram realizadas em um fotocolorímetro (Biochrom, modelo Libra S2) a 680 nm, a fim de obter suspensões bacterianas com DO_{680nm} = 1,3 que é correspondente a 1x10⁸ UFC/mL, utilizadas nos ensaios de difusão em agar.

2.3.3 Método de disco-difusão em agar

A metodologia de disco- difusão em agar foi realizada segundo as normas do Comitê Europeu para Método de Difusão em Disco para Testes de Susceptibilidade e Antimicrobianos (EUCAST 4.0). Foram realizadas diluições seriadas dos óleos essenciais nas concentrações (v/v) de 90%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,56% em meio MHBI em presença de 0,5% de *tween 80*. Os óleos essenciais foram testados frente às cepas ET-12 de *B. cenocepacia* e PAO de *P. aeruginosa*.

Filtros de papel Watman de 5 mm de diâmetro foram embebidos com 10 µL das

diferentes concentrações dos óleos essenciais. O preparo do ágar Müller-Hinton II (Isofar) foi realizado de modo que para placas com 100 mm de diâmetro se obtivesse o volume de 25-30 mL, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4mm, numa superfície horizontal. *Swabs* de algodão estéreis foram embebidos em 3mL de suspensões em meio MHII com suspensões bacterianas contendo 1×10^8 UFC/mL, para inoculação em toda a superfície seca da placa com meio ágar Müller-Hinton. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inoculo. Os discos embebidos nas diferentes concentrações de óleos essenciais foram distribuídos uniformemente, de maneira que a distância de centro para centro não excede 24 mm. O disco não foi reaplicado após ter entrado em contato com a superfície de ágar. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-18 h, após foram realizadas as leituras dos diâmetros (halos de inibição) formados, que foram expressos em mm.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento dos óleos essenciais

A tabela 1 apresenta o rendimento dos óleos essenciais das cinco espécies de *Myrtaceae*. Os resultados expressos em $\mu\text{L/g}$, representam relação entre o volume (μL) de óleo essencial produzido por uma massa (g) de folhas utilizadas em cada processo de extração.

Espécies vegetais	Rendimento ($\mu\text{L/g}$)
<i>Eugenia astringens</i>	$2,06 \pm 0,25$
<i>Eugenia selloi</i>	$5,15 \pm 0,21$
<i>Eugenia arenaria</i>	$5,85 \pm 0,85$
<i>Myrrhinium atroporpureum</i>	$4,03 \pm 0,67$
<i>Neomitranthes obscura</i>	$1,37 \pm 0,57$

Tabela 1 – Rendimento dos óleos essenciais extraídos a partir de folhas de espécies de *Myrtaceae*, por hidrodestilação por 180 min. Os resultados representam médias \pm erro padrão, n= 3.

O processo de extração por hidrodestilação é o mais recomendado pelo baixo custo e praticidade. Neste método o teor e a composição química do óleo essencial podem variar conforme o tempo e a espécie estudada, conforme demonstrou Jantan *et al.* (2003). Optamos por realizar a extração do óleo por 180 min tendo em vista os estudos realizados por Mattanna *et al.* 2015 que avaliaram os efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba - *Pothomorphe umbellata*. Os autores utilizaram seis tempos de extração (90, 120, 150, 180, 210 e 240 min) e observaram que o tempo de 180 min proporcionou o melhor

rendimento do óleo essencial e que a composição química não foi influenciada pelos diferentes tempos de extração. Os autores concluíram que o tempo de extração afeta diretamente o rendimento e a proporção das substâncias químicas, recomendando a extração em até 180 min. O melhor rendimento foi obtido para a espécie *E. arenaria*, seguido pela *E. selloi*, após extração por 180 min.

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os dados obtidos com a metodologia do disco-difusão dos óleos essenciais no ágar não foram reproduutíveis. Portanto, os resultados apresentados (Tabela 2) foram apenas qualitativos, permitindo avaliar apenas as concentrações dos óleos essenciais das espécies vegetais com atividade inibitória. As espécies *E. selloi* e *N. obscura* não apresentaram atividade bactericida, enquanto as outras espécies inibiram o crescimento das bactérias nas concentrações de 25% (*E. arenaria*) e 50% (*E. astringens* e *M. atropurpureum*).

Espécies vegetais	Concentração dos óleos essenciais (vol/vol)	
	ET-12 (%)*	PAO-1 (%)*
<i>Eugenia arenaria</i>	25	25
<i>Eugenia astringens</i>	50	50
<i>Myrrhinium atropurpureum</i>	50	50
<i>Eugenia selloi</i>	NA	NA
<i>Neomitranthes obscura</i> .	NA	NA

Tabela 2 – Efeito inibitório dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae, pelo método de disco-difusão em agar, sob as cepas ET-12 (*Burkholderia cenocepacia*) e PAO-1 (*Pseudomonas aeruginosa*). *NA- Não houve atividade inibitória (n=3).

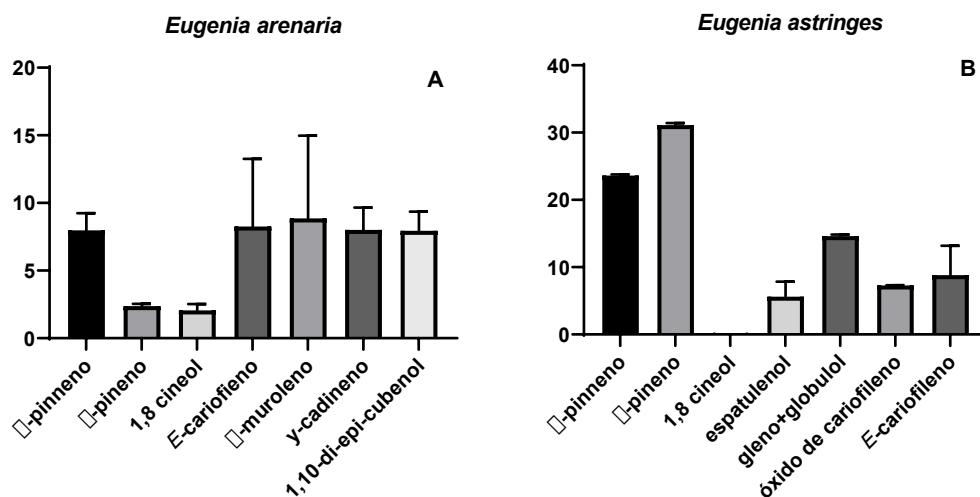
Estudos envolvendo a ação antimicrobiana dos óleos essenciais podem ter vários interferentes, como a volatilidade do óleo, insolubilidade em água, dificuldade de difusão em ágar e complexidade química, por esses e vários outros fatores não é possível comparar diretamente resultados entre autores, visto que não existe uma padronização para a técnica a ser utilizada neste tipo de ensaio (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Outro fator importante está relacionado à turbidez da suspensão que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados. A falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana para óleos essenciais tem sido uma das dificuldades encontradas para a realização desse tipo de estudo (HOOD *et al.*, 2003). Alguns autores relatam que quando se utiliza a técnica de difusão em ágar, pode ocorrer à difusão irregular dos componentes lipofílicos dos óleos essenciais resultando em concentrações desiguais no ágar e causando a formação de regiões com atividade antimicrobiana variável. (SETZER *et al.*, 2004; SOKMEN *et al.*, 2004; HOOD *et al.*, 2003). Estes resultados ainda preliminares nos levam futuramente a

realizar ensaios quantitativos utilizando a metodologia da microdiluição em caldo com os óleos essenciais das espécies que apresentaram atividade bactericida.

3.3 Análise química dos óleos essenciais

Não se verificou atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *E. selloi* e *N. obscura*. A investigação qualitativa e quantitativa dos componentes dos óleos essenciais foi feita para as espécies que apresentaram atividade antimicrobiana: *E. arenaria*, *E. astringens* e *M. atropurpureum*. Os monoterpenos comuns às 3 espécies foram o α-pineno, β-pineno e 1,8-cineol (Figura 2). Para espécie *E. astringens*, esses monoterpenos apresentaram maior concentração. A espécie *E. arenaria* teve a porcentagem maior de sesquiterpenos, enquanto *E. astringens* e *M. atropurpureum* tiveram maior concentração de monoterpenos. Para os sesquiterpenos foi verificada a presença do E-cariofileno em comum às três espécies (Figura 2).

Estudos têm demonstrado que a atividade de mono- e sesquiterpenos se deve à interação que estas substâncias apolares possuem com as membranas celulares dos diferentes microrganismos, alterando a permeabilidade e integridade da célula bacteriana (DANNENBERG et al., 2018). As atividades antimicrobianas dos monoterpenos também estão associadas aos seus grupos funcionais. Os estudos de Ultee et al. (2002), com bactérias *Bacillus cereus*, mostraram que o efeito antibacteriano do timol e do carvacrol foi devido ao seu radical hidroxila (OH^-), que funciona como um transportador transmembrana de cátions monovalentes, responsáveis pelo crescimento das células. Muitos trabalhos têm mostrado o efeito dos pinenos e cariofilenos contra bactérias patogênicas (RAUT e KARUPPAYIL, 2014; TAGHIZADEH et al., 2018). O 1,8-cineol tem se mostrado eficaz em problemas de resistência a antibióticos, tanto no uso isolado quanto em sinergismo com outros antibióticos (ŞİMŞEK e DUMAN, 2017).



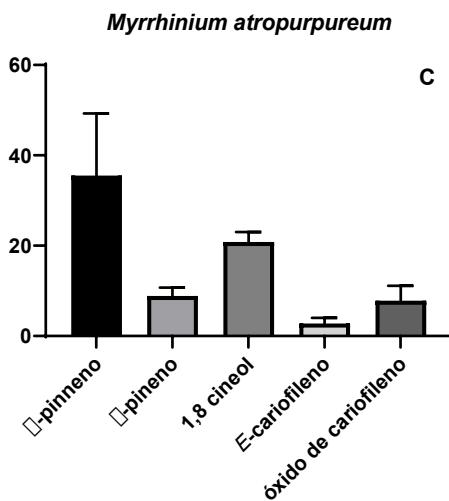


Figura 2. Componentes majoritários dos óleos essenciais de folhas de *Eugenia arenaria*, *E. astringens* e *Myrrhinium atropurpureum* coletadas em restingas do Rio de Janeiro.

4 | CONCLUSÃO

Os óleos essenciais extraídos de *M. atropurpureum*, *E. arenaria* e *E. astringens* apresentaram atividade antibacteriana. Esses dados, embora preliminares, nos levam a especular uma possibilidade do uso desses óleos essenciais na inibição do crescimento bacteriano. Além disso, os componentes identificados possuem atividade anti-inflamatória e antioxidativa, podendo contribuir para a melhoria do quadro pulmonar associado aos pacientes fibrocísticos.

5 | AGRADECIMENTOS

A FAPERJ pelo auxílio APQ-1 - Processo E-26/111.687/2011 e bolsa de TCT concedida a primeira autora (E-26/774/2013). Ao Prof. Marcelo Costa de Souza, curador do herbário da UFRRJ pela identificação das espécies vegetais. E a Prof^a Alessandra Mattos Saliba, UERJ, que cedeu as cepas bacterianas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. AlluredPubl. Corp, Carol Stream, IL., 2007.

ARRUDA, R. C. O.; VICTÓRIO, C. P. **Leaf secretory structure and volatile compounds of *Eugenia copacabanensis* Kiersk. (Myrtaceae)**. Journal of Essential Oil Research, v.23, p. 1-5, 2011.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. **Essential Oils in combination and their antimicrobial properties**. Molecules, Basileia, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Cinnamomum zeylanicum* contra bactérias multiresistentes**. 2009. 98f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, v. 22, p.39-44, 2003.

DANNENBERG, G.S., FUNCK, G.D., SILVA, W.P. et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. *Food Control*, v. 95, p. 115–120, 2018.

EUCAST. **Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing-Version 4.0**, 2014.

FRAUCHES, N. S.; AMARAL, T. O.; LARGUEZA, C. B. D. et al. **Brazilian Myrtaceae fruits: a review of anticancer**. *British Journal of Pharmaceutical Research*, v.2, n.1, p.1-15, 2016.

GIBSON, R.L.; BURNS, J.L.; RAMSEY, B.W. **Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis**. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Nova York, v.168, n.8, p.918–951, 2003

HAUSER, A. R.; JAIN, M.; BAR-MEIR, M. et al. **Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis**. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.24, n.1, p.29–70, 2011.

HOOD, J.R.; WILKINSON J.M.; CAVANAGH H.M.A. **Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research**. *Journal of Essential Oil Research*. v. 15, 428-433, 2003.

JANTAN, I.; LING, Y.E.; ROMLI, S.A **comparative study of the constituents of the essential oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia**. *Journal of Essential Oil Research*, v.15, p.387-91, 2003.

LI PUMA J.J. **The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis**. *Clinic Microbiology*. V. 23, p. 299-323, 2010.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. ***Pseudomonas aeruginosa***. In: TRABULSI, L. R. et al., *Microbiologia*. Atheneu. Ed. 4, cap. 49, p. 359-368, 2004.

LOURENÇO, A. R.L.; BARBOSA, M. R. V. **Myrtaceae em restingas no limite norte de distribuição da Mata Atlântica, Brasil**. *Rodriguésia*, v. 63, n.2, p. 373-393, 2012.

MARQUES, E. A. **Perfil microbiológico na fibrose cística**. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*. p.23-38, 2011.

MATTANA, R.S.; MAIA E ALMEIDA, C.I.; OLIVEIRA, P.F.C. et al. **Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.]**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v.17, n.1, p.150-156, 2015.

NASCIMENTO P. F. C.; NASCIMENTO A. C.; RODRIGUES C. S. et al. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.1, 2007.

RAMOS, M. F. S.; MONTEIRO, S. S.; SILVA, V. P. et al. **Essential Oils From Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga)**. *Journal of Essential Oil Research*. v. 22, p.109- 113, 2010.

RAUT, J. S., KARUPPAYIL, S. M. **A status review on the medicinal properties of essential oils**. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250–264, 2014.

SETZER W.N., VOGLER B., SCHMIDT J.M. et al. **Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil.** Fitoterapia, v. 75, p.192-200, 2004.

ŞİMŞEK, M., DUMAN, R. **Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate.** Pharmacognosy research v. 9, n.3, p. 234-237, 2017.

SPEERT D. P.; HENRY D.; VANDAMME P. et al. **Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis.** Emerging Infectious Diseases. v. 8, n. 2, p.181-187, 2002.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M. et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, HÁ. et al. **The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*.** Food Control, v. 15(8), p.627-634, 2004.

TAGHIZADEH, S.F., DAVARYNEJAD, G., ASILI J. et al. **Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic evaluation of the essential oil from pistachio (*Pistacia khinjuk*) hull.** Microbial Pathogenesis, v. 124, p. 76-81, 2018.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. **The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.** Applied and Environmental Microbiology. v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

VANDAMME P.; DAWYNDT P. **Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future systematic and applied.** Microbiology. v. 34, n.2, p.87-95, 2011.

VICTÓRIO, C. P.; MOREIRA, C. B.; SOUZA, M. C. et al. **Secretory cavities and volatiles of *Myrrhinium atropurpureum* Schott var. *atropurpureum* (Myrtaceae): an endemic species collected in the restingas of Rio de Janeiro, Brazil.** Natural Product Communications. v.6, n.7, p.1045-1050, 2011.

VICTÓRIO, C. P.; AZEVED, A. C.; SILVEIRA, E. G. P. et al. **Leaf essential oils and volatiles, histochemistry and micromorphology of *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira (Myrtaceae) growing in sandy coastal plains of Rio de Janeiro.** Biochemical Systematics and Ecology. v. 78, p.66-76, 2018.

ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Mariane Cristina Mendes

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Fabiana Guillen Moreira Gasparin

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Maria Inês Rezende

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

contendo 1,4 g de BC umedecido com 10 mL de solução de Vogel. O inóculo de *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) e de *Trichoderma asperellum* (*Tha2* e *Tha3*) consistiu de 400 uL de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubados a 28 ± 2 °C por sete dias. O *Thh1* foi melhor produtor de celulases 8,38 U/g em BCU e 6,46 U/g em BCG e de xilanases 0,37 U/g entre os fungos avaliados. A espécie *asperellum*, *Ta1* e *Ta2*, também produziu preferencialmente celulases 4,17 U/g à xilanases 0,15 U/g para ambos os substratos. A atividade de b-glicosidases para *Tha2* e *Tha3* foi superior a encontrada para o *Thh1*, 0,21 U/g e 0,13 U/g, respectivamente. Os resultados mostram que os fungos produziram preferencialmente celulases em BCU, sugerindo o potencial de aplicação e aproveitamento deste resíduo tão abundante no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Celulase, xilanase, b-glicosidase, bagaço de cana de açúcar, *Trichoderma*.

ABSTRACT: Brazil is the largest producer of sugar cane, generating about 147 million tons of sugarcane bagasse per year. This residue could be a important for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes that have several industrial applications, as in the production of biofuels. This present study evaluated the production of cellulases, b-glycosidases and

RESUMO: O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar, gerando mais de 600 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano. Esse resíduo pode ser um importante substrato para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que apresentam diversas aplicações industriais, como a produção de biocombustíveis. O presente estudo avaliou a produção de celulases, b-glicosidases e xilanases em espécies de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana de açúcar (BC). A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada com BC proveniente de: garapeiro local (BCG) e de usina sucroalcooleira (BCU). Os cultivos desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL

xylanases by *Trichoderma* species isolated in the region of Londrina-PR and grown in sugarcane bagasse (SB). Solid state fermentation (SSF) was performed with SB from local commercial sugarcane (SBC) and industry sugarcane bagasse (SBI). Cultures grown in 50 mL Erlenmeyers containing 1.4 g of BC were moistened with 10 mL of Vogel's solution. The inoculum of *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) and *Trichoderma asperellum* (*Tha2* and *Tha3*) consisted of 400 µl of 0.1% (v / v) tween 80 solution containing 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubated at 28 ± 2 ° C for seven days. *Thh1* was the best producer of cellulases (with) 8.38 U/g in SBI and 6.46 U/g in SBC and xylanases 0.37 U/g among the evaluated fungi, the species *T. asperellum*, *Tha2* and *Tha3*, also produced cellulases preferentially 4.17 U/g than xylanases 0.15 U/g for both substrates. The activity of b-glycosidases for *Tha2* and *Tha3* was higher when compared with the result found for *Thh1*, 0.21 U/g and 0.13 U/g, respectively. The results show that the fungi preferentially produced cellulases in SBI, suggesting their potential application to the use of this residue so abundant in Brazil.

KEYWORDS: Cellulase, xylanase, b-glucosidase, sugarcane bagasse, *Trichoderma*.

1 | INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar para a produção de açúcar e etanol. A produção de açúcar foi mais que triplicada de 1993 até 2001, e atualmente o país é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2019). Aproximadamente 722 milhões de toneladas de cana de açúcar foram colhidas em 2010, e em 2013 esse valor atingiu 768 milhões de toneladas, Figura 1, (IBGE, 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana de açúcar estimada entre os anos de 2018 e 2019 ficou em 635,51 milhões de toneladas representando um aumento de 0,4 % em relação a safra de 2017/18 (NOVA CANA, 2019).

Decorrente da produção de cana de açúcar vem a geração de milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar, cerca de 30 % do total produzido é convertido em bagaço de cana de açúcar, quantidades superiores a 200 milhões de toneladas por ano (NOVA CANA, 2017). Parte do bagaço de cana é utilizado na própria indústria para a co-geração de energia, porém, ainda restam quantidades expressivas desse resíduo agroindustrial que podem ser utilizados em processos fermentativos para a geração de novos produtos de alto valor agregado.

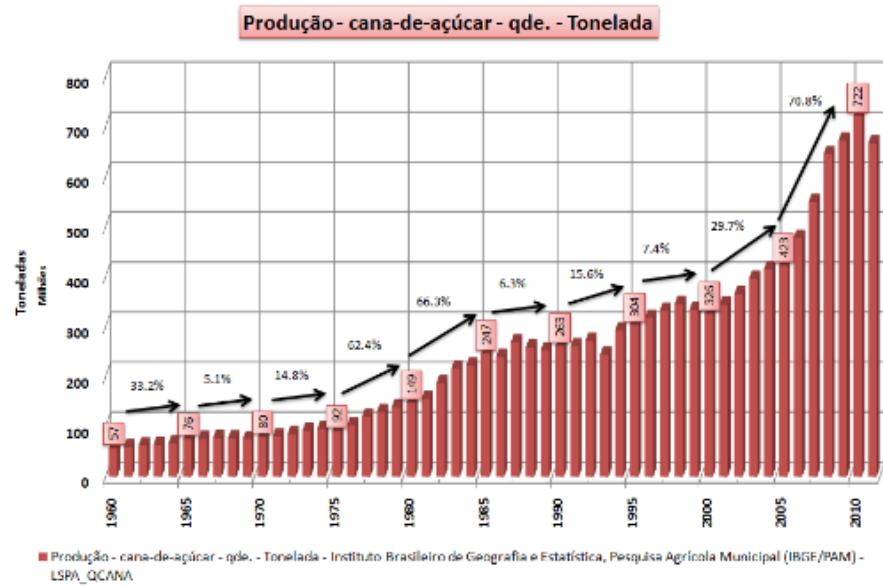


Figura 1. Produção de cana de açúcar no Brasil nos últimos 50 anos.

Fonte: IBGE, 2010.

Esse material é fonte de energia renovável sendo composto por 39,7 a 49 % de carbono, 40 a 46 % de oxigênio, 5,5 a 7,4 % de hidrogênio e até 0,3 % de nitrogênio e cinzas, podendo ser utilizado em processos fermentativos como fonte de carbono (SILVA et al., 2007; COSTA; BOCCHI, 2012).

A fermentação em estado sólido (FES) é a utilização de um material sólido e orgânico, o substrato, que será umidificado e servirá como suporte para o aumento do número de células. A água presente deve assegurar o crescimento e metabolismo das células microbianas sem exceder a capacidade de ligação com a matriz sólida, ou seja, ausência de água livre. A ligação da água com a fase sólida depende da capacidade de absorção do substrato que está sujeito ao tipo de material utilizado (SOCCOL, et al., 2017).

A fase sólida da FES é fonte de carbono e nitrogênio servindo como nutrientes para o crescimento de microrganismos na ausência de água livre. O tamanho das partículas do substrato é importante para que haja aeração, onde o oxigênio deverá ser capaz de alcançar os espaços entre o meio. Dessa forma, é um processo trifásico, constituído de sólidos, líquidos e gases (PINTO et al., 2005; PANDEY; THOMAS; LARROCHE, 2013).

A FES é capaz de reproduzir o modo de crescimento dos microrganismos na natureza. Aparentemente, esse fator é muito importante para os altos rendimentos que esse tipo de fermentação demonstra (NIGAM; PANDEY, 2009). Os fungos conseguem crescer em condições baixas de umidade e tolerar alta pressão osmótica, se destacando nesse tipo de fermentação (FARINAS, 2015).

O gênero *Trichoderma spp.* é bastante relatado por produzir enzimas celulolíticas e xilanolíticas com altas atividades, e muitos estudos tem focado na produção dessas enzimas (SEIBOTH, IVANOVA e SEIBOTH, 2011). Esses microrganismos são de

fácil cultivo, com produção de níveis elevados de enzimas e não causam doenças ao homem, assim são empregados em processos industriais (KAR et al., 2006; AZIN, MORAVEJ e ZAREH, 2007).

As celulases, b-glicosidases e xilanases são enzimas que atuam sobre a celulose e hemicelulose, compostos presentes no material vegetal. As celulases são responsáveis pelo início da hidrólise e pela rápida solubilização do polímero de celulose, pois hidrolisam as regiões internas da estrutura da fibra celulósica liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (LYND et al., 2002; CASTRO; PEREIRA, 2010). A b-glicosidase é responsável pela degradação final da celulose, hidrolisando os oligossacarídeos liberados pela celulase em glicose (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005). A completa e eficiente hidrólise do polímero de xilana depende principalmente de duas classes de enzimas, as endo-b-1,4 xilanases, que hidrolisam as unidades de xilanopiranose da cadeia principal e as b-xilosidases, que hidrolisam a xilobiose e outros xiolo-oligossacarídeos resultantes da ação das endoxilanases (SAHA, 2003; SHAO et al., 2011).

De todas as enzimas produzidas comercialmente, 75 % compreendem ao grupo das hidrolases, sendo as mais importantes as celulases, amilases e hemicelulases (BHAT et al., 2000; SRIVASTAVA et al., 2014).

As celulases são importantes para a indústria têxtil uma vez que, são capazes de degradar as fibras de superfície do tecido, deixando os mais lisos e macios, proporcionando, com isso, melhor acabamento. No processo de envelhecimento do jeans utilizava-se pedra-pomes, hoje as celulases fazem a remoção parcial do corante índigo, oferecendo vantagens para o processo, como evitar o desgaste dos equipamentos, do tecido e aumentam a qualidade do produto diminuindo a necessidade de abrasão (LOPES, 2011).

Graças a capacidade de degradar a rede de celulose, as celulases ajudam a liberar o líquido das células vegetais, facilitando a extração de sucos e a maceração de frutas para a produção de néctares (MARTINS et al., 2008).

A indústria de ração animal também se beneficia pela ação dessas enzimas, pois aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal. Na indústria de polpa e papel auxiliam no branqueamento e alisamento do papel. Porém, ultimamente, o foco de estudos para essas enzimas está na produção de etanol, utilizando microrganismos que sejam capazes de crescer em resíduos agroindustriais (LIMA et al., 2005; CASTRO; PEREIRA, 2010).

Os processos de vinificação se beneficiam com a aplicação das beta-glicosidases, pois auxiliam na extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva. Essas hidrolases também são capazes de melhorar o aroma e o sabor do vinho (MARTINS et al., 2008). Além disso, apresentam ação antioxidante pela liberação de oligossacarídeos e glicoconjugados na hidrólise enzimática de celulose (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005).

Os estudos de Lima, (2003) também relatam a importância das b-glicosidases na

retirada da molécula de glicose das isoflavonas, aumentando a biodisponibilidade de isoflavonas agliconadas, que são relatadas importante na prevenção da osteoporose (BAUERMEISTER et al., 2010).

A utilização das xilanases no branqueamento de polpas de celulose diminuem a utilização de produtos organoclorados altamente recalcitrantes no ambiente, pois essas enzimas substituem o emprego do cloro e dióxido de cloro que são químicos tóxicos usados na indústria de papel (AHMED; IMDAD; JAMIL, 2012).

Graças a capacidade de conversão do material lignocelulósico, as xilanases são utilizadas na clarificação de sucos, para melhorar a consistência de cervejas. E após a hidrólise enzimática da xilana a produção de xiolo-oligossacarídeos que podem ser empregados na produção de prebióticos. Esses evitam infecções e a constipação intestinais, além de favorecer a absorção de nutrientes (PAI et al., 2013).

As xilanases também são utilizadas para a produção de ração animal. Elas podem aumentar a energia metabolizável e diminuir a viscosidade das rações, favorecendo o ganho de peso de animais (LI et al., 2012).

De modo geral, as enzimas citadas são importantes e empregadas nos setores da indústria têxtil, alimentícia e de rações para animais (BHAT et al., 2000). Outras aplicações também são relatadas como: fermentação de cerveja; extração de café; detergentes; produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos; conservantes de alimentos e agentes antimicrobianos (KATAPODIS et al., 2006; SCHUTER; SCHMOLL, 2010).

O presente estudo avaliou a potencial produção de celulases, xilanases e β -glicosidases por espécies de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana (BC).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas três linhagens de *Trichoderma* isoladas de diferentes solos de cultivo. *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) foi isolado de peroba em decomposição na Universidade Estadual de Londrina, e as outras duas de *Trichoderma asperellum* (*Tha1* e *Tha2*) que foram isoladas de cultivo de milho na região de Londrina-PR.

Os microrganismos foram mantidos em ágar inclinado 2 % (m/v), contendo sais de Vogel e xirole 1 % como fonte de carbono. Repiques sucessivos foram feitos a cada 3 meses.

O bagaço de cana de açúcar (BC) foi obtido de duas fontes. Um lote foi cedido pela Usina Clealco, Penápolis-SP (BCU) e utilizado como obtido e outro de garapeiro local, Londrina-PR, (BCG) este foi lavado exaustivamente em água corrente, triturado em pulverizador, e então seco em estufa a 70 °C.

Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo 1,4 g de BC umedecido com 10 mL de solução de Vogel. O inóculo consistiu de 400 μ L de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubados a 28 ± 2 °C por 7 dias.

Também foram realizados cultivos controle, nas mesmas condições mencionadas, porém, ausentes de microrganismo. Ao material sólido fermentado (MSF) foram adicionados 10 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 9.000 rpm/15 min, o sobrenadante foi o extrato bruto enzimático (EBE), e o MSF foi seco em estufa a 70 °C por 24 horas para determinação do peso seco.

No EBE foram determinados: atividade enzimática (xilanases, celulases e β -glicosidases), açúcares totais, redutores e proteínas totais solúveis residuais e pH (inicial e final).

O sistema de incubação para determinação da atividade celulásica consistiu de 1 % de carboximetilcelulose (CMC) dissolvida em tampão citrato 50 mM pH 5,0 (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição do ácido dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados foram determinados segundo a técnica descrita por Miller, 1958. Uma unidade de atividade celulásica é definida como a quantidade de enzima que libera μ moles de glicose por minuto por mL do extrato enzimático.

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando ρ -nitrofenol glicosídeo (ρ -NPG) 1 Mm dissolvido em tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5,0. O sistema foi mantido a 30 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,5 M. A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de beta-glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ M ρ -NP min-1, nas condições experimentais.

O sistema de incubação para a atividade da xilanase consistiu de 1 % de xilana de “Larchwood” e tampão acetato 50 mM pH 5,0 (BAILEY; BIELY; POUNTANEN, 1992). O ensaio foi mantido à 50 °C por 20 minutos e interrompido pela adição do reativo de Somogyi. Os açúcares redutores liberados foram então determinados através da técnica descrita por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Uma unidade de atividade xilanásica é definida como a quantidade de enzima que libera μ moles de xilose por minuto por ml do extrato enzimático.

A determinação de proteínas totais foi pelo método de Lowry. As leituras no espectrofotômetro ocorreram na faixa de 660 nm. Os açúcares totais foram feitos através do método do fenol sulfúrico. As leituras aconteceram na absorbância de 480 nm. E os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogy-Nelson. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm.

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism Software (versão 5.0). A significância estatística dos dados foi avaliada por one-way-ANOVA com post-hoc teste de Tukey. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH final dos meios de cultivo ficou em torno de 7, um valor considerado neutro, diferente dos cultivos controle que não continham microrganismo e resultaram em pH 5. De acordo com Prakasham et al., (2006) o pH do meio de crescimento influência a transferência de componentes por meio da membrana plasmática e também a atividade enzimática, afetando com isso o desenvolvimento, crescimento e formação de produtos. Valores de pH muito ácido ou básicos afetam a estrutura tridimensional das enzimas metabólicas produzidas pelos microrganismos diminuindo ou cessando seu crescimento.

Em relação ao material sólido fermentado (MSF), o cultivo controle teve um MSF de 1,2 g permanecendo próximo a quantidade de bagaço de cana inicial ao cultivo, 1,4 g, sendo que a diferença de 0,2 g representa a umidade presente no substrato. As cepas mostraram diminuição do peso seco, valores próximos ou menores que 1 g, em relação ao valor inicial, sugerindo a sacarificação do material vegetal.

Os resultados presentem na Figura 2 mostraram que as três linhagens foram capazes de crescer nos dois substratos avaliados e consequentemente produzir as hidrolases. O *Thh1* foi o melhor produtor de celulases 33,6 U/g em BCU e 33,08 U/g em BCG. *Tha3* produziu 25,77 U/g em BCU, e *Tha2* produziu as menores atividades de celulase entre os analisados 20,83 U/g em ambos os substratos, BCG e BCU. *Tha2* e *Tha3* foram capazes de produzir β-glicosidases mais ativas em BCU em relação a *Thh1*, 0,41 U/g; 0,44 U/g e 0,17 U/g, respectivamente. *Thh1* também foi o que produziu as maiores atividades de xilanase entre os estudados 0,4 U/g em ambos os substratos, BCG e BCU, *Tha2* em BCU foi o menor produtor de xilanases, 0,2 U/g. A Figura 2 apresenta a produção da celulase, b-glicosidase e xilanase pelos isolados de *Trichoderma*. As atividades representam a média ± desvio padrão da média dos experimentos. Valores com letras iguais não apresentam diferença significativa enquanto valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Na pesquisa de Delabona et al., (2012) *T. harzianum* isolado da floresta amazônica e cultivado em bagaço de cana também foi capaz de produzir as enzimas celulase, xilanase e b-glicosidase nas seguintes quantidades, 121 U/g; 8000 U/g e 1730 U/g, produzindo preferencialmente xilanases, o mesmo foi relatado quando essa espécie foi cultivada em palha de arroz, 111,31 U/g de celulase, 433,75 U/g de xilanase e 173,71 U/g de b-glicosidase (RAHNAMA et al., 2013). Porém, os resultados encontrados foram contrários a esse estudo, onde a enzima que apresentou mais atividade foi a celulase, sugerindo que de acordo com a origem do substrato, as condições de cultivo e origem do isolado utilizado a atividade enzimática é diferente.

Nos estudos de Nava-Cruz et al., (2016) *T. asperellum* cultivado em fibras de *Agave atrovirens*, obteve na produção de celulases 12,86 U/g, no presente trabalho a mesma espécie foi capaz de produzir celulases mais ativas, 25,86 U/g (*Tha3*, BCU). Apesar do fungo produzir b-glicosidase quando cultivado em bagaço de cana, 0,37 U/g,

os níveis de atividade não foram satisfatórios em relação ao cultivo de *T. asperellum* em *Agave atrovirens*, 3144,4 U/g.

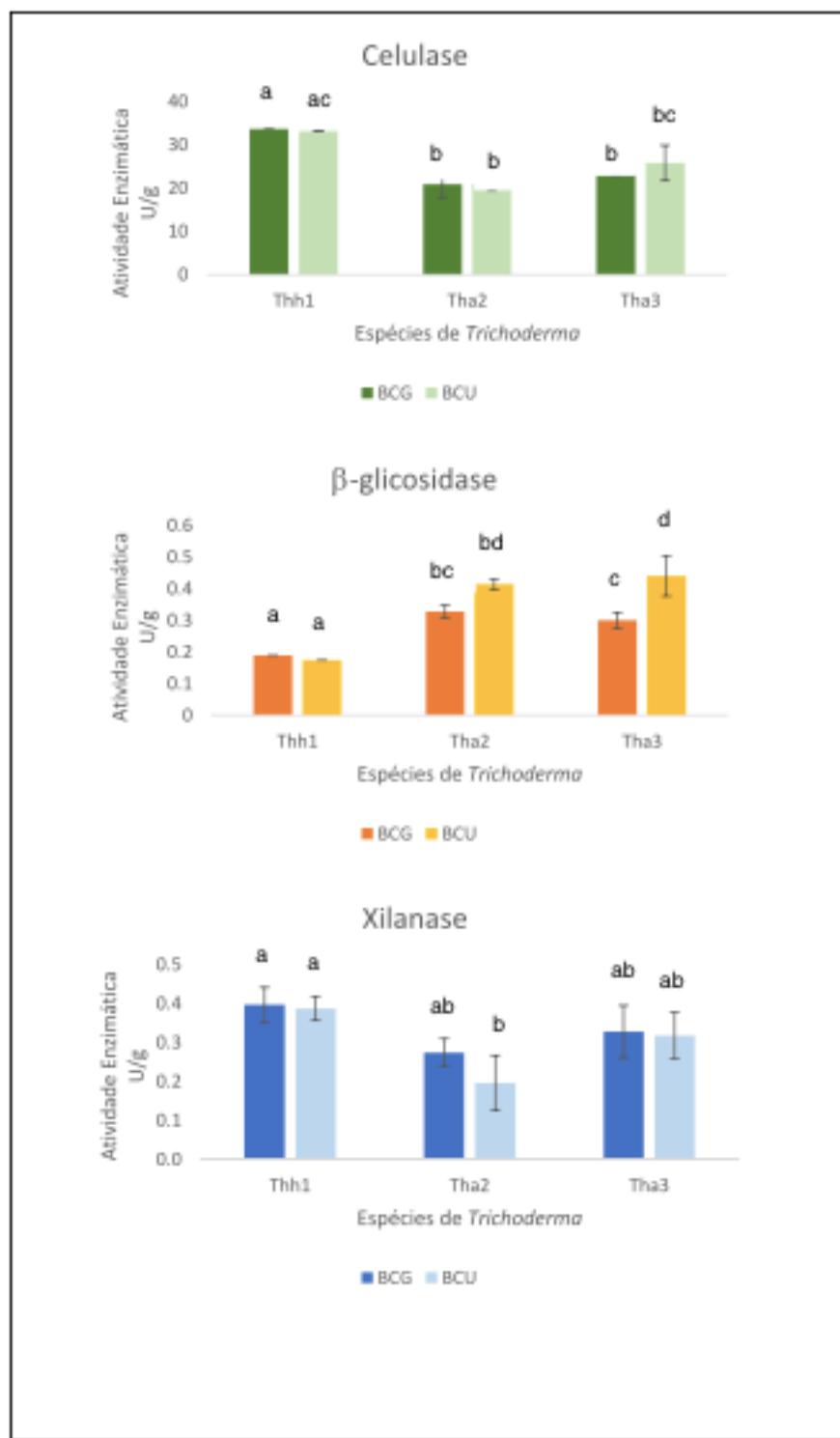


Figura 2. Atividade de celulase, b-glicosidase e xilanase pelos *T. harzianum* (*Thh1*), *T. asperellum* (*Tha2*) e *Trichoderma harzianum* (*Tha3*) cultivados em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido.

A Figura 3 apresenta a comparação das concentrações de proteínas, açúcares totais e açúcares redutores solúveis residuais determinadas no extrato bruto dos cultivos em BCG e BCU. É possível observar que nos dois substratos avaliados, BCG e BCU, as proteínas totais solúveis aumentaram mais de 2 vezes em relação ao

controle, indicando a produção de proteínas extracelulares pelos fungos, e entre elas, as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Os açúcares totais presentes no controle do BCG estavam em maiores níveis em comparação ao BCU, 1,21 mg/mL e 0,33 mg/mL, respectivamente mostrando a diferença da composição dos substratos de origens diferentes. Levando em consideração que o BCU já passou por diversos processamentos na Usina para a produção de açúcar e etanol e seus açúcares foram utilizados, porém, esse fato não afetou no desenvolvimento das cepas durante o cultivo, indicando que os fungos são capazes de sacrificar as fibras de celulose e hemicelulose para o seu desenvolvimento.

Em relação aos açúcares redutores, o controle de BCG também apresenta quantidades maiores de açúcares redutores que o controle de BCU, 5,5 mg/mL e 0,02 mg/mL, porém, os fungos cultivados em BCU produziram maiores quantidade de açúcares redutores em comparação ao cultivo em BCG, quase 2 vezes mais. Assim, em BCU os microrganismos necessitam secretar enzimas extracelulares capazes de hidrolisar o material vegetal afim de liberar açúcares para o seu desenvolvimento, diferente de quando são cultivados em BCG, um material rico em açúcares, onde utilizam os açúcares solúveis do meio para o seu crescimento. As cepas *Tha2* e *Tha3* ambas no BCG se aproximaram da quantidade de açúcares redutores produzidos pelo controle BCG, com 1,18 mg/mL e a cepa *Tha3* BCU foi a com menor produção, 0,53 mg/mL, esse fato indica que os fungos consomem os açúcares disponíveis no meio, utilizam para o seu crescimento e posteriormente produzem enzimas extracelulares para hidrolisar o material vegetal.

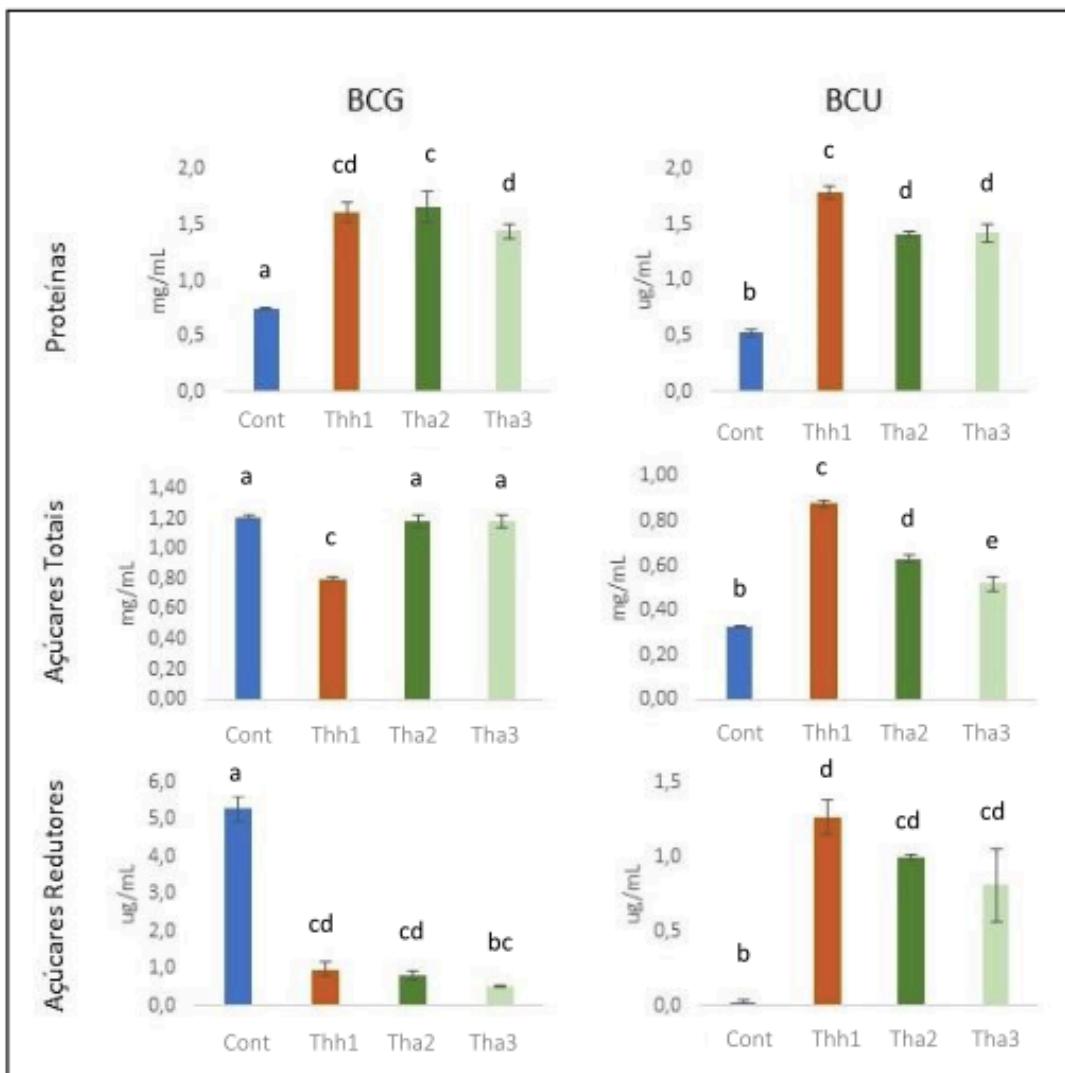


Figura 3. Comparação das concentrações de proteínas totais, açúcares totais e açúcares redutores residuais determinadas no extrato bruto enzimático dos cultivos de *Trichoderma harzianum* (*Thh1*), *Trichoderma asperellum* (*Tha2*) e *Thichoderma asperellum* (*Tha3*) cultivados em bagaço de cana de açúcar, BCG e BCU, por 7 dias a 28 ± 2 °C sob fermentação em estado sólido.

BCG: bagaço de cana de açúcar proveniente do garapeiro; BCU: bagaço de cana de açúcar obtido da usina;
Cont: controle; *Thh1*: *Trichoderma harzianum*; *Tha2* e *Tha3*: *Trichoderma asperellum*.

4 | CONCLUSÃO

No material sólido fermentado foi observado uma redução da sua massa quando os microrganismos foram cultivados, indicando sua sacarificação pelos mesmos. Esse tipo de análise não apresenta relatos na literatura até o momento.

Trichoderma harzianum e os dois *Trichoderma asperellum* isolados de peroba e de solos de cultivo de milho, respectivamente, foram capazes de produzir as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em bagaço de cana proveniente de duas fontes: de indústria sucroalcooleira (BCU) e de garapeiro (BCG) sob fermentação em estado sólido.

As celulases foram as enzimas mais ativas produzidas pelos fungos filamentosos em ambos os substratos, BCG e BCU sob fermentação em estado sólido. *Tha3*

em BCU foi o maior produtor de b-glicosidase entre os estudados. *Thh1* produziu preferencialmente xilanases em comparação a *Tha2* e *Tha3*.

BCG e BCU apresentaram quantidades semelhantes de proteínas e todos os isolados foram capazes de produzir concentrações maiores de proteína em relação ao controle, indicando a produção de enzimas extracelulares por esses fungos.

Em relação aos açúcares totais e açúcares redutores totais residuais o cultivo controle de BCG apresentou maior concentração em relação ao cultivo controle de BCU, pois esse último passou por processamentos na indústria para a obtenção do caldo de cana e produção de açúcar e etanol, diferentemente do BCG que foi apenas espremido para a venda do caldo de cana. Dessa forma, BCG apresentava açúcares solúveis disponíveis para serem utilizados pelos *Trichoderma* durante seu desenvolvimento, não precisando produzir maiores concentrações de enzimas extracelulares para sacarificar o material vegetal como quando cultivado em BCU, que apresentou maior concentração de açúcares totais e redutores produzidos nos cultivos pelos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; IMDAD, S. S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, n.3, 2012.
- AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 801-805, 2007.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GEISE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. b-1,3-glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, 2010.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18: 355-83, 2000.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2019). Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-safra-2018-19-cana-de-acucar-210818>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.
- COSTA, W. L. S.; BOCCCHI, M. L.M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n.1, 2012.
- DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site celulase production. **Bioresouce Technology**, v.107, p. 517-521, 2012.

FARINAS, C. S. **A Parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 233-244, 2005.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 233-244, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf>. Acesso 10 janeiro 2019.

KAR, S.; MANDAL, A.; DAS MOHAPATRA, K. P.; MONDAL, C. K.; PATI, R. B. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 462-464, 2006.

KATAPODIS, P., NERINCKX, W., CLAEYSSENS, M., CHISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular bxylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2402–2409, 2006.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, e201209017, 2012.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LOPES, C. S. D. Análise ambiental da fase de acabamento do jeans. Interfacehs **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 6, n. 3, p. 87-102, 2011.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. Degradabilidade de volumosos utilizando enzimas fibrolíticas. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435-442, 2008.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wine. **Journal of chromatography a**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wine. **Journal of chromatography a**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anai Chem.**, p. 426-428, 1958.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anai Chem.**, p. 426-428, 1958.

NAVA-CRUZ, N. Y.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR-GONZALÉZ, M. A.; NUNCIO, A.;

RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. **3 Biotech**, v. 6, p. 115, 2016.

NIGAM, P.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization. **Springer Science, Netherlands**, p. 466, 2009.

PAI, K. C.; CHEN, W. J.; ZENG, Y. F.; TUNG, C. L.; LIU, R. J. Cloning of the bifunctional xylanolytic enzyme gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* S20. Department of Life Science, National Taiwan Normal University, 2013.

PANDEY, A.; THOMAS, L.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, n. 81, p. 146-161, 2013.

PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESSAN, S. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04rought solid-state fermentation. **Arab J Sci Eng**, v. 42, p. 53-63, 2017.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólida: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa**, p. 2-5, 2005.

PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SHARMA, P. N. Gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v. 97, 1449-1460, 2006.

RAHNAMA, N.; MAMAT, S.; SHAH, U. K. M.; LING, F. H.; RAHMAN, N. A. A.; ARRIF, A. B. Effect of Alkali Pretreatment of Rice Straw on Cellulase and Xylanase Production by Local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under Solid State Fermentation. **BioResources** v. 8, n. 2, 2013.

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C. e SEIBOTH, C. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 13, p. 310-340, 2011.

SCHUTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Application Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SHAO, W.; XUE, Y.; WU, A.; KATAEVA, I.; PEI, J.; WU, H.; WIEGEL, J. Characterization of a novel β -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 719–726, 2011.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 3, n. 1, p. 27-32, 2007.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E TEMPO DE REAÇÃO NA HIDRÓLISE DA LACTOSE

Poline Wilke

Universidade Federal do Paraná
Palotina - Paraná

Karen Jaqueline Haselroth

Universidade Federal do Paraná
Palotina - Paraná

Raquel Ströher

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Engenharias e Exatas
Palotina - Paraná

muito utilizado para analisar a porcentagem de glicídios redutores presentes. Muitos fatores influenciam na reação de hidrólise. Neste trabalho objetivou-se avaliar a influência da temperatura, concentração de enzima e tempo de reação na hidrólise da lactose utilizando uma enzima comercial. Foram avaliadas três diferentes concentrações de enzima (0,2, 0,4 e 0,8 g.L⁻¹), três temperaturas (25, 40 e 60 °C) em intervalos de 1 hora (após 1, 2, 3 e 4 horas de reação). A condição que apresentou o melhor resultado foi utilizando 0,8 g.L⁻¹ da enzima lactase a 40°C depois de 4 horas de reação, alcançando 99,6% de rendimento da hidrólise. Esse valor se encaixa nos padrões requeridos pela legislação brasileira para que o leite seja considerado “sem lactose”.

PALAVRAS-CHAVE: Intolerância à lactose, lactase, carboidratos redutores.

ABSTRACT: Milk is a food highly consumed especially during the childhood due to the importance of their proteins. The predominant milk sugar is lactose - a disaccharide composed by glucose and galactose that has the glycosidic connection disrupted by the enzyme lactase. After breastfeeding usually occurs a decrease in the enzyme activity, that causes symptoms of lactose intolerance. Because of this and the importance of milk consumption, the market for low-lactose products has been increasing,

RESUMO: O leite é um alimento altamente consumido, especialmente durante a infância, devido à importância de suas proteínas. O açúcar predominante é a lactose – um dissacarídeo composto por glucose e galactose que tem sua ligação glicosídica rompida pela ação da enzima lactase. Após a fase de amamentação, ocorre uma diminuição da atividade enzimática, provocando sintomas de intolerância à lactose. Devido à isso e à importância do consumo de leite, o mercado de produtos com baixo teor de lactose tem crescido, permitindo que pessoas intolerantes consumam produtos lácteos. Para romper as moléculas de lactose pode-se utilizar a hidrólise química ou enzimática – a química requer condições extremas de pH e temperatura e, portanto, a enzimática é mais apropriada para produtos alimentícios. Para quantificar o açúcar do leite, o método de Lane-Eynon é

allowing intolerant people to consume dairy products. To disrupt the lactose molecules can be used the enzymatic or chemical hydrolysis - the chemical requires extreme pH and temperature conditions, so the enzymatic hydrolysis is the most appropriate for food products. To quantify the milk sugar the Lane-Eynon method is widely used, which enables to analyze the percentage of reducing carbohydrates presents in the sample. Many factors can influence the hydrolysis reaction. In this work was evaluated the influence of temperature, enzyme concentration and reaction time on lactose hydrolysis using a commercial lactase enzyme. Were evaluated three different concentrations of enzyme (0.2, 0.4 and 0.8 g.L⁻¹), three temperatures (25, 40 and 60 °C) at 1 hour intervals (after 1, 2, 3 and 4 hours of reaction). The condition that showed the best result was the one with 0.8 g.L⁻¹ lactase enzyme at 40 °C after 4 hours reaction obtaining a hydrolysis yield of 99.6%. This value fits on the standard required by brazilian law, then the milk can be considered "lactose free".

KEYWORDS: Lactose intolerance, lactase, reducing carbohydrates.

1 | INTRODUÇÃO

O leite é uma importante fonte de alimento para os mamíferos, pois apresenta alto valor nutritivo, sendo rico em proteínas, minerais, vitaminas e carboidratos. Além disso, é de fácil acesso à grande parte da população (TÉO, 2002; FOPPA *et al.*, 2009). Além disso, é uma importante fonte de cálcio, proteína, potássio, fósforo, magnésio e zinco, que são fundamentais na manutenção dos processos fisiológicos, e por isso é tão importante na alimentação de crianças (TÉO, 2002).

Apesar de possuir uma grande quantidade de lipídeos, é pela qualidade das proteínas presentes neste alimento que ele é tão consumido; dentre as proteínas presentes, destacam-se a caseína (que corresponde a cerca de 85% das proteínas), globulina e albumina (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Este é um alimento que apresenta algumas propriedades características, como sabor ligeiramente adocicado (principalmente devido ao teor de lactose), cor branco-amarelada e opaca, viscosidade média de 2,2 a 20 °C, seu ponto de fusão ocorre aproximadamente a -0,55 °C e de ebulição a 100,17 °C, e seu pH varia de 6,5 a 6,7 (BRITO; BRITO, 1998).

Segundo o Decreto nº 30691 de 20 de março de 1952, o leite considerado normal apresenta, entre outras características, acidez entre 15 e 20 graus Dornic, densidade a 15 °C entre 1,028 e 1,033, teor de lactose de no mínimo 4,3% e índice crioscópico mínimo de -0,55 °C (BRASIL, 1952).

Os maiores componentes do leite são água, proteína, gordura e carboidrato (lactose). A quantidade de cada um destes componentes pode ter algumas variações, especialmente as proteínas e a gordura, mesmo entre animais da mesma raça; porém a lactose se mantém praticamente constante entre as raças, variando seu teor apenas quando comparando leites de espécies diferentes (GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003).

O carboidrato predominante no leite é a lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), um dissacarídeo composto por glicose e galactose; é considerado por muitos autores como o único açúcar ali presente pois a quantidade de outros carboidratos é tão pequena que pode ser desconsiderada (SENER; APAR; ÖZBEK, 2006).

Os carboidratos são a principal fonte de energia em uma dieta comum, representando cerca de 60% de seu valor calórico diário. O tipo de carboidrato consumido varia de acordo com a diversidade da dieta, porém, em crianças em fase de aleitamento materno, a lactose é o tipo predominante de açúcar consumido (TÉO, 2002).

Este açúcar é sintetizado nas células da glândula mamária e é composto por dois monossacarídeos: glicose e galactose, unidos por uma ligação glicosídica (β -1→4) (SANTOS *et al.*, 2014). Ele é hidrolisado pela enzima intestinal β -galactosidase, liberando seus componentes para absorção na corrente sanguínea; a atividade desta enzima é alta no período de amamentação, mas diminui após o desmame (BARBOSA; ANDREAZZI, 2011).

A lactose apresenta mesma fórmula molecular da sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) diferindo apenas na sua configuração molecular. Porém, ao contrário da sacarose, a lactose possui uma hidroxila anomérica livre, e por isso é considerado um açúcar redutor e a sacarose não (VALSECHI, 2001).

Os açúcares redutores (ou glicídios redutores) são assim classificados por possuírem grupos que se oxidam em soluções alcalinas se estiverem na presença de agentes oxidantes (CAMPOS *et al.*, 2014).

Segundo Foppa *et al.* (2009), as propriedades que se destacam na lactose são as seguintes: na criança em fase de amamentação ela exerce uma ação positiva sobre sua flora lática intestinal, constitui uma importante fonte de energia, contribui para a acidificação do tubo e auxilia a assimilação de algumas substâncias tais como proteínas e colesterol.

Porém, uma grande desvantagem da lactose é o fato de ela não ser facilmente degradada por grande parte da população humana após a fase de aleitamento materno, ocasionando sintomas de intolerância à lactose (PRETTO *et al.*, 2002; MATTAR; MAZO, 2010). De acordo com Pereira *et al.* (2012), estima-se que cerca de 65% da população mundial apresenta algum grau de intolerância à lactose.

Para evitar os problemas ocasionados pela intolerância à lactose é recomendado que os indivíduos intolerantes deixem de consumir leite; porém, assim, deixariam de usufruir de outros benefícios que o leite traz à saúde humana. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos que diminuam a quantidade deste açúcar, como o leite com baixo teor de lactose, onde esta é hidrolisada (CUNHA *et al.*, 2007).

A hidrólise da lactose é a quebra desta molécula em glicose e galactose. Após o rompimento da molécula, estes componentes monossacarídicos são liberados para absorção na corrente sanguínea; em seguida são transportados até o fígado, onde a galactose é convertida em glicose, principal combustível metabólico de muitas células

(SANTOS *et al.*, 2014).

Além da enorme vantagem proporcionada às pessoas intolerantes à lactose permitindo-as o consumo de leite e seus derivados, a hidrólise deste açúcar também traz outros benefícios aos alimentos. Este processo ajuda a prevenir a cristalização de diversos produtos lácteos, como o doce de leite, leite condensado e misturas para sorvetes, melhora as características organolépticas destes alimentos, dá mais cremosidade ao sorvete e diminui o tempo de maturação de alguns tipos de queijos (SANTIAGO *et al.*, 2004).

A lactose pode ser hidrolisada por processos ácidos ou enzimático. A hidrólise ácida é um processo que apresenta um alto grau de conversão em um tempo muito curto; porém, pode provocar a desnaturação de proteínas, a formação de subprodutos indesejados, além de uma coloração marrom na solução e, por isso, não é recomendado em produtos alimentícios (CARMINATTI, 2001).

Já o processo enzimático é menos severo, realizado em condições mais amenas de temperatura e pH (SENER; APAR; ÖZBEK, 2006). Este método não necessita de tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as qualidades da matéria-prima aumentando apenas a sua doçura. Este tipo de hidrólise é utilizado em escala industrial, uma vez que, devido ao fato de não necessitar de condições extremas de temperatura ou pH, permite uma maior economia energética (LONGO, 2006).

A hidrólise enzimática da lactose em glicose e galactose é catalisada por enzimas chamadas β -galactosidases (E.C. 3.2.1.108) também conhecidas como lactases. Essa enzima pode ser obtida através de diversas fontes: plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras (CUNHA *et al.*, 2008) e é classificada como uma hidrolase pelo tipo de reação que catalisa. É uma enzima que fica situada no enterócito, um tipo de célula epitelial (JUNIOR; KASHIWABARA; SILVA, 2013).

A lactase age no leite, quebrando a ligação da lactose utilizando uma molécula de água e produzindo glicose e galactose, açúcares mais solúveis e de absorção mais rápida (LONGO, 2006).

As propriedades da lactase dependem da fonte ao qual ela foi extraída - enzimas de diferentes fontes apresentam diferentes resistências a pH e temperatura, o que é muito importante para os processos industriais a que são expostos os alimentos que no final irão apresentar um teor reduzido de lactose (PEREIRA *et al.*, 2012).

Segundo Tremarin (2007), nem todas as fontes de lactase são consideradas seguras e, quando as aplicações envolvem a indústria alimentícia é recomendado trabalhar com enzimas reconhecidas pelo GRAS (Generally Recognized as Safe, uma designação da FDA – Food and Drug Administration – para substâncias ou aditivos adicionados aos alimentos). Atualmente este “status” é válido apenas para *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*. Apesar de a bactéria *Escherichia coli* ser muito estudada, não é recomendado o uso da lactase proveniente desta espécie em alimentos devido aos problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes.

Porém, para a legislação brasileira, de acordo com a Resolução RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nº 348/2003, a enzima lactase utilizada em produtos alimentícios deve ser apenas de origem microbiana, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

A hidrólise enzimática envolve a formação de sacarídeos como produtos intermediários. Este método pode ser utilizado em batelada, recuperado por membrana ou com a enzima immobilizada; quando utilizada a batelada para fazer a reação, a enzima é perdida quando ocorre a pasteurização (CARMINATTI, 2001). A figura 2 mostra a reação enzimática da hidrólise da lactose:

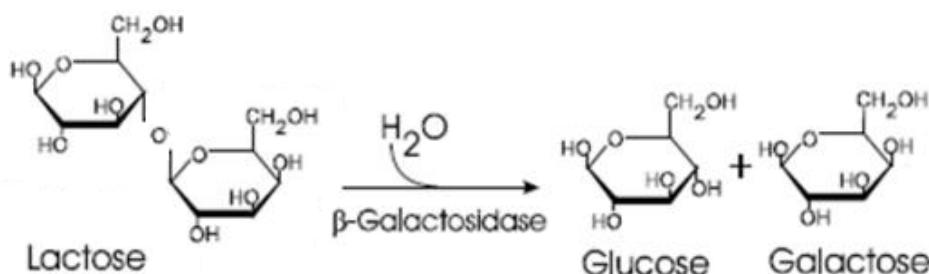


FIGURA 2 – Hidrólise da lactose pelo método enzimático.

FONTE: Adaptado de HELD (2001).

A concentração de carboidratos presente em uma amostra pode ser determinada por titulação, crioscopia, gravimetria ou por espectrofotometria. Um dos métodos titulométricos bastante utilizados é o método de Lane-Eynon, que baseia-se na redução de um volume conhecido de reagente de Fehling em que o ponto final da titulação é indicado pelo azul de metileno reduzido por um excesso de açúcar redutor. Ao final da titulação, o líquido passa de azul para incolor, mas é possível notar a presença de um precipitado vermelho tijolo devido ao fato de que os sais cúpricos, em solução tartárica alcalina, transformam-se em sais cuprosos vermelhos que precipitam (DEMIATE *et al.*, 2002). O tartarato de sódio e potássio forma um sal com o Cu⁺² (azul anil); este sal posteriormente sofre redução a tartarato e óxido cuproso (Cu²⁺O, com coloração vermelho tijolo) que precipita e o açúcar redutor é oxidado originando um sal sódico (TAVARES *et al.*, 2010). Este método é o recomendado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006).

Para que este método apresente maior exatidão, dois fatores são de extrema importância: a solução deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação (pois caso contrário o óxido de cobre (II) que foi formado pode ser novamente oxidado e a solução volta a ficar azul); e a titulação não pode passar de 3 minutos para não haver a decomposição dos açúcares devido ao aquecimento prolongado (TAVARES *et al.*, 2010).

Há ainda diversos fatores que influenciam no processo de hidrólise como pH, temperatura, concentração da enzima e tipo de leite utilizado. Dentre estes fatores, a

concentração da enzima e temperatura tem sido os mais estudados.

Estudos recentes indicam que a hidrólise da lactose através de métodos enzimáticos é uma excelente alternativa às pessoas intolerantes à lactose, pois estas podem consumir produtos lácteos hidrolisados com uma redução considerável dos sintomas indesejáveis (CUNHA *et al.*, 2008; MATTAR; MAZO, 2010; SANTOS, 2014).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da concentração da enzima lactase, da temperatura e do tempo de reação sobre a hidrólise da lactose em leite semidesnatado.

2 | PARTE EXPERIMENTAL

Foi utilizado leite UHT tipo A, semidesnatado, proveniente de um laticínio da região oeste do Paraná, obtido em estabelecimento comercial da cidade de Palotina, no Paraná, e transportado à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. As embalagens pertenciam ao mesmo lote. Optou-se por utilizar um leite com menor teor de gordura para que esta não interferisse na reação de hidrólise.

A enzima utilizada foi a lactase da empresa Prozyn® sob a forma de um líquido de cor amarelada. Esta enzima é obtida através da fermentação de uma cepa selecionada e específica de *Kluyveromyces lactis*. De acordo com informações técnicas da marca, esta enzima pode atuar em ampla faixa de temperatura, de 5 a 40 °C. Durante o período de experimentos a enzima foi mantida sob refrigeração.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se 100 mL de leite em frascos do tipo erlenmeyer mantidos sob controle de temperatura em banho metabólico do tipo Dubnoff com agitação de 100 rpm.

Foram testadas as variáveis: temperatura (25, 40 e 60 °C), concentração de enzima (0,2, 0,4, e 0,8 g.L⁻¹) e tempo de reação (1, 2, 3 e 4 horas), de acordo com os 9 tratamentos apresentados na Tabela 1:

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração da enzima (g.L ⁻¹)
1	25	0,2
2	25	0,4
3	25	0,8
4	40	0,2
5	40	0,4
6	40	0,8
7	60	0,2
8	60	0,4
9	60	0,8

TABELA 1. Condições das variáveis utilizadas durante os experimentos.

FONTE: O autor (2016).

Os valores de temperatura e concentração escolhidos foram baseados em dados encontrados na literatura (LONGO, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; TREVISAN, 2008; FAEDO, 2013) além das informações fornecidas pela ficha técnica da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e, a cada hora, eram retirados 10 mL de cada amostra para posterior titulação. As amostras ficaram 4 horas em banho-maria. Após esse período, as amostras eram colocadas em outro banho termostático, a 95 °C por 15 minutos, para inativação da enzima.

As análises de glicídios redutores foram realizadas pelo método Lane-Eynon, recomendado pela Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006). O método baseia-se na redução dos íons cúpricos (Cu^{+2}) a íons cuprosos (Cu^+) pelo açúcar redutor em meio alcalino quente.

A determinação dos açúcares redutores foi realizada conforme descrito na Instrução Normativa nº 68/2006. Primeiro foi realizada a padronização das soluções de Fehling A e B utilizando 0,5002 g de glicose previamente seca em estufa a 70°C durante 1 hora.

Então as amostras de leite com a enzima foram colocadas em banho termostático com a temperatura ajustada conforme cada ensaio.

A cada hora eram retirados 10 mL de cada ensaio e transferidos para balão volumétrico de 250 mL, onde eram adicionados 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL de solução acetato de zinco a 30% e o volume era completado com água destilada. A solução era deixada em repouso por alguns minutos para sedimentar e em seguida era filtrada em papel filtro. O filtrado era recebido em erlenmeyer de 250 mL e transferido para bureta de 25 mL.

Em erlenmeyer de 125 mL eram adicionados 5 mL de cada uma das soluções de Fehling A e B e 40 mL de água destilada. Esta solução era aquecida em placa aquecedora até ebólitione e então começava a titulação, gotejando a amostra sem agitação até que o líquido ficasse levemente azulado. Sem parar a titulação, era adicionada uma gota de azul de metíleno a 1%. A titulação acaba quando há a descoloração do indicador – o líquido fica transparente com um precipitado vermelho-tijolo.

Por meio da quantidade de solução utilizada na titulação, foi calculada a quantidade de glicídios redutores presentes em cada amostra, conforme mostra a equação 1, onde T é o título de Fehling (obtido pela padronização das soluções de Fehling com a glicose), V é o volume gasto na titulação em mililitros e m é a massa da amostra em gramas :

$$\text{% de glicídios redutores em glicose} = \frac{100 \times 250 \times \left(\frac{T}{2}\right)}{V \times m}$$

EQUAÇÃO 1 - % de glicídios redutores em glicose.

Considerando que a lactose seja o único açúcar presente no leite e que esta represente 100% dos glicídios redutores presentes no início da reação, calculou-se, para cada amostra retirada a cada hora, o rendimento de hidrólise a partir da quantificação de glicídios redutores em glicose.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a quantificação dos glicídios redutores em lactose por meio do método de Lane-Eynon e obteve-se um teor de lactose de 4,84% para o leite semidesnatado utilizado nos experimentos. Este valor está em conformidade com o Decreto nº 30.691, citado anteriormente, que determina que o leite normal contenha no mínimo 4,3% de lactose em sua composição (BRASIL, 1952).

Os valores de glicídios redutores em glicose foram calculados a partir da equação 1 a cada hora.

Como a lactose pode ser considerada o único açúcar presente no leite, por meio da análise de glicídios redutores em glicose é possível chegar a uma porcentagem de rendimento da hidrólise para cada amostra. A figura 2 mostra o rendimento de hidrólise de cada ensaio ao longo das 4 horas de reação:

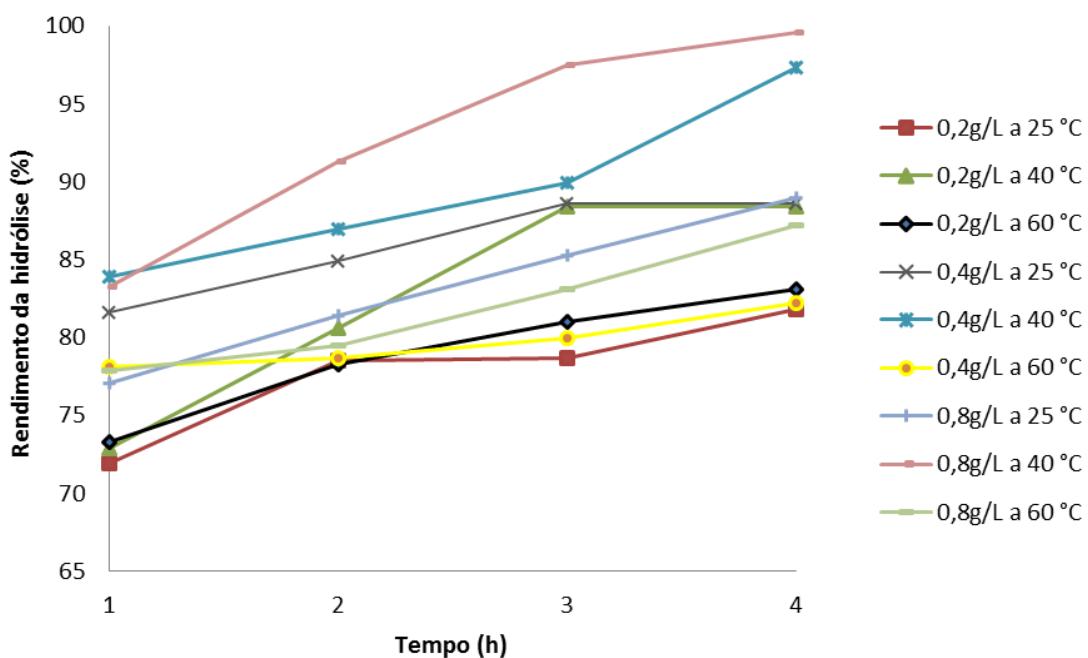


FIGURA 2 - Rendimento alcançado nos ensaios a cada hora.

FONTE: O autor (2016).

Exceto pelos ensaios 2 e 4, todos os demais apresentaram maior porcentagem de rendimento de hidrólise no tempo final de reação (4 horas). Conforme mostra a tabela 2 o ensaio que obteve maior rendimento de hidrólise correspondeu ao ensaio 6 ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$ a 40°C) depois de 4 horas de reação.

Ensaio	Rendimento da hidrólise (%)
1	81,8
2	88,6
3	89,0
4	88,4
5	97,3
6	99,6
7	83,1
8	82,2
9	87,2

TABELA 2. Rendimento da reação de hidrólise após 4 horas de reação.

FONTE: O autor (2016).

Estudos realizados por Holsinger e Kligerman (1991) mostraram que com uma redução de 70% no teor de lactose do leite é possível reduzir significativamente os sintomas provocados pela intolerância à lactose. Já de acordo com a ficha técnica da enzima utilizada, o leite pode ser considerado “deslactosado” se houver uma redução de 90% no teor de lactose. Dentre os ensaios realizados o ensaio 5 alcançou esta redução após 4 horas de reação e o ensaio 6 alcançou a partir da 2^a hora de reação.

Porém essas porcentagens de redução ainda não atendem a legislação e dependendo do grau de intolerância apresentado, podem ainda não ser o suficiente, ocasionando desconforto quando o leite é ingerido. De acordo com a Portaria nº 29/98 (BRASIL, 1998), alimentos destinados a dietas com restrição de dissacarídeos - que é o caso de pessoas intolerantes à lactose - devem conter um máximo de 0,5 g do açúcar para cada 100 g do produto final, ou seja, 0,5%. Este valor foi alcançado em dois ensaios, em que utilizou-se 0,4 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹ de lactase, a uma temperatura de 40 °C. Em ambos os ensaios, este valor foi atingido já na terceira hora de reação.

O ensaio que apresentou melhores resultados foi o que utilizou 0,8 g.L⁻¹ de enzima a uma temperatura de 40 °C. O tempo se mostrou significativo para um melhor rendimento da reação, uma vez que em quase todos os ensaios os melhores resultados foram alcançados após 4 horas de reação. Apenas nos ensaios 2 e 4 o rendimento máximo para estas duas condições foi alcançado após 3 horas de reação, não havendo diferença para a quarta hora.

Realizou-se uma análise estatística dos dados obtidos por meio do software STATISTICA® versão 10 com o objetivo de averiguar as variáveis concentração de enzima, temperatura e tempo de reação em relação ao efeito rendimento da hidrólise.

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis estão apresentadas na tabela 3, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo R² com um nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

Variável	p-valor	Coeficiente	Erro
Intercepto	0,000000	23,8128	0,700136
H	0,000000	6,2563	0,681846
H²	0,113647	- 0,4014	1,131539
C	0,000000	50,1567	0,616934
C²	0,000000	- 39,2593	1,222202
T	0,000555	1,9669	0,621370
T²	0,000000	- 0,0229	1,092749
HxC	0,477870	0,6424	0,811469
HxT	0,139958	- 0,0233	0,823563
CxT	0,418661	- 0,0571	0,738259

TABELA 3. Estimativa dos efeitos para o rendimento da hidrólise para os ensaios variando a quantidade de enzima empregada (c), o tempo de reação (h) e a temperatura (t).

R2 = 0,8503.

FONTE: O autor (2016).

Por meio da análise do Gráfico de Pareto é possível visualizar que, dentre as variáveis estudadas, o tempo na forma quadrática assim como as interações entre as variáveis são não significativas, como mostra a figura 3. Já as variáveis tempo de reação na forma linear e as formas quadráticas e lineares das variáveis temperatura e concentração de enzima podem ser consideradas significativas na faixa avaliada dos parâmetros.

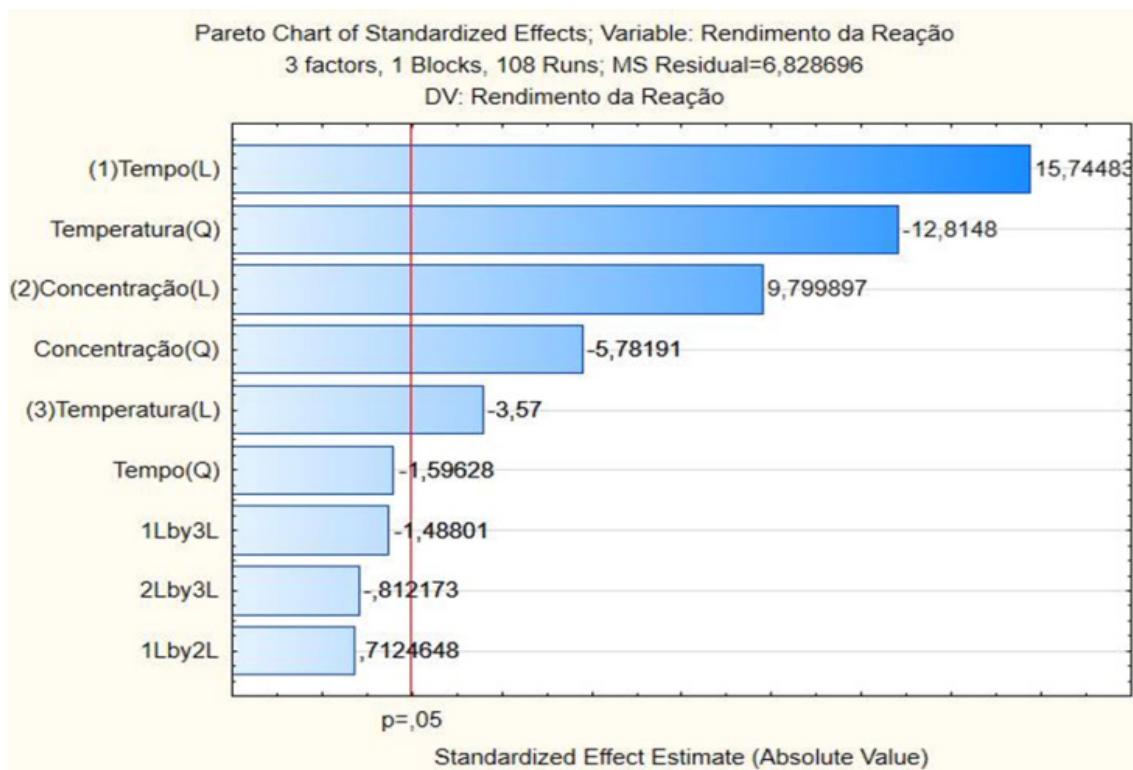


FIGURA 3 - Gráfico de Pareto obtido para o do rendimento da hidrólise da lactose em função da concentração de enzima, da temperatura e do tempo de reação.

FONTE: O autor (2016)

A análise de variância através do teste F é apresentada na Tabela 4, em que $F_{\text{regressão}} (0,055;9;98) = 1,97$. Observando os dados obtidos na Tabela 4 para a regressão, $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} e possui uma razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ maior que 4. Desta forma, o modelo proposto é válido sendo possível escrever o modelo matemático em função das variáveis avaliadas.

	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	3803,810	9	422,646	61,8916
Erro	669,212	98	6,829	
Total SS	4473,022	107		

TABELA 4. Análise de variância obtida para os ensaios de determinação do rendimento da hidrólise da lactose em 4 horas de reação.

FONTE: O autor (2016).

Para os dados obtidos, propõe-se um modelo para o rendimento (R) alcançado pela hidrólise, tendo como variáveis a concentração de enzima utilizada na reação (C), o tempo da reação (H) e a temperatura (T), mostrado na equação 2:

$$R = 23,8128 + 6,2563 H - 0,4014 H^2 + 50,1567 C - 39,2593 C^2 + 1,9669 T - 0,0229 T^2 + 0,6424 HxC - 0,0233 HxT - 0,0571 CxT$$

EQUAÇÃO 2 – Modelo para o rendimento alcançado pela hidrólise da lactose.

As FIGURAS 4, 5, 6 e 7 apresentam as superfícies de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 1, 2, 3 e 4 horas de reação, respectivamente.

Nota-se que para valores elevados de concentração da enzima e maiores tempos de reação são obtidos maiores valores de rendimento da hidrólise. A temperatura segue o mesmo comportamento até 40 °C, mas o rendimento decai após esse valor – o que já era esperado, pois a faixa de temperatura adequada para esta enzima é entre 5 e 40 °C.

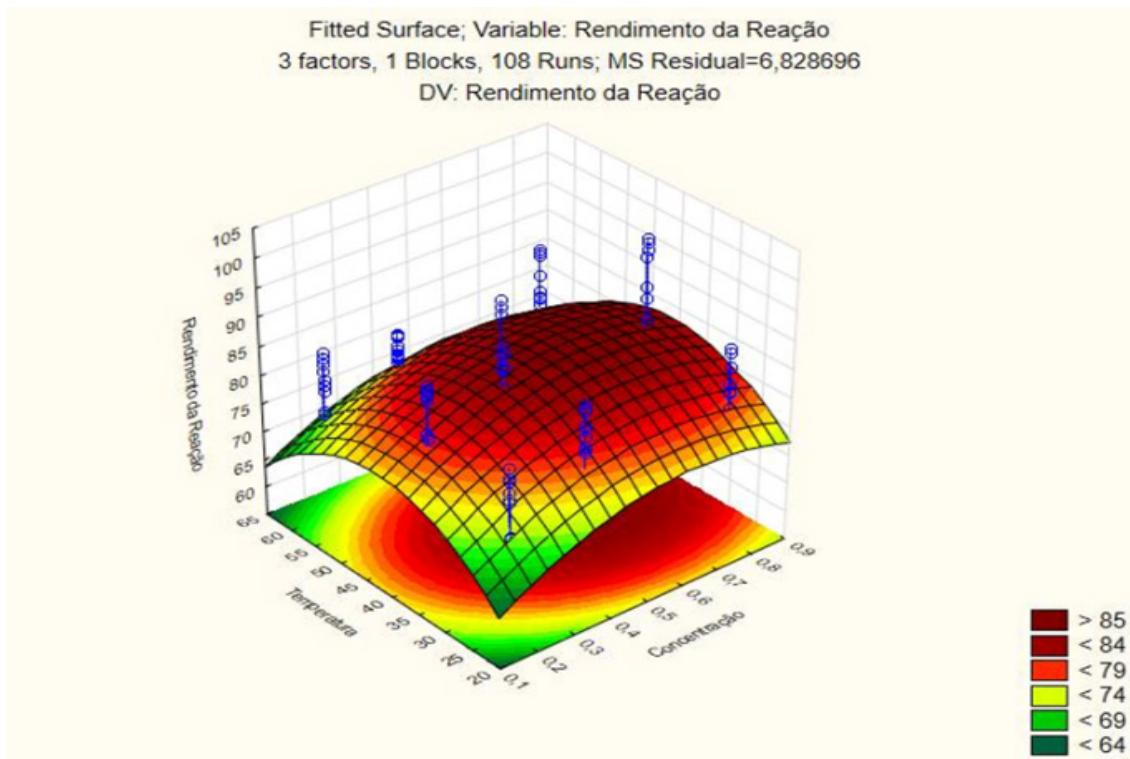


FIGURA 4 - Superfície de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 1 hora de reação.

FONTE: O autor (2016).

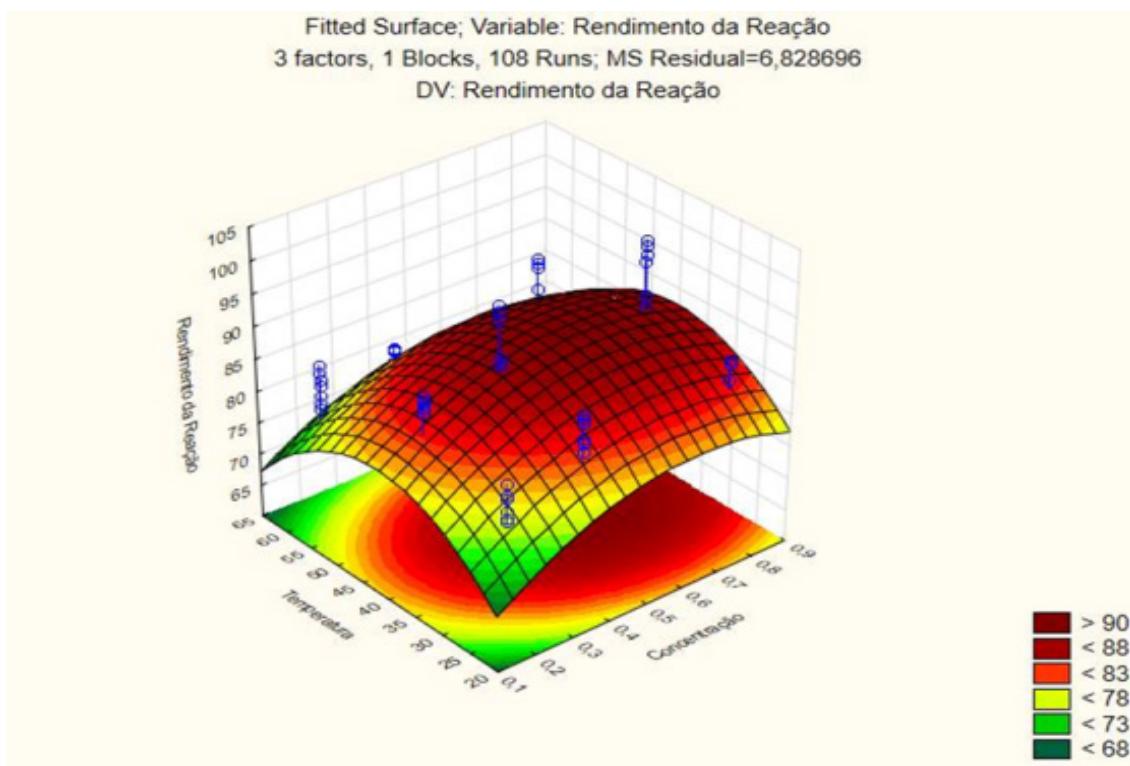


FIGURA 5 - Superfície de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 2 horas de reação.

FONTE: O autor (2016).

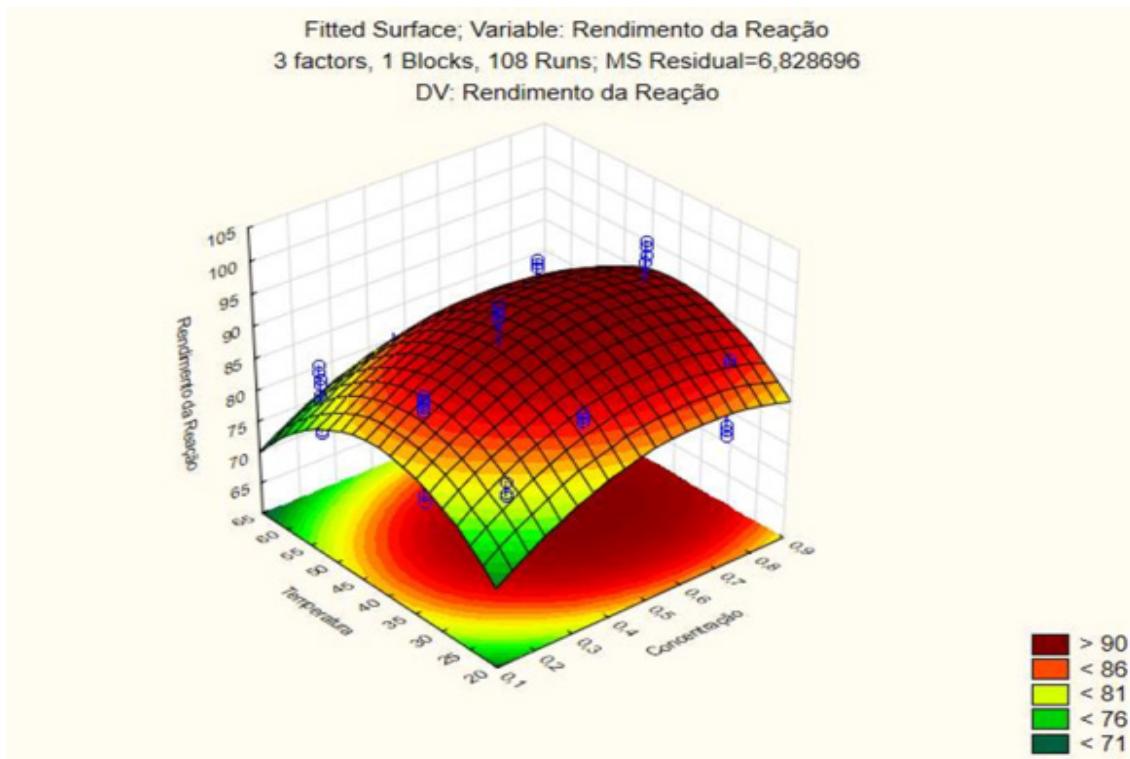


FIGURA 6 - Superfície de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 3 horas de reação.

FONTE: O autor (2016).

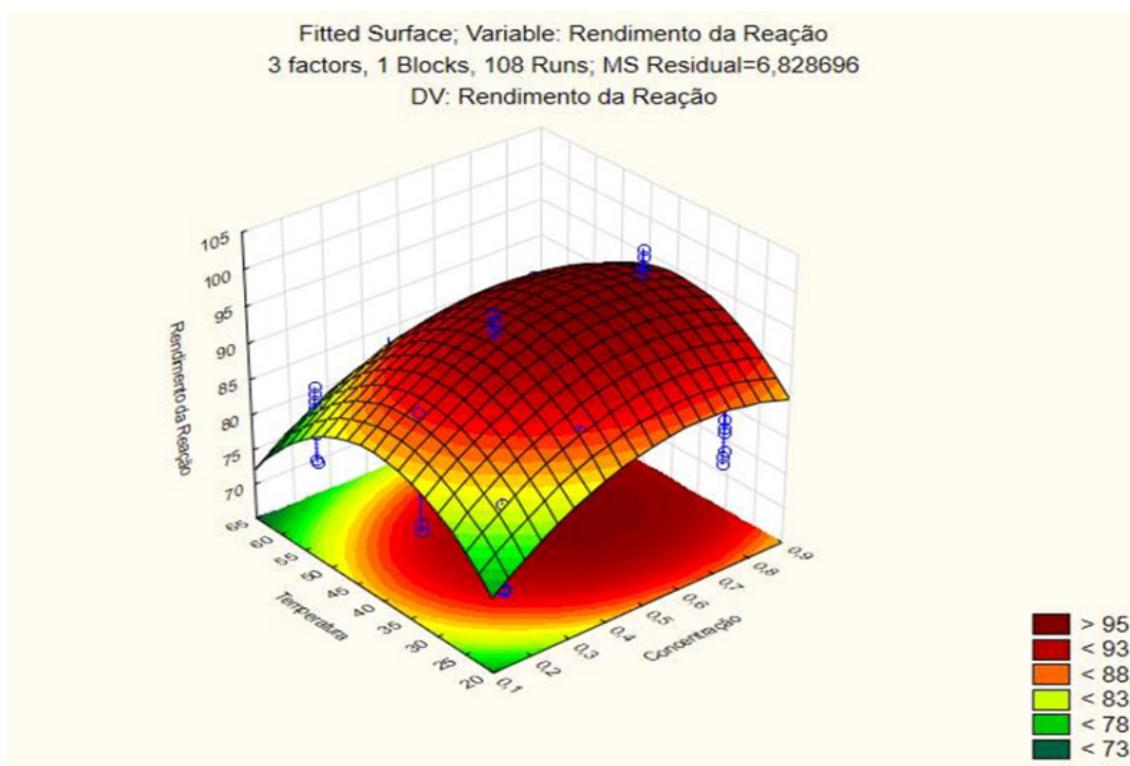


FIGURA 7 - Superfície de resposta do rendimento da reação avaliada em função da quantidade de enzima utilizada na reação e da temperatura após 4 horas de reação.

FONTE: O autor (2016).

O maior rendimento de hidrólise alcançado utilizando-se a maior concentração de enzima está coerente, uma vez que, segundo Carminatti (2001), a maior quantidade

de sítios ativos disponíveis favorece o grau de conversão da lactose.

Cunha e colaboradores (2007) testaram a eficiência da enzima lactase incorporada em filme de base celulósica para a hidrólise da lactose em duas faixas de temperatura, 7 °C e 25 °C, alcançando, respectivamente, 85% e 100% de hidrólise após 24 horas de reação. Esses resultados foram alcançados utilizando-se 100 cm² de filme preparados com 1,5 mL da enzima lactase, inoculados em 100 mL de leite.

Spadoti e colaboradores (2010) utilizaram a enzima lactase em uma concentração de 0,4 mL·L⁻¹ a uma temperatura de 10 °C com o objetivo de alcançar um mínimo de 90% de hidrólise da lactose do leite. Para atingir este propósito, a amostra foi mantida 21 horas sob essas condições.

Em um estudo que buscava avaliar a produção de queijo Minas Frescal com baixo teor de lactose, Back e colaboradores (2013) alcançaram uma redução de 87,72% da lactose do leite utilizando 0,9 g·L⁻¹ de lactase a 5 °C em 24 horas de reação.

Faedo e colaboradores (2013) utilizaram processos de separação de membranas associados à hidrólise enzimática da lactose. Os autores utilizaram 0,8 g·L⁻¹ de lactase a 6 °C por 15 horas alcançando uma redução de 93,34% do teor de lactose.

Todos os estudos citados acima utilizaram um tempo muito maior de reação de hidrólise da lactose. Neste trabalho, mesmo com apenas 4 horas, alcançou-se um rendimento de hidrólise de quase 100%, mostrando-se mais eficiente quando comparado com os anteriores.

Longo (2006) atingiu cerca de 88% de hidrólise da lactose do leite para posterior produção de iogurte com 0,8 g·L⁻¹ de enzima a 40 °C após 4 horas de reação. Nestas mesmas condições, a hidrólise alcançada neste experimento foi de 99,6%, se mostrando a condição mais adequada para a redução do teor de lactose no leite.

Conforme apresentado acima, temperaturas mais baixas do que aquelas indicadas pela literatura podem ser utilizadas para alcançar uma alta conversão da lactose em glicose e galactose. Porém, necessitam de um tempo muito maior de reação podendo tornar-se inviável em escala industrial.

4 | CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado é possível concluir que tanto a concentração de enzima quanto o tempo de reação influenciaram positivamente o rendimento da hidrólise, possibilitando, assim, um produto que atenda às necessidades das pessoas que possuem intolerância à lactose. A variável temperatura também influenciou positivamente a reação até a faixa de 40 °C – valor este que está próximo ao ideal para a enzima lactase utilizada.

Obteve-se ainda um modelo que fornece uma boa estimativa do rendimento da hidrólise, satisfazendo a predição dos dados experimentais.

Por meio dos dados obtidos pode-se afirmar que o processo de hidrólise da

lactose utilizado foi eficiente. Com relação à melhor condição para este experimento, nota-se que o ensaio 6 – 0,8 g.L⁻¹ de enzima a 40 °C - apresentou, após 4 horas, uma redução de 99,6% no teor da lactose. Tanto este ensaio quanto o ensaio 5 apresentaram após a terceira hora de reação menos de 0,5% de lactose na amostra de leite, enquadrando-se no padrão exigido pela legislação para o leite ser considerado “sem lactose”. Sendo assim, o leite hidrolisado sob essas condições pode ser utilizado por pessoas que possuem intolerância à lactose.

REFERÊNCIAS

- BACK, D.; MATTANNA, P.; ANDRADE, D. F. SIMÕES, G. D.; RICHARDS, N. S. P. S. **Viabilidade probiótica de queijos minas frescal com teor reduzido de lactose**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 68, n. 390, p. 27-35, jan./fev. 2013.
- BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. **Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio**. Revista Saúde e Pesquisa, v. 4, n. 1, p. 81-86, jan./abr. 2011.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Proteínas. In: **Química do processamento de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 1992. p. 79-92.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, 13 de janeiro de 1998. **Aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção 1.
- BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. **Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico - químicos, para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.
- BRASIL. Resolução RDC nº. 348. **Utilização de enzimas na indústria de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 dez. 2003. Seção 1, p. 46.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. **Qualidade higiênica do leite**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 17 p. 1998.
- CAMPOS, N. S.; STEPHANI, R.; SOUZA, R. A.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, L. F. C. **Utilização do glicosímetro Accu-Chek® para a determinação de lactose em produtos lácteos**. Revista Virtual de Química, v. 6, n. 6, p. 1677-1686. 2014.
- CARMINATTI, C. A. **Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluveromyces lactis***. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- CUNHA, L. R.; SOARES, N. F. F. ASSIS, F. C. C.; MELO, N. R.; PEREIRA, A. F. SILVA, C. B. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 23-26, ago. 2007.
- CUNHA, M. E. T.; SUGUIMOTO, H. H.; OLIVEIRA, A. N.; COSTA, M. R. **Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas**. UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. PUBLICATIO UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. Engenharias, Ponta Grossa, v.8, n.1, p. 65-78, 2002.

FAEDO, R.; BRIÃO, V. B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. Revista CIATEC, Passo Fundo, v. 3, n. 1, p. 44-54, 2013.

FOPPA, T.; FERRAREZE, C. K.; CASAGRANDE, J.; KOCH, P.A. Análises físico-químicas do leite em pó comparado ao leite UHT integral. Ágora: Revista de Divulgação Científica, v. 16, n. 1, p. 38-43. 2009.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da região sul do Brasil, Porto Alegre, p. 31-47. 2003.

HELD, P. Determination of β -Galactosidase Activity using the FL600™ Microplate Fluorescence Reader. 2001. Disponível em: <http://www.bioteck.com/resources/docs/FL600_Determination_of_b-Galactosidase_Activity.pdf>. Acesso em: 01/05/2016.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, K. H. Application of lactose in dairy foods and other foods containing lactose. Food Technology, v. 45, n. 1, p. 94-95, 1991

JUNIOR, A. J. B.; KASHIWABARA, T. G. B.; SILVA, V. Y. N. E. Intolerância à lactose - revisão de literatura. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, Ipatinga, v. 4, n. 4, p. 38-42, set./nov. 2013.

LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudanças de paradigmas com a biologia molecular. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, n. 389, p. 57-65, nov./dez. 2012.

PRETTO, F. M.; SILVEIRA, T. R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste do hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. Jornal de Pediatria, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 4, p. 567-572, out./dez. 2004.

SANTOS, F. F. P.; OLIVEIRA, G. L.; PIMENTEL, H. G. P.; PINHO, K. D.; VERAS, H. N. H. Intolerância à lactose e as consequências no metabolismo do cálcio. Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia, v. 2, n. 4, jun. 2014.

SENER, N.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. Process Biochemistry, Istambul, v. 41, p. 1493-1500, 2006.

SPADOTI, L. M.; ALVES, A. T. S.; ANTUNES, A. E. C.; SÁ, P. B. Z. R.; LISERRE, A. M.; DENDER, A. G. F. V.; MORENO, I.; TRENTO, F. K. H. S.; GALLINA, D. A. Vida útil de leite desnatado pasteurizado lactose- hidrolisado microfiltrado. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 12, n. 1, p. 61-65, 2010.

TAVARES, J. T. Q.; CARDOSO, R. L.; COSTA, J. A.; FADIGAS, F. S.; FONSECA, A. A. **Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon.** Química Nova, v. 33, n. 4, p. 805-809, 2010. 45

TÉO, C. R. P. A. **Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional.** Arquivos de ciências da saúde da Unipar, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.

TREMARIN, A. **Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana.** 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado.** 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

VALSECHI, O. A. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados.** Universidade Federal de São Carlos. 2001. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf>>. Acesso em: 01/05/2016.

AVALIAÇÃO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Victoria Pommer

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Cascavel - Paraná, Brazil

Letícia Mara Rasbold

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Cascavel - Paraná, Brazil

Jorge William Fischdick Bittencourt

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Cascavel - Paraná, Brazil

Alexandre Maller

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Cascavel - Paraná, Brazil

Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas,
Cascavel - Paraná, Brazil

mesófilos e termófilos, respectivamente. Os extratos obtidos de cultivos foram utilizados para dosagens enzimáticas de quitinases utilizando substrato 4-nitrofenil-N-acetil β -D-glucosaminideo. a 40 °C por 30 minutos. Dentre as fontes de carbono testadas com os fungos mesófilos, o bagaço de cevada foi o melhor indutor tanto para o isolado PAS2ML (1,63 U/mL) quanto para o *P. janthinellum* (1,37 U/mL). Enquanto que a maior produção de quitinase extracelular entre os fungos termófilos foi obtida com o isolado PA2S4T induzido com as fontes de carbono, farinha de laranja (1,4 U/mL) e a palha de milho (1,41 U/mL). Assim, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que esses fungos filamentosos apresentam potencial para produção de quitinases.

PALAVRAS CHAVE: resíduos agroindustriais, quitinase, fungos filamentosos.

AVALIAÇÃO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the production of extracellular chitinase by the mesophilic and thermophilic fungi isolated from the Atlantic Forest of the West of Paraná using alternative sources

RESUMO: O objetivo desse estudo foi avaliar a produção de quitinase extracelular pelos fungos mesófilos e termófilos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná utilizando fontes alternativas de carbono em meio de cultivo líquido. Os esporos dos fungos foram inoculados em meio líquido Czapek suplementado com diferentes fontes de carbono e desenvolvidos em incubadora tipo BOD por 7 dias em condições estacionárias a 28°C e 40°C para

of carbon in liquid culture medium. Fungal spores were inoculated in Czapek liquid medium supplemented with different carbon sources and grown in a BOD incubator for 7 days under stationary conditions at 28°C and 40°C for mesophiles and thermophiles, respectively. The extracts obtained from cultures were used for enzymatic dosages of chitinases using 4-nitrophenyl-N-acetyl β -D-glucosaminide substrate, at 40°C for 30 min. Among the carbon sources tested with mesophilic fungi, barley bagasse was the best inducer for both PAS2ML isolate (1.63 U/mL) and *P. janthinellum* isolate (1.37 U/mL). While the highest production of extracellular chitinase between thermophilic fungi was obtained with the isolate PA2S4T induced with carbon sources, orange meal (1.4 U/mL) and corn straw (1.41 U/mL). Thus, the results obtained in this study demonstrated that these filamentous fungi have potential for production of chitinases.

KEYWORDS: agroindustrial waste, chitinase, filamentous fungi

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos são os principais organismos de compostores da natureza, destacam-se como potenciais produtores de biocatalisadores em larga escala, devido a grande capacidade de secreção de enzimas extracelulares (POLIZELI *et al.*, 2005). A crescente utilização de fungos principalmente na produção de enzimas e metabólitos secundários aplicáveis na biotecnologia está relacionada, entre outros fatores, à sua prevalência no ambiente natural, a grande facilidade de cultivo em laboratório (POLIZELI *et al.*, 2005). Entre os compostos bioativos produzidos pelos fungos estão as enzimas, as quais ocupam grande espaço em diversas áreas industriais tais como medicamentos, alimentícios, bebidas, detergentes, papel e celulose, têxtil, além de muitos outros setores industriais.

A utilização de enzimas ganha espaço em função de sua alta especificidade e eficiência (YOON *et al.*, 2006), a exemplo de quitinases, que catalisam a hidrólise de quitinas, um polímero constituído de monômeros de N-acetil glicosamina com ligação β -1,4 (GlcNAc) abundantemente encontrada na natureza, presente em algas, fungos e exoesqueleto de artrópodes (LI *et al.*, 2010) que como produtos de hidrólise são liberados quito-oligômeros e monômeros de NacGlc (FLEURI & SATO, 2005; RUSTIQUEL *et al.*, 2012). Dentre os fungos filamentosos, são relatados como produtores de quitinases: *Trichoderma* spp. (MATROUDI *et al.*, 2008; SAIPRASAD *et al.*, 2009; HOMTHONG *et al.*, 2016) *Trichoderma harzianum* TUBF 781, *Trichoderma viride* (OMUMASABA *et al.*, 2001) *Paecilomyces lilacinus* (KHAN *et al.*, 2003), *Beauveria bassiana* (THOMAS & READ, 2007) e *Metarhizium anisopliae* (RUSTIGUEL *et al.*, 2012).

As quitinases tem recebido crescente atenção devido a sua ampla aplicação em diferentes áreas como a agricultura, biotecnologia e gestão de resíduos industriais (PATEL *et al.*, 2010). Entretanto, apesar da grande relevância da enzima, alguns fatores restringem uma exploração biotecnológica mais ampla das quitinases, como a escassez de microrganismos com altas taxas de produção, o alto custo de produção,

e a baixa atividade das quitinases, o que denota a necessidade em pesquisar novos microrganismos que sejam bons produtores dessas enzimas, assim como potencializar a produção da mesma utilizando indutores alternativos e baratos para síntese dessa enzima, os quais podem ser adicionados ao meio de cultivo dos fungos. Dentro desse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de quitinases de fungos filamentosos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná utilizando fontes alternativas de carbono em meio de cultivo líquido.

2 | METODOLOGIA

Manutenção das linhagens de fungos

Neste estudo foram utilizados os fungos mesófilos (*Penicillium janthinellum* e isolado PAS2ML) e os termófilos (*Thermomyces lanuginosus* e isolados PA2S4T e PA2S7T) previamente isolados e pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Unioeste (campus de Cascavel). Os fungos foram desenvolvidos por 7 dias em meio BDA, e incubados em BOD a 28°C e 40°C (mesófilos e termófilos, respectivamente), e mantidos através repiques periódicos e conservados em geladeira por um período médio de até 30 dias.

Cultivo e obtenção de extratos extracelulares dos fungos

Os conídios dos fungos foram suspensos em água destilada estéril e ajustada para 10^5 esporos/mL. Um volume de 2,0 ml dessa suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido Czapek modificado (NaNO_3 0,15%; MgSO_4 0,025%; KCl 0,025%; KH_2PO_4 0,15%; extrato de levedura 0,4%) suplementado com 2% (p/v) de fontes alternativas de carbono. Para estudo com os fungos termófilos foram utilizadas as fontes: farinha de laranja, farinha de maracujá, bagaço de cana, bagaço de cevada, bagaço de sorgo e palha de milho. Enquanto que para os mesófilos, as fontes de carbono foram: pó de ostra, flocos de soja, farinha de banana verde, bagaço de cana, bagaço de cevada e quitosana em pó. As fontes de carbono foram obtidas de comércio e indústria da região oeste do Paraná. Os cultivos foram realizados em duplicatas, os frascos foram incubados durante 7 dias em B.O.D em condições estacionárias à 28°C (mesófilos) e 40°C (termófilos).

Para obtenção do extrato enzimático, as culturas foram filtradas a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro, e o filtrado obtido denominado extrato extracelular foi utilizado para determinação de atividade enzimática.

Dosagem de quitinase

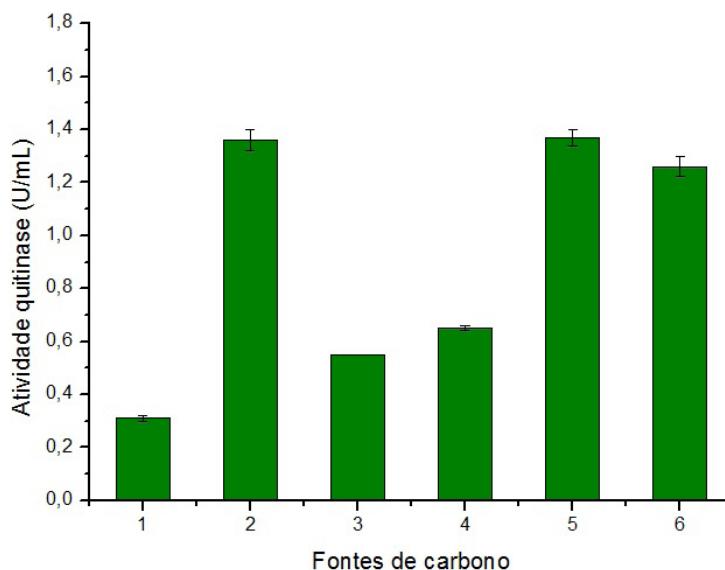
A atividade da quitinase foi estimada conforme a metodologia adaptada de Yang & Fong (2018) utilizando-se 0,2 mg/mL do substrato sintético 4-nitrofenil-N-acetil β -D-

glucosaminideo (NP-GlcNac) da Sigma-Aldrich em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0. A mistura consistiu de 90 μ l do substrato com 10 μ l do extrato enzimático, sendo incubada a 40 °C por 30 minutos e interrompida por adição de 200 μ l de solução saturada de Na₂CO₃, e quantificadas a 405 nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Uma unidade de atividade de quitinase (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de substrato por minuto, nas condições de ensaio.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra as atividades de quitinases extracelulares produzidas pelos fungos mesófilos *Penicillium janthinellum* (Figura 1A) e isolado PAS2ML (Figura 1B), cultivado em condições estacionárias suplementados com fontes alternativos de carbono. Nessas condições, a maior atividade de quitinase foi obtida com a fonte de carbono bagaço de cevada tanto para o isolado PAS2ML (1,63 U/mL) quanto para o *P. janthinellum* (1,37 U/mL). A farinha de banana verde (1,36 U/mL) e quitosana (1,26 U/mL) também exibiram indução da quitinase, porém somente para o fungo *P. janthinellum*. As demais fontes de carbono testadas mostraram baixa indução da enzima nos dois fungos. Segundo PATIL & JADHAV (2014), os resíduos agroindustriais como farelo de trigo, farelo de arroz e farelo de gramínea vermelha foram também melhores indutores da quitinase para o fungo *Penicillium ochrochloron* MTCC 517, porém em cultivo semi-sólido. A quitinase de *Aspergillus griseoaurantiacus* também foi induzida em cultivo sólido utilizando resíduos agrícolas como casca de feijão (3,8 U/mL) e casca de batata (5,2 U/mL) (SHEHATA *et al.*, 2017). Existem também relatos na literatura sobre uso de quitina coloidal ou pó de casca de camarão para produção de quitinases (WANG *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2005; FLEURI *et al.*, 2009; RUSTIGUEL *et al.*, 2012).

(A)



(B)

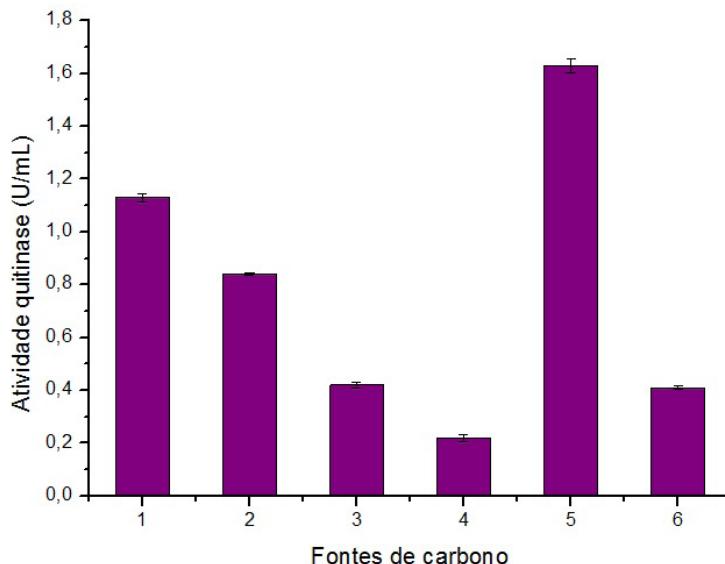
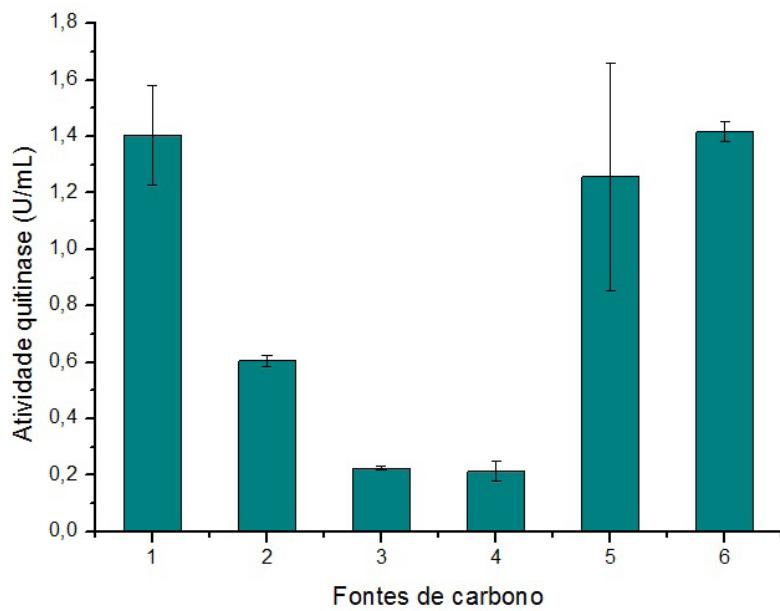


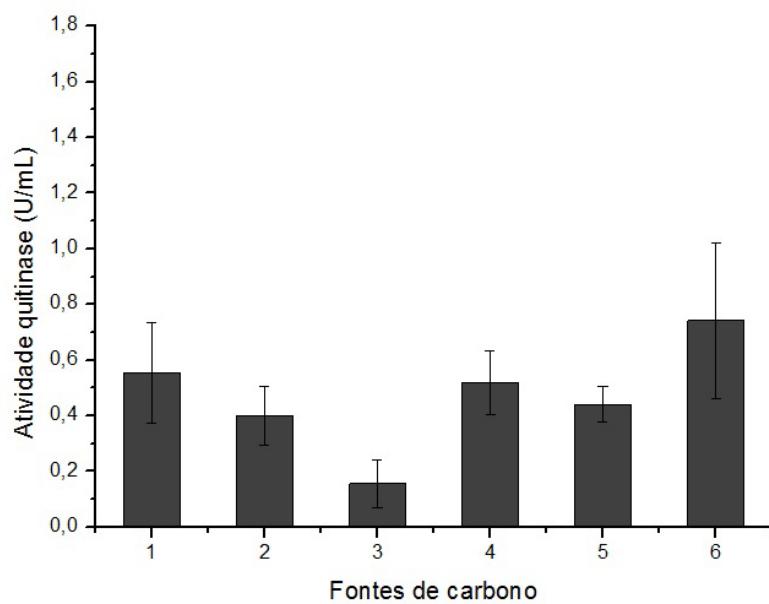
Figura 1 - Influência das fontes alternativas de carbono na indução de quitinase extracelular pelos fungos mesófilos *Penicillium janthinellum* (A) e isolado PAS2ML (B) em cultivo líquido estacionário por 7 dias a 28°C. Cultivos suplementados com as fontes de carbono: Pó de ostra (1), farinha de banana verde (2), flocos de soja (3), bagaço de cana (4), bagaço de cevada (5) e quitosana (6).

A figura 2 representa perfis de atividades quitinolíticas produzidas pelos fungos termófilos: isolado PA2S4T (Figura 2A), isolado PA2S7T (Figura 2B) e *Thermomyces lanuginosus* (Figura 2C), cultivados em condições estacionárias e suplementados com as fontes alternativas de carbono. Dentre os três fungos, o isolado PA2S4T se destacou como melhor produtor de quitinase extracelular, seguido de PA2S7T e então pelo fungo que exibiu menor produção, o *T. lanuginosus*. As fontes de carbono, farinha de laranja (1,4 U/mL) e a palha de milho (1,41 U/mL) foram os melhores indutores de quitinase extracelular para o isolado PA2S4T. Os cultivos com o isolado PA2S7T e o fungo *T. lanuginosos* não apresentaram produção significativa de quitinase na presença dessas fontes de carbono testadas. Existem poucos relatos de fungos termófilos produtores de quitinase exceto o *T. lanuginosus* (KHAN *et al.*, 2015), dessa forma, o isolado fúngico PA2S4T apresenta potencial para produção dessa enzima.

(A)



(B)



(C)

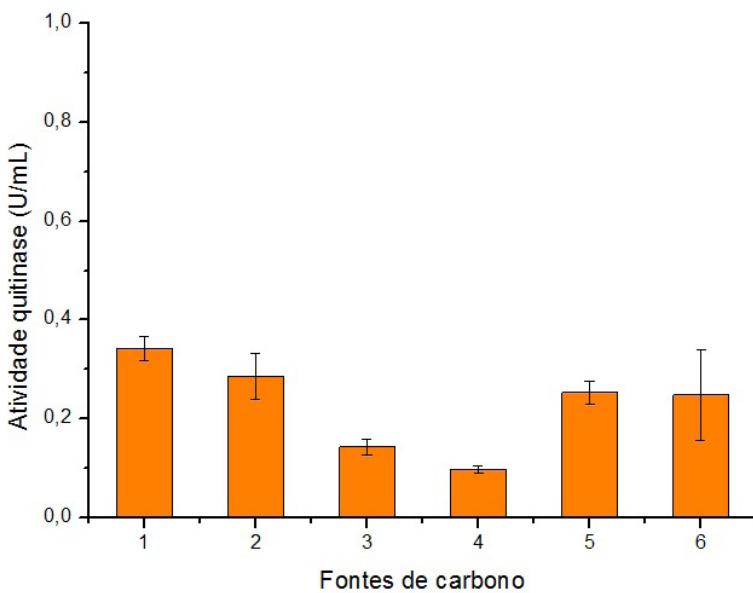


Figura 2 - Influência das fontes alternativas de carbono na indução de quitinase extracelular pelos fungos e isolados termófilos PA2S4T (A), PA2S7T (B) e *Thermomyces lanuginosus* (C), em cultivo líquido por 7 dias a 40°C. Cultivos suplementados com as fontes de carbono: farinha de laranja (1), farinha de maracujá (2), bagaço de cana (3), bagaço de cevada (4), bagaço de sorgo (5) e palha de milho (6).

4 | CONCLUSÃO

Pode-se concluir que dois fungos filamentosos apresentaram potencial para produção de quitinase extracelular nesse estudo, o fungo mesófilo *P. janthinellum* e o isolado termófilo PA2S4T. E dentre as fontes de carbono testadas, o bagaço de cevada, farinha de laranja e a palha de milho se destacaram como melhores indutores de quitinase para esses fungos previamente isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná.

REFERÊNCIAS

- DA SILVA, M. V., SANTI, L., STAATS, C., C, COSTA, A. M., COLODEL, E. M., DRIEMEIER, D., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Cuticle-Induced Endo/Exoacting Chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* Is Encoded by an Ortholog of the chi3 Gene. Research in Microbiology, v. 156, n. 3, p. 382-392, 2005.
- FLEURI, L. F., SATO, H. Production, Purification, Cloning and Application of Lytic Enzymes. Química Nova, v. 28, n. 5, p.871-879, 2005.
- FLEURI, L. F., KAWAGUTI, H. Y., SATO, H. H. Production and Application of Extracellular Chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans*. Brazilian Journal of Microbiology, v.40, n.3, p. 623-630, 2009.
- HOMTHONG, M., KUBERA, A., SRIHUTTAGUM, M., HONGTRAKUL, V. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. Agriculture and Natural Resources, v.50, p. 232- 242, 2016.

KHAN, F. I., GOVENDER, A., PERMAUL, K., SINGH, S., BISSETTY, K. **Thermostable chitinase II from *Thermomyces lanuginosus* SSBP: Cloning, structure prediction and molecular dynamics simulations.** Journal of Theoretical Biology, v. 374, p.107-114, 2015.

LI, A.-N., YU, K., LIU, H.-Q., ZHANG, J., LI, H., LI, D.-C. **Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: Cloning, expression and characterization.** Bioresource Technology, v.101, n. 14, p. 5546-5551, 2010.

MATROUDI, S., ZAMANI, M. R., MOTALLEBI, M. **Molecular cloning of chitinase 33 (CHIT33) gene from *Trichoderma atroviride*.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, n. 3, 2008, São Paulo.

OMUMASABA, C.A., N. YOSHIDA AND K. OGAWA, **Purification and characterization of a chitinase from *Trichoderma viride*.** The Journal of General and Applied Microbiology, 47: 53-61, 2001.

PATEL, A. K; SINGH, V. K; YADAV, R. P; MOIR, A. J. G; JAGANNADHAM, M. V. **Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*.** Process Biochemistry, v. 45, p. 675-681, 2010

POLIZELI, M. L. T. M; RIZZATTI, A.C.S; MONTI, R; TERENZI H. F; JORGE J.A; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 67, p. 577–591, 2005.

RUSTIGUEL, C. B., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. **Optimization of the Chitinase Production by Different *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD.** Advances in Microbiology, v. 2, n. 3, p.268-276, 2012.

SAIPRASAD, G. V. S., ANAND, L., GANESHAN,G., MYTHILI, J. B., NAVNEENA, C., RASHMI, H. J., SUNEETHA, C. **Development of *Trichoderma harzianum* endochitinase gene construct conferring antifungal activity in transgenic tobacco.** Indian Journal of Biotechnology, v.8, p. 199-206, 2009.

SHEHATA, A.N., ABD EL ATY, A.A., DARWISH, D.A., ABDEL WAHAB, W.A., MOSTAFA, F.A. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated ***Aspergillus griseoaurantiacus*** KX010988. International Journal of Biological Macromolecules, v. 107, p. 990-999, 2018.

THOMAS, M.B., READ, A.F. **Can fungal biopesticides control malaria?** Nature Reviews Microbiology, v.5, p. 377-383, 2007

WANG, C., TYPAS, M. A., BUTT, T. M. **Detection and Characterization of pr 1 Virulent Gene Deficiencies in the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*.** FEMS Microbiology Letters, v. 231, p. 252-255, 2002, pp.

YAN, Q., FONG, S. S. **Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu_0580 as a thermostable and acidic endochitinase.** Biotechnology Reports, v.10, 2018.

YOON, K.Y., WOODAMS, E.E., HANG, Y.D. **Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues.** LWT – Food Sci. Tech, v. 39, p. 388-392, 2006.

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus rhamnosus* V5 CONTRA *Salmonella enterica* SOROVARIEDADE TYPHIMURIUM.

Carina Terumi Tsuruda

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Patrícia Canteri De Souza

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Erick Kenji Nishio

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Ricardo Sérgio Couto de Almeida

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Luciano Aparecido Panagio

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Ana Angelita Sampaio Baptista

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Sandra Garcia

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Gerson Nakazato

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO: Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro, impedindo a colonização e invasão de patógenos no intestino. *Lactobacillus* é um dos principais agentes probióticos utilizados na prevenção de infecções e na restauração da microbiota intestinal. *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium é um importante agente causador de infecção intestinal de origem alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora do *Lactobacillus* produtor de exopolissacarídeos (EPS) contra *S. Typhimurium*. Para isso foi realizada a identificação do lactobacilo, pesquisa de bacteriocinas. Os resultados mostraram que os lactobacilos foram capazes de produzir compostos antimicrobianos contra *S. Typhimurium*. Nossos resultados sugerem que *L. rhamnosus* poderia ser um potencial probiótico para controlar a salmonelose.

PALAVRAS-CHAVE: proteção, bateria ácida lácticas, bacteriocinas.

ABSTRACT: Probiotics are live microorganisms that when administered in suitable amounts confer benefits to the host's health, preventing colonization and invasion of pathogens in the intestine. *Lactobacillus* is one of the main probiotic agents used in the prevention of infections and in the restoration of the intestinal microbiota. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an important agent causing food-borne intestinal infection. The objective of this work was to evaluate the protective capacity of *Lactobacillus* exopolysaccharide (EPS) against *S. Typhimurium*. For this purpose, the identification of lactobacillus and bacteriocins was performed. The results showed that lactobacilli were able to produce antimicrobial compounds against *S. Typhimurium*. Our results suggest that *L. rhamnosus* could be a potential probiotic to control salmonellosis.

KEYWORDS: protection, lactic acid bacteria, bacteriocinas.

1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico (LAB), que é composto por bactérias Gram-positivas que produzem ácido láctico como um dos principais produtos da fermentação do catabolismo de carboidratos (HAYEK & IBRAHIM, 2013). Muitas cepas de LAB são capazes de produzir polímeros de monossacarídeos na maioria das vezes viscosos, denominados exopolissacarídeos (EPS), sendo de grande importância na indústria de laticínios, como na produção de iogurtes, aumentando a consistência e a viscosidade do produto (HASSAN, 2008). O *L. rhamnosus* produz EPS, acredita-se que este composto possa auxiliar a bactéria produtora na ligação ao muco intestinal, assim como proteger as células epiteliais e estimular o sistema imune (KLOPPER et al., 2018).

Os mecanismos exatos de ação dos probióticos ainda não foram inteiramente estabelecidos, mas estudos indicam que os probióticos são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas, inibindo o crescimento de patógenos (FERREIRA & SILVA, 2012; LEBEER et al., 2008). A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado “exclusão competitiva”. Esse mecanismo impede a colonização dessa mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos, pela competição por sítios de adesão. (LEBEER et al. 2008; SAAD, 2006).

Segundo SAAD (2006), grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos podem estimular a resposta imune sistêmica aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - “natural killer”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas

(MAHAJAN & SINGH, 2014; OELSCHLAEGER, 2010).

Salmonella enterica, é um dos patógenos de origem alimentar de grande importância, pois causam doenças em humanos e outros animais, através do consumo de água e alimentos contaminados, podendo variar desde uma gastroenterite a uma infecção sistêmica grave, como a febre tifóide (ALVARÉZ-ORDÓÑEZ et al., 2011; RUBY et al., 2012).

A dose infectante média (DI_{50}) está entre 10^5 a 10^{10} bactérias ingeridas, os sintomas são basicamente diarreia, vômito e dores abdominais que podem aparecer dentro de 6-72 horas após a ingestão do alimento contaminado (FÀBREGA & VILA, 2013). Entretanto a quantidade exata requerida para causar a doença varia de acordo com o estado imunológico do paciente, do patógeno encontrar local adequado, para que possa se estabelecer, replicar e expressar seus fatores de virulência, assim como a sorovariabilidade envolvida (OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

O primeiro obstáculo a ser superado dentro do hospedeiro é resistir ao pH ácido do estômago e aos sais biliares intestinais, propriedades essenciais, para que ocorra a infecção. Para se proteger, o patógeno possui um mecanismo ácido-tolerância, que regula a homeostase do pH, que induz manter o pH intracelular em valores superiores aos do ambiente extracelular (FOSTER & HALL, 1991).

S. enterica após resistir ao pH ácido e aos sais biliares, é no intestino delgado seu local de infecção, onde vai se aderir ao epitélio intestinal por meio de adesinas e invadir os enterócitos, células dendríticas e principalmente as células M, que tem como função, capturar抗ígenos intestinais por endocitose e transportar para células linfoides presentes nas placas de Peyer. A invasão das células M também permite que as bactérias infectem células epiteliais adjacentes através de sua superfície basolateral (JONES et al., 1994).

Durante a invasão, *S. enterica* altera o citoesqueleto sendo engolida pela célula do hospedeiro em vesículas chamadas Salmonella-containing vacuoles (SCV), simultaneamente, ocorre uma intensa resposta inflamatória no epitélio intestinal iniciando o recrutamento e transmigração de fagócitos do espaço submucoso para dentro do lúmen intestinal (FÀBREGA & VILA, 2013).

S. enterica atravessa o epitélio intestinal e os macrófagos da submucosa detectam a bactéria e a internalizam para eliminá-la do hospedeiro, no entanto nem todas as bactérias são eliminadas, as que sobrevivem são capazes de se replicar no interior dos SCV dos fagócitos, mecanismo essencial para a sua sobrevivência (FÀBREGA & VILA, 2013). Após esse processo a bactéria induz a célula sofrer apoptose sendo liberada para invadir novas células. Por fim, estes fagócitos infectados podem disseminar-se através do sistema linfático e da corrente sanguínea.

Todo esse mecanismo de invasão da *Salmonella*, provoca uma intensa resposta inflamatória, que leva a liberação de prostaglandinas que estimulam a adenilato ciclase nas células intestinais a inibir a absorção de sódio e aumentar a secreção de cloro ocasionando diarreia aquosa (FÀBREGA & VILA, 2013).

Sendo assim, devido à importância dos probióticos em prevenir infecções intestinais causadas por patógenos como *S. enterica*, mostra a relevância deste trabalho.

2 | OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora do *Lactobacillus rhamnosus* V5, produtor de exopolissacarídeos (EPS) contra a *S.Typhimurium*.

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA e amplificação por PCR

Os DNAs genômicos totais de *Lactobacillus rhamnosus* V5 foram extraídos usando o Blood kit B Puregene® (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As subunidades ribossômicas bacterianas foram utilizadas 16S primers neste estudo (conjuntos de primers: 16S Fw: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 'e 16S Rev: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3 »). A temperatura de fusão da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi de 59°C. Um PCR mistura de reação incluía 2 mL de DNA modelo extraído (50ng), 2 mL de dNTPs (0,2 mM; Invitrogen, EUA), 0,2 µL de Taq High Fidelity (5 U / µL; Invitrogen, EUA), 5 µL de tampão (10 x; Invitrogen, EUA), 3 µL de MgSO₄ (50 mM; Invitrogen, EUA) e 37 µL de água desionizada, totalizando um volume de 50 µL. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose em 1% em TAE (acetato Tris 20 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 mM) a 80 V e 400 mA durante 30 min. Depois de que, o DNA foi extraído do gel e purificado usando extração rápida de gel Kit PureLink™ (Invitrogen, EUA). Os ciclos de PCR consistiram em 94°C de desnaturação inicial por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min e 68°C por 2 min, seguidos por 10 min de extensão a 68°C.

3.2 Cepas

A cepa *Lactobacillus rhamnosus* V5 foi obtida a partir de uma mistura de várias bactérias “Viili” do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. A cepa *Lactobacillus* foi cultivada em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA), a uma temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% (v / v) de CO₂ por 18 h.

Um patógeno atenuado *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium χ3985 UK1 (Δ cya Δ crp) do Centro de Doenças Infecciosas e Vacinologia, Instituto de Biodesign e Escola de Ciências da Vida, Arizona State University, Tempe, AZ, Estados Unidos da América foi cultivado em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) a uma temperatura de 37°C por 18 horas (CURTISS et al., 1989).

3.3 Atividade antimicrobiana do sobrenadante

3.3.1 Obtenção do sobrenadante

Para a realização dos testes, inicialmente realizou-se a extração do sobrenadante. A cepa de *Lactobacillus*, foi semeada em um tubo contendo 10mL caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) à 37°C por 18 h. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 10 min. o sobrenadante obtido foi aspirado e dividido em três microtubos da seguinte forma:

- I. O sobrenadante obtido foi esterilizado por filtração através de uma membrana de microporos de 0,22 µm e 25 mm de diâmetro (Millipore, Billerica, MA, EUA).
- II. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 6,5 - 7,0 com 0,1 NaOH (hidróxido de sódio) e esterilizado por filtração.
- III. O sobrenadante foi submetido a um tratamento térmico a 100°C durante 10 e 20 min, e esterilizado por filtração (ASLIM et al., 2005).

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima

Após a obtenção do sobrenadante (I, II, III), o teste de suscetibilidade foi realizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição, conforme padronizado pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico - CLSI (2011). O teste foi realizado em triplicata em uma placa de 96 poços, com formato em U-bottom.

S. Typhimurium foi inicialmente cultivado em ágar nutriente AN (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 37°C por 18 h, padronizado contra o padrão McFarland 0,5 e diluído 1:100 em salina (NaCl a 0,9%) até atingir a concentração de 10^6 UFC / mL. No controle positivo, o caldo Müller-Hinton (MH) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) e as bactérias foram adicionadas, enquanto no controle negativo apenas o caldo MH foi adicionado. Na primeira linha horizontal da placa foram adicionados 60 µL de caldo MH e 40 µL de sobrenadante e no restante da prancha foram adicionados 50 µL de caldo de MH. As microdiluições foram feitas com as concentrações de sobrenadante variando de 20 a 0,62%. Depois disso, em cada poço foi inoculado com 50 µL da suspensão de *S. Typhimurium* preparada anteriormente e finalmente a placa foi incubada a 37°C durante 24 h e o crescimento bacteriano foi avaliado visualmente.

3.3.3 Ensaio de time-kill curve

Após a análise da CIM do sobrenadante (I), foi realizada a curva de crescimento e morte. *S. Typhimurium* foi cultivado em meio Agar Nutriente (NA) (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) e incubado a 37°C por 18 h após o crescimento bacteriano. Foi

ajustado para uma concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias / mL e 10 µL colocados em três microtubos variando a concentração do sobrenadante, 20%, 10%, e o controle, contendo a bactéria e o caldo MH.

Os microtubos foram incubados a 37°C e avaliados nos momentos seguintes; 0h, 2h, 4h, 7h, 10h e 24h. Em cada período realizou-se diluição seriada e plaqueamento em triplicata no meio MH agar. A contagem de CFU foi realizada após 24 h de incubação a 37°C.

3.4 Antagonismo, “spot on the lawn”

A atividade antimicrobiana de lactobacilos contra *S. Typhimurium* foi determinada pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, realizado de acordo com a metodologia descrita por Lima e colaboradores (2007). Os lactobacilos foram cultivados em caldo MRS e incubados a uma temperatura de 37°C por 24 h sob condições aeróbicas. Posteriormente, alíquotas desta cultura foram adicionadas em forma de ponto à placa de ágar MRS. Após a secagem estar completa, a placa foi incubada sob condições aeróbicas a uma temperatura de 37°C, durante 8 h.

S. Typhimurium foi previamente semeado em Agar Nutriente (NA) a 37°C por 24 h, e padronizado de acordo com a escala de McFarland 0,5 (correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC / mL). Em seguida, 250 µL da bactéria foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer contendo 25 mL de ágar semi-sólido Muller-Hinton (MH), onde foi homogeneizado para ser vertido na placa de cultura de *Lactobacillus*. Após completa solidificação da camada superior, a placa foi incubada por mais 24 h a 37°C sob condições aeróbicas. A presença de halos de inibição indica a produção de substâncias com atividade antimicrobiana.

3.5 Análise estatística

Para análise dos dados da curva de crescimento e morte, análise de variância (ANOVA) foi realizado, e o teste de Tukey para comparar as médias, considerando um planejamento fatorial, os fatores sendo os tratamentos, e os níveis os tempos. O nível de significância adotado foi de 5%, e as análises foram realizadas utilizando o software R versão 3.4.4 (2018).

4 | RESULTADOS

4.1 Identificação do *Lactobacillus rhamnosus* V5

A caracterização molecular da espécie foi realizada por meio de PCR em que a região amplificada foi o gene RNA ribossomal 16S cuja sequência foi depositada em Banco de dados do GenBank sob o número de acesso MG209517.

4.2 Atividade antimicrobiana do sobrenadante

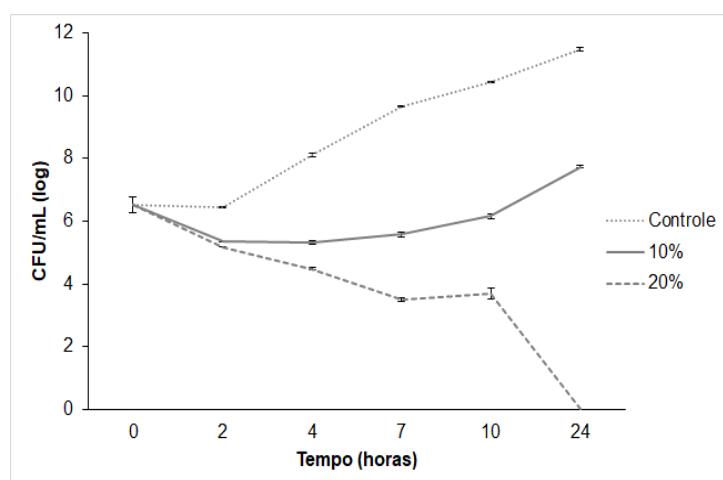
4.2.1 Concentração Inibitória Mínima

No presente estudo, o sobrenadante (I) demonstrou atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium* foi de 10%. O sobrenadante (II) foi sensível à neutralização com solução de NaOH 1N, perdendo totalmente a atividade antimicrobiana. O sobrenadante (III) não foi resistente a tratamentos térmicos.

A concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium* foi de 10%, demonstrando que a atividade antimicrobiana verificada no experimento pode ser devido à presença de ácidos. Durante o crescimento de bactérias do ácido láctico, ocorre uma queda no pH, tornando o ambiente bastante ácido, principalmente devido à produção de ácidos como o ácido láctico. A bacteriocina produzida por LAB (bactérias ácido lácticas) tem baixo peso molecular e são facilmente desnaturadas por tratamentos térmicos.

4.3 Ensaio de time-kill curve

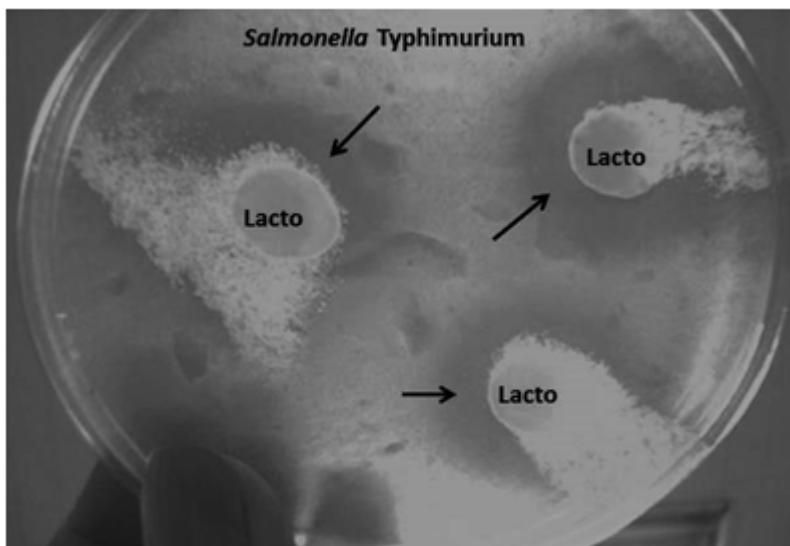
Após determinar a concentração inibitória mínima do sobrenadante contra *S. Typhimurium*, foi realizado o ensaio de time-kill curve. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas considerando ($p<0,10$). O sobrenadante à 10% foi capaz de inibir o crescimento da bactéria, mas após o período de 10h a bactéria começou a se multiplicar e ao final do tempo de 24h teve um aumento de 1 log em relação do inoculo inicial, mostrando-se bacteriostático. Mas em comparação ao controle, no tempo de 24h teve uma diferença de 4 logs. O sobrenadante à 20% teve ação bactericida, diminuindo gradativamente o número de células viáveis, eliminando 100% da população bacteriana em 24 h (Figura 1).



Curva de crescimento e morte de *Salmonella Typhimurium* na presença de sobrenadante não neutralizado de *L. rhamnosus* (Figura 1).

4.4 Antagonismo, “spot on the lawn”

O método de antagonismo mostrou que os lactobacilos possuem atividade antimicrobiana capaz de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* formando um halo de inibição de 21mm de diâmetro (Figura 2).



Ensaio de antagonismo por “Spot-on-the-lawn” entre *Salmonella Typhimurium* e *L. rhamnosus*. As setas indicam halos de inibição em torno do inóculo de *L. rhamnosus* (Lacto) (Figura 2).

5 | DISCUSSÃO

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos de probióticos. Por exemplo, as bacteriocinas produzidas pelos probióticos podem inibir as bactérias patogênicas, prevenindo a infecção em humanos ou outros animais (Gómez et al., 2016). No entanto, nossos resultados sustentam que a atividade inibidora observada nos ensaios *in vitro* ocorreu devido à produção de ácidos orgânicos, o que reduziu o pH do meio. Este efeito foi semelhante aos estudos de Ogawa e colaboradores (2001) e Pereira e Gómez (2007).

Portanto, concluímos que *L. rhamnosus* V5 pode ser um potencial probiótico para controlar a salmonelose, para isso serão necessários testes em culturas de células, desafio *in vivo* em camundongos com análise microbiológica e histopatológica para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação benéfica de *L. rhamnosus* V5 como probiótico.

REFERENCIAS

- ALVARÉZ-ORDÓÑEZ, A.; BEGLEY, M.; PRIETO, M.; MESSENS, W.; LÓPEZ, M.; BERNARDO, A.; HILL, C. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, v.157, p. 3268-3281, 2011.

ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z.N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p. 691-694, 2005.

CURTIS, R.; KELLY, S.M.; GULIG, P.A.; NAKAYAMA, K. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.146, p.35-49, 1989.

FÀBREGA, A.; VILA J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n.2, p.308-341, 2013.

FERREIRA, C.L.F.; SILVA, A.C. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**, 1ed.RJ, Editora Rubio Ltda. 2012.v.9, p.145-160.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 16, p. 5129–5135, 1991.

GÓMEZ, N.C.; RAMIRO, J.M.P.; QUECAN, B.X. V.; de MELO FRANCO, B.D.G. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology** v.7, p.1-15, 2016.

HASSAN, A. N. ADSA Foundation Scholar Award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1282-1298, 2008.

HAYEK, S.A.; IBRAHIM, S.A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p.73-87, 2013.

JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **Journal of Experimental Medicine**, v.180, p.15-23, 1994.

KLOPPER, K.B.; DEANE, S.M.; DICKS, L.M.T. Aciduric Strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus*, Isolated from Human Feces, Have Strong Adhesion and Aggregation Properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.10, n.1, p.89-97, 2018.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C. J. de. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.4, p.728-764, 2008.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C. BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.103-107, 2007.

MAHAJAN, B.; SINGH, V. Recent trends in probiotics and health management: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, p.1643-1652, 2014.

OCHOA, I.M.F; RODRÍGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n.1-2, p. 25-42, 2005.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanism of probiotic action – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.1, p. 57-62, 2010.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology** v.68, p.135-140, 2001.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina Ciencias Agrarias** v.28, p.229–240, 2007.

RUBY, T.; McLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. *Salmonella's* long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.3, p.600-615, 2012.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, 2006

BIOFILME BACTERIANO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS : TEM COMO EVITAR?

Natara Favaro Tosoni

Naiele Mucke

Márcia Regina Terra

Márcia Cristina Furlaneto

Luciana Furlaneto Maia

persisters, que irão constituir biofilme em outra superfície. Como alternativa a esta problemática, abordamos a utilização de bacteriocinas, destacando a eficiência desta contra biofilme de *Enterococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

PALAVRAS-CHAVE: Sanitizantes; Bacteriocinas; Células *Persisters*

ABSTRACT: The equipment in the food industry is prone to high microbiological contamination due to the presence of substrates for the microorganisms, and when unhygienic they allow the microorganisms to develop and even form biofilms, contaminating the final product. Microbial biofilms are communities composed of sessile, mono or multispecies cells, adhered to a substrate, embedded in a matrix of EPS, in the formation of which the microorganisms exhibit differentiated phenotypes, metabolism, physiology and genetic transcription. This summary aims to bring to readers of different areas, more detailed information regarding the different interferences in the formation of bacterial biofilm, as well as some current strategies to combat them. It is known that chemical sanitizers do not completely eliminate the formed biofilm, and the incorrect use of these chemical agents or in inadequate concentrations may promote the selection of

RESUMO: Os equipamentos na indústria alimentícia estão propensos à alta contaminação microbiológica devido à presença de substratos para os micro-organismos, e quando não higienizados permitem que os microrganismos se desenvolvam e até formem biofilmes, contaminando o produto final. Os biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de EPS, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Este resumo visa trazer aos leitores de diferentes áreas, informações mais detalhadas em relação à formação de biofilme bacteriano, bem como diferentes interferências na formação deste, além de estratégias atuais para combate-los. É de conhecimento que sanitizantes químicos não eliminam por completo o biofilme formado, sendo que a utilização incorreta desses agentes químicos ou em concentrações inadequadas, pode promover a seleção de algumas espécies bacterianas resistentes, e liberação de células

some resistant bacterial species and the release of persister cells, which will constitute biofilm on another surface . As an alternative to this problem, we discuss the use of bacteriocins, highlighting the efficiency of this biofilm of *Enterococcus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in studies conducted by our research group.

KEYWORDS: Sanitizers; Bacteriocins; Persisters Cells

1 | BIOFILME BACTERIANO: FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO

Os biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato biótico ou abiótico, circundado por uma matriz exopolissacarídica (EPS), contendo ácidos nucléicos, proteínas e outras substâncias (MOHAMED et al., 2004). Os microrganismos em biofilme podem apresentar diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002) (Figura 1 A).

A formação de biofilmes é considerada uma problemática com relação à área ambiental, industrial e da saúde, devido essas comunidades microbianas expressarem propriedades específicas, tais como o aumento da resistência a antibióticos, a luz UV, a produtos químicos como os biocidas; aumento das taxas de troca de material genético, alteração na biodegradabilidade e aumento na produção de metabólitos secundário (PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA, 2003).

Segundo Watnick e Kolter (2000) os microrganismos, denominados de células planctônicas, se aproximam da superfície, formando uma associação provisória com a própria superfície e/ou outros microrganismos. Essa adesão inicial irá depender do tipo de material que o microrganismo irá se aderir; se for uma superfície abiótica, essas interações podem ocorrer por interações físico-químicas não específicas, já em superfícies bióticas a interação microrganismo/superfície é mediadas por ligações moleculares específicas do tipo receptor-ligante (DUNNE, 2002) (Figura 1B).

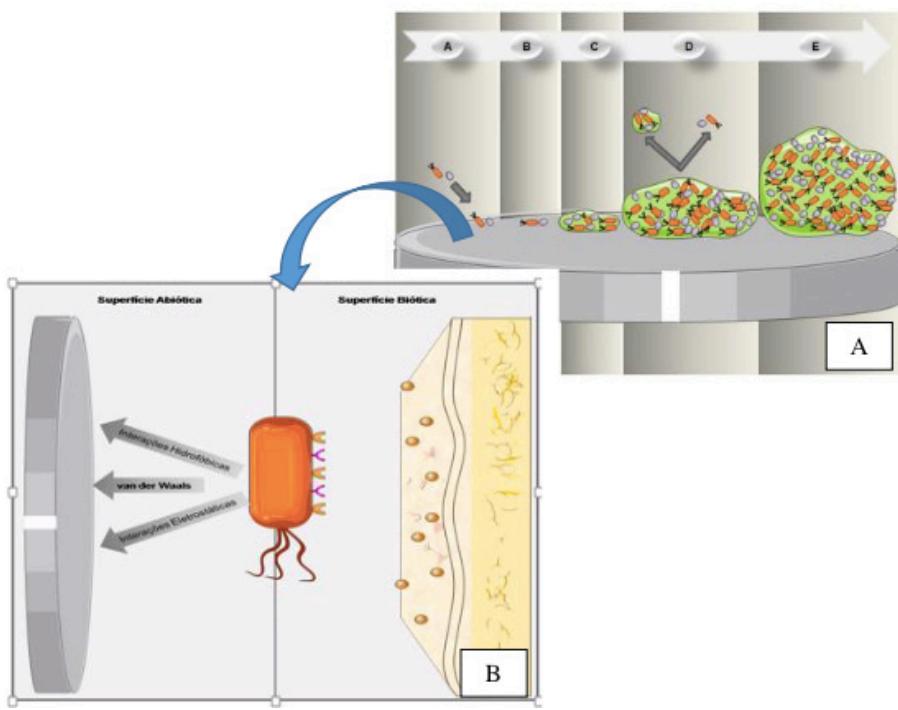


Figura 1 – (A) Representação esquemática da formação de biofilme multi espécie. Em (A/B) adesão do microrganismo na superfície; (C) formação de microcolônias e interação célula-célula; (D) desprendimento de células do biofilme; (E) biofilme maduro. **(B)** Interações envolvidas na adesão de células bacterianas planctônicas à superfície abiótica e biótica. As interações físico-químicas não específicas, envolvidas na adesão reversível, incluem as interações eletrostáticas de van der Waals e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e por adesinas, podendo culminar na adesão irreversível.

Após o processo de adesão, ocorre à formação de microcolônias e produção de exopolissacarídeos (EPS), que passam a estabilizar a associação. O EPS são componentes primordiais na estrutura e integridade funcional do biofilme, agindo como agregador de células, formação tridimensional e barreira defensiva contra agentes químicos diversos. As células aderidas que compõem o biofilme são denominadas de células sésseis. Vários elementos exercem influência no processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos, como hidrofobicidade, carga da superfície, temperatura, presença de substrato, aparatos celulares como pili, fimbrias e flagelos, diferenças existentes entre as superfícies utilizadas no processamento de alimentos e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização. Segundo Pereira et al. (2000) a topografia das superfícies, como sua composição, rugosidade e porosidade também podem ser determinantes para este processo. Uma vez que as bactérias estejam ligadas irreversíveis a uma superfície, o processo de maturação do biofilme inicia-se. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que os organismos aderidos iniciam sua replicação e os componentes extracelulares gerados por esses organismos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar a matriz ou exopolissacarídeo (EPS). Esta substância envolve as células no interior do biofilme, fortalece a adesão entre as células, promove o suporte estrutural do biofilme e pode

agir como receptor para novas interações. O EPS é composto principalmente de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos (STOODLEY et al., 2002).

Além do EPS, também compõem a matriz do biofilme DNA, adesinas e demais proteínas da família de componentes de superfície microbianos, responsáveis por mediar à aderência de diferentes tipos de células às superfícies (CUCARELLA et al., 2001). Os apêndices bacterianos, como pili e fimbrias também estão envolvidos no desenvolvimento de biofilme, pois promovem o contato célula-célula (VAN HOUDT e MICHIELS, 2010).

Fimbrias são finos filamentos proteicos que se projetam da superfície celular e são classificados com base em suas propriedades adesivas, antigênicas ou físicas, ou com base em semelhanças na sequência primária de aminoácidos de suas principais subunidades protéicas. As fimbrias tipo 1, que são em forma de bastonete e têm aproximadamente 7 nm de largura e 1 nm de comprimento, são as adesinas mais comuns encontradas tanto em *E. coli* patogênica quanto comensal, bem como em outras *Enterobacteriaceae*. O papel das fimbrias na formação de biofilme tem sido estudado de forma exaustiva em cepas de *E. coli*, demonstrando ser responsáveis na fixação inicial da célula à superfícies (BELOIN et al. 2004; REN et al. 2004). Foram descritas a adesão por fimbrias cepas de *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (COOKSON et al. 2002), em aderência ao Teflon e aço inoxidável por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e na formação de biofilme em poliestireno para *Klebsiella pneumoniae* (SCHEMBRI et al. 2005).

Fimbrias curli (fimbrias finas agregativas em *Salmonella*) são estruturas filamentosas proteicas finas, formadas pela precipitação extracelular. Foi demonstrado aumento na formação de fimbrias curli na formação de biofilme de *E. coli* O157: H7 em aço Inoxidável (RYU et al. 2004). Além das fimbrias curli, a celulose também está geralmente associada com biofilmes de várias salmonelas, incluindo cepas do sorovar Typhimurium (JAIN e CHEN 2007). A produção simultânea de celulose e curli leva à formação de uma matriz extracelular hidrofóbica, altamente inerte, na qual as células são incorporadas (ZOGAJ et al. 2001). Entretanto, outros polissacarídeos capsulares podem estar presentes na matriz de biofilme extracelular de *Salmonella* (de REZENDE et al. 2005), e a composição exata depende das condições ambientais em que os biofilmes são formados (PROUTY e GUNN 2003) (Figura 2).

A camada de lipopolissacarídeo (LPS) em bactérias Gram-negativas, consiste de uma superfície contendo o O-antígeno o, uma estrutura nuclear e uma porção lipídica A que é incorporado na bicamada lipídica da membrana externa. O LPS não afeta apenas a suscetibilidade da bactéria a desinfetantes, antibióticos e outras moléculas tóxicas (RUSSELL e FURR 1986), mas também desempenha um papel na formação de biofilme. O ácido colânico do EPS (ou antígeno M) produzido pela maioria das cepas de *E. coli*, bem como por outras espécies do grupo das *Enterobacteriaceae*, parece ser importante para estabelecer a estrutura complexa e profundidade de biofilmes de *E. coli*, porém não estando correlacionado com a adesão inicial a superfícies abióticas.

(PRIGENT-COMBARET et al., 2000).

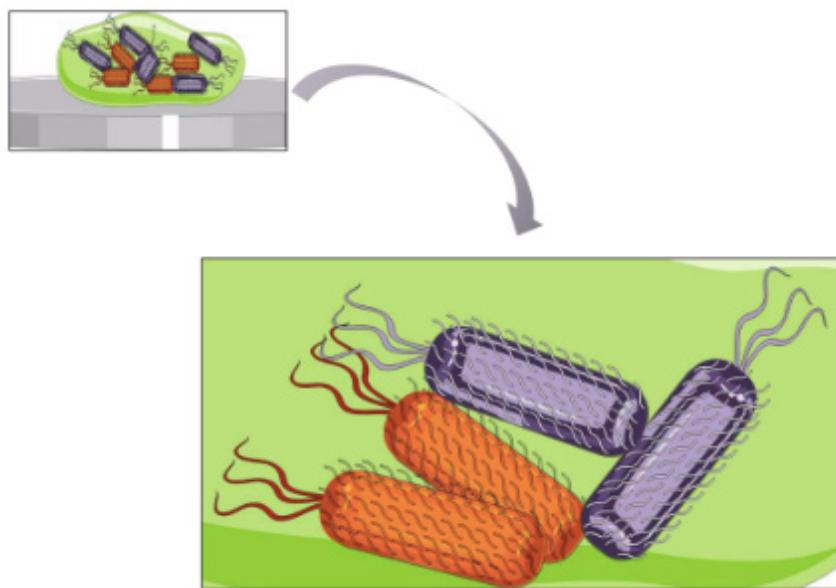


Figura 2– Representação das estruturas flagelo (filamentos maiores), fimbrias *curli* (filamentos menores) e matriz (cor verde) que auxiliam na formação de biofilme

Outros fatores que controlam o amadurecimento das microcolônias são pH, perfusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade. Em determinado momento, o biofilme alcança uma massa crítica e um equilíbrio dinâmico é criado de forma que as camadas mais externas do biofilme começam a gerar células planctônicas, ou seja, inicia-se a liberação de células da estrutura formada, sendo capazes de colonizar outras superfícies (DUNNE, 2002). O biofilme maduro pode apresentar microcanais internos, úteis na distribuição de nutrientes e água, no escoamento de metabólitos, enzimas alginatoliases e as proteases, necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (QS). Esse sistema de comunicação célula-célula, é outro fator que tem sido considerado de grande importância para a formação de biofilmes microbianos. Neste sistema as bactérias sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, denominados de autoindutores (Als), que irão modular e influenciar a formação do biofilme, modulando também outras funções como esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação, além de favorecer o acesso a nutrientes (HALL-STOODLEY et al, 2004).

Sob determinadas situações, devido a uma programação celular, ocorre o desprendimento de células pertencentes ao biofilme (células sésseis) ou de grupos de células unidas pelo EPS que podem colonizar novo local (BAYLES, 2007). O metabolismo de carboidratos também regula a produção de biofilme entre as várias bactérias gram-positivas, incluindo *E. faecalis*, sendo que um regulador transcricional dependente de glicose (PILLAI et al., 2004). Estudos realizados com *E. faecalis* e *E. faecium* demonstraram que a glicose teve influência positiva do carboidrato na capacidade

de formação de biofilme destes microrganismos (PILLAI et al., 2004; CASSENEGO, 2014). Ainda, fatores ambientais como temperatura, pH, presença de nutrientes, osmolaridade, presença de outras bactérias e tipo de superfície também interferem na formação de biofilme (MOHAMED; HUANG, 2007; VAN HOUDT; MICHELS, 2010). MARINHO et al. (2013) também revelaram que a temperatura influencia na formação de biofilme, sendo que em 10°C inibiu fortemente o desenvolvimento de biofilme e a 37°C ocorreu o melhor desempenho de formação de biofilme nos isolados de *E. faecium*.

2 | BIOFILME BACTERIANO NA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

A formação de biofilme em superfícies utilizadas na produção de alimentos vem recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (FUSTER-VALLS et al., 2008; MANSFELD, 2007). Biofilmes de microrganismos potencialmente patogênicos foram detectados em alimentos e em superfícies de processamento de alimentos, comprometendo a higiene dos mesmos bem como podendo atuar como reservatório de patógenos e microrganismos deteriorantes. Em última instância biofilmes microbianos produzidos em superfícies de alimentos representam um risco para a saúde pública (SHI; SHU, 2009; VAN HOUDT; MICHELS, 2010; FONSECA 2010). A fixação de microrganismos na superfície de alimentos pode ser considerada como um primeiro passo para a deterioração desses produtos, e sua permanência e crescimento dependem de sua capacidade de se manter aderido. Assim o conhecimento sobre as características de formação de biofilmes em alimentos frescos é útil para estabelecer diretrizes sobre armazenamento seguro (BAE et al., 2014).

Outra problemática envolvendo a formação de biofilme na indústria de alimentos é a capacidade das células sésseis serem resistentes aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Alguns pesquisadores relatam que as células sésseis chegam a ser de 500 a 1000 vezes mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2002). Um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção é a matriz de EPS, que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas, conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecção. Ainda, alguns subprodutos celulares do biofilme aceleram a corrosão do aço inoxidável, e dificultam a troca de calor, reduz o fluxo de fluidos e filtração por membranas (LIAQAT et al., 2013). Devido a este agravante, conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme e as suas fragilidades é primordial para que

estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam dimensionadas para a eliminação de mais esta possibilidade de introdução de microrganismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

Diversas superfícies utilizadas no setor, tais como o aço inoxidável, vidro, borracha, policarbonato, poliuretano, poliestireno, polipropileno, titânio, alumínio e cerâmica vem sendo investigados quando a capacidade de adesão microbiana (DI CICCIO et al., 2015). Após a formação do biofilme, os microrganismos que se encontram em seu interior são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos, alta turbulência e à ação de agentes químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008).

Resíduos de produtos cárneos, como pequenas quantidades de extrato de carne, salsichas ou gordura animal, pode inicialmente interferir na adesão das células para formação de biofilme em *L. monocytogenes*, porém, com o tempo esses resíduos servem de nutrientes, aumentando o número de células no biofilme além da sobrevida prolongada em uma variedade de materiais, incluindo aço inoxidável, borracha de correia transportadora, e materiais de parede e chão (SOMERS e WONG 2004). Leite desnatado e proteínas do leite, como caseína e lactalbumina, também foram relatados com a redução significativa da fixação de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Salmonella Typhimurium*, esporos e células vegetativas de bacilos termofílicos e *L. monocytogenes* a aço inoxidável e gaxetas de borracha buna-n (PARKAR et al. 2001), contudo, posteriormente servindo de nutrientes às células. Allan et al. (2004) mostraram que as taxas de sobrevivência de *L. monocytogenes* a várias superfícies, incluindo aço inoxidável, resina acetal, argamassa e plástico reforçado com fibra de vidro, foram maiores na presença de solo biológico.

2.1 Controle químico de biofilme

A indústria de alimentos utiliza diversas estratégias de higienização dos equipamento, no entanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes sobre biofilmes bacterianos, selecionando fenótipos resistentes (SIMÕES et al., 2010). Diferentes produtos químicos podem ser utilizados no processo de sanitização de utensílios e equipamentos, incluindo produtos tensoativos ou alcalinos, usados para suspender e dissolver os restos de alimentos pela diminuição da tensão superficial, ou emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas (MAUKONEN et al., 2003).

Uma ampla gama de desinfetantes químicos é usada nos alimentos indústria, que pode ser dividida em diferentes grupos de acordo com o seu modo de ação: (i) agentes oxidantes incluindo compostos à base de cloro, peróxido de hidrogênio, ozono e PAA, (ii) compostos de superfície ativa, incluindo compostos quaternários de amônio e compostos aniónicos ácidos, e (iii) iodóforos. A eficiência da desinfecção é influenciada pelo pH, temperatura, concentração, tempo de contato e interferindo em substâncias orgânicas como alimentos partículas e sujeira (KUDA et al., 2008).

Agentes de limpeza como detergentes e enzimas são freqüentemente combinadas com desinfetantes para aumentar sinergicamente a eficiência da desinfecção. O aumento da resistência de células de biofilme a biocidas, pelo menos parcialmente por causa da interferência da matriz exopolimérica, explica porque o desinfetante que é mais eficaz para as células planctônicas não é necessariamente o mais ativo contra as células do biofilme. Meyer (2003) classificou a eficiência de desinfetantes para eliminar células de biofilme e concluíram que a eficácia aumentou a partir de compostos de amônio quaternário sobre anfóteros, cloro e biguanidas. Embora o hipoclorito seja amplamente utilizado, há controvérsias sobre sua eficiência em biofilme bacteriano (SREY *et al.*, 2013), devido à baixa eficiência de difusão pelo EPS. Para remover os microrganismos do biofilme, a solução de higienização deve ser capaz de penetrar na matriz de EPS e ganhar acesso às células microbianas promovendo a inativação destas e sua remoção (SOUZA *et al.*, 2014).

Numerosos relatos indicam que a eficácia antimicrobiana de vários sanitizantes aquosos é menor na presença de biofilme de *Salmonella* spp. Nove desinfetantes comumente usados na indústria foram avaliados contra no biofilme de *Salmonella* sp, mostrando um efeito bactericida que variou a eficácia na presença de etanol a 70% (MORETRO e LANGSRUD 2004), fosfato trissódico (SCHER *et al.* 2005) e ao cloro e iodo (JOSEPH *et al.* 2001). Os demais sanitizantes não apresentaram eficácia.

Biofilmes de *Listeria monocytogenes* foram mais resistente a agentes de limpeza e desinfetantes, incluindo fosfato trissódico, cloro, ozônio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético (PAA) e amônia quaternária compostos (Stopforth *et al.* 2002; Somers e Wong 2004; Robbins *et al.* 2005). Biofilmes de *Lactobacillus plantarum* apresentaram resistência a vários ácidos orgânicos, etanol e hipoclorito de sódio (KUBOTA *et al.* 2009).

Em estudo realizado por Mucke (2016), demonstrou a eficiência de cinco desinfetantes químicos, utilizados na indústria de alimentos, contra biofilme de *Enterococcus* sp. Este estudo mostrou que mesmo após 1 hora da presença do desinfetante com o biofilme formado, não houve redução total da estrutura de biofilme (Figura 3). Esses dados nos mostram que os microrganismos remanescentes presentes no biofilme são mais resistentes aos agentes químicos. Castro (2012) avaliou a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético e digluconato de clorexidina, sobre a formação de biofilme de *E. faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* em superfície de aço inoxidável. Embora os sanitizantes tenham sido utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes e frequentemente utilizadas nas indústrias de alimentos, estes não eliminaram o biofilme formado por estes microrganismos. Jessen e Lammert (2003) explicam que a remoção de microrganismos de superfícies de contato torna-se muito mais complicada após a formação do biofilme maduro, sendo mais eficiente adotar várias ações combinadas.

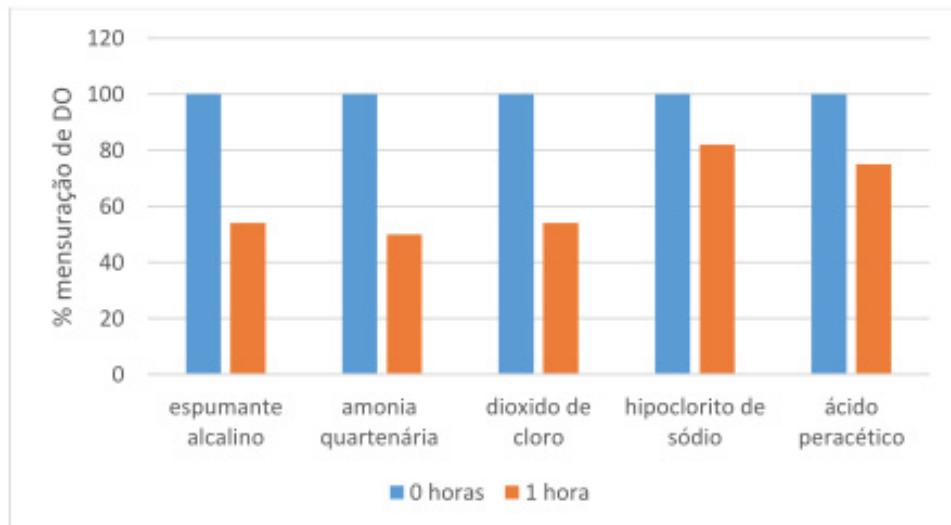


Figura 3 – Porcentual de células viáveis de *Enterococcus* sp após 1 hora na presença dos principais desinfetantes químicos de utilização industrial.

Meira et al. (2012) e Souza et al. (2014) verificaram o efeito de ácido peracético e hipoclorito de sódio sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, contudo, estes não foram eficientes para a completa remoção das células do biofilme. As células *persisters*, aderidas às superfícies, após a aplicação de sanitizantes reforçam o biofilme como uma fonte provável de contaminação cruzada, principalmente em superfícies de processamento de alimentos (figura 4). Apesar das estratégias e conceitos de segurança na indústria de alimentos, ainda há vários problemas relacionados à contaminação de alimentos por patógenos alimentares (DI CICCIO et al., 2015). Uma alternativa para aumentar a segurança de alimentos envolve o uso de produtos provenientes do metabolismo das bactérias (ROSS et al. 2002). Dentre estes, destaca-se o uso de bacteriocinas.

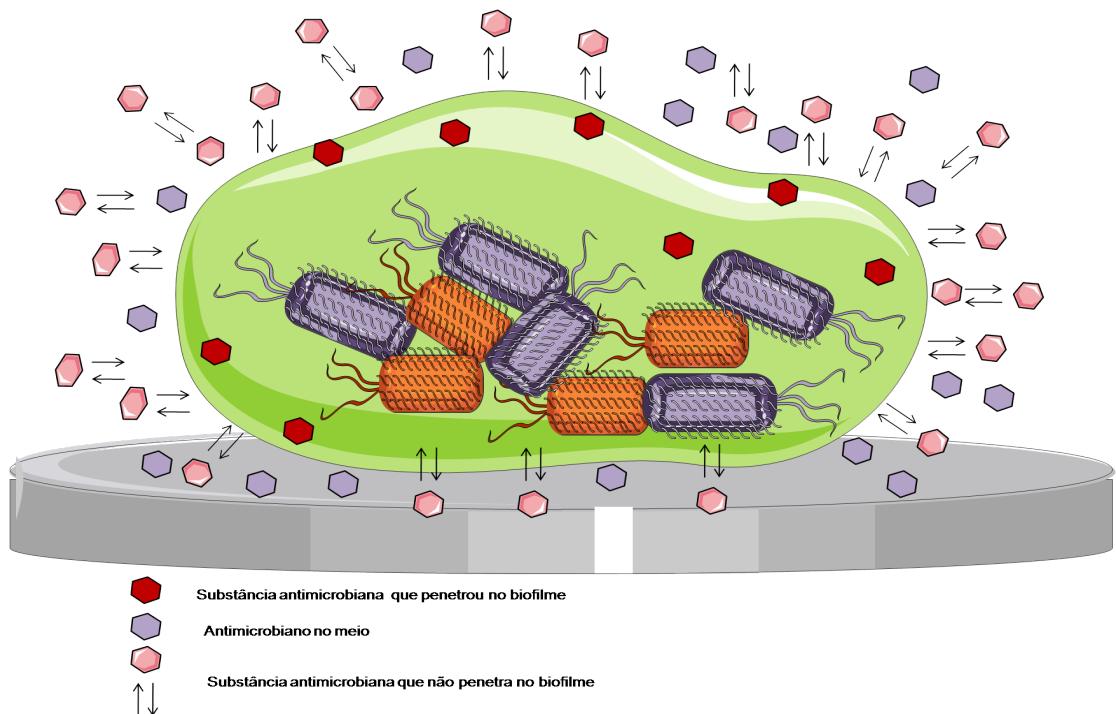


Figura 4 – Ação limitada de substâncias antimicrobianas sobre células do biofilme.

2.2 Bacteriocinas no controle de biofilme bacteriano

Bacteriocinas são peptídeos ou pequenas proteínas com atividade antimicrobiana produzidas por diferentes gêneros bacterianos (Figura 5). Tais peptídeos antimicrobianos são ativos contra patógenos de origem alimentar, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e células vegetativas e esporos de *Clostridium botulinum* (GIRAFFA et al., 2003). As bacteriocinas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos com base em sua estrutura como, por exemplo, similaridades entre a sequência primária, propriedades físico-químicas, sequência líder e número de peptídeos que constituem sua atividade, e principalmente com base em seu modo de ação. Cotter et al (2013) definiu quatro classes de bacteriocinas (Figura 6).

A maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniónicos presentes na membrana plasmática das bactérias alvo, sendo ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas, já que essas são caracterizadas por um elevado teor de lipídeos aniónicos na membrana. A maioria das bacteriocinas torna permeabilizando à membrana celular permeável por meio da formação de poros, o que promove a dissipação da força próton motora (PMF) e inibição do transporte de aminoácidos. A PMF está envolvida em diversos processos na membrana citoplasmática, tais como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (ABEE et al., 1995).

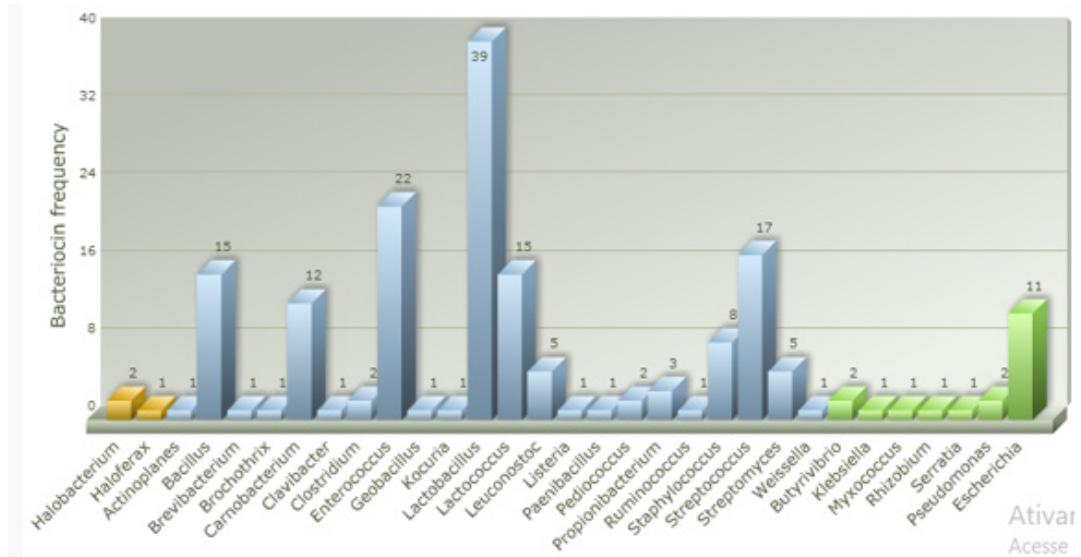


Figura 5 – Bacteriocinas distribuídas entre os gêneros bacterianos fornecidos pela plataforma database Bactibase (2018).

Bacteriocinas também podem inibir bactérias Gram-negativas, neste caso necessitam transpor a membrana externa e alcançar a membrana plasmática da célula alvo para atuarem. Em contato com a membrana plasmática são capazes de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas. A exemplo, microcina B17 inibe a enzima DNA-girase, e microcina J25 inibe a RNA polimerase (COTTER et al., 2013). Bactérias produtoras de bacteriocinas possuem um mecanismo de imunidade que as protegem da ação de suas próprias bacteriocinas. A proteção é conferida por um peptídeo de imunidade expresso concomitantemente às bacteriocinas. A proteína de imunidade pode estar fracamente associada ou não associada às proteínas receptoras de membrana (manose fosfotransferase - Man-PTS). Quando a bacteriocina é produzida, a proteína de imunidade se liga ao receptor evitando que a bacteriocina se ligue a ele e forme poros na membrana citoplasmática, o que provocaria a lise celular.

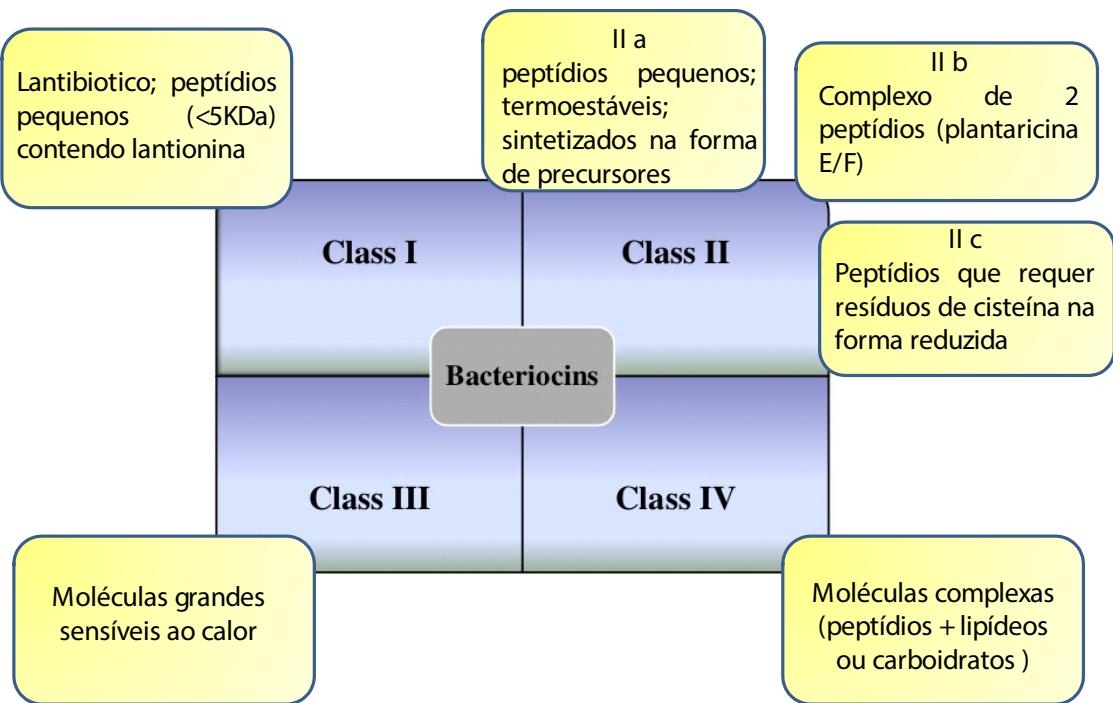


Figura 6 - Classificação das bacteriocinas segundo Cotter et al (2013), com modificações.

Nisina é a bacteriocina mais comumente empregada na conservação de alimentos, tanto a nível nacional quanto mundial, sendo utilizada principalmente em queijos pasteurizados para prevenir o crescimento indesejável de bactérias Gram-positivas esporogênicas deterioradoras. Embora há diversos relatos da inibição de biofilme bacteriano por nisina, este peptídeo possui melhor ação contra bactérias Gram-positivas (JOERGER, 2003). Por este fato, diversos estudos têm focado no isolamento de novos isolados bacterianos produtores de bacteriocina, que apresentem ação antagônica contra bactérias Gram-postivas e Gram-negativas, quando em formação de biofilme.

Zhao et al. (2004) demonstraram que bacteriocina produzida por *Enterococcus duranse* e *Lactococcus lactis* foram capazes de reduzir mais de 5 log UFC/cm² de biofilme de *Listeria monocytogenes*. Minei et al. (2008) descreveram a redução na formação de biofilme em cupons de aço inox, quando co-cultivado *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecium* bacteriogênicos. Winkelströter et al (2015) também comprovaram a diminuição da formação de biofilme quando *Lactobacillus paraplatnarum* e *L. monocytogenes* foram crescidos em co-cultivo. Células planctônicas e biofilme de *Bacillus subtilis* foram afetados apôs contato com bacteriocina produzida por *L. acidophilus*. Nisina A e lacticina Q também apresentaram efeito antagônico contra biofilme de *Staphylococcus aureus* (Okuda et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa avaliou a eficiência de bacteriocina (enterocinas) produzida por isolados de *Enterococcus* sp sobre biofilme formado de *L. monocytogenes*. Foram testados enterocinas produzidas por 4 isolados bacterianos, mostrando diminuição considerável na formação de biofilme (Figura 8 A). A figura 8 (B) apresenta resultado da enterocina contra biofilme de *E. coli* e *Salmonella* sp. Neste estudo,

utilizamos a mensuração da biomassa total do biofilme com o corante cristal violeta. A intensidade da cor revelada é proporcional com a presença de células/biofilme.

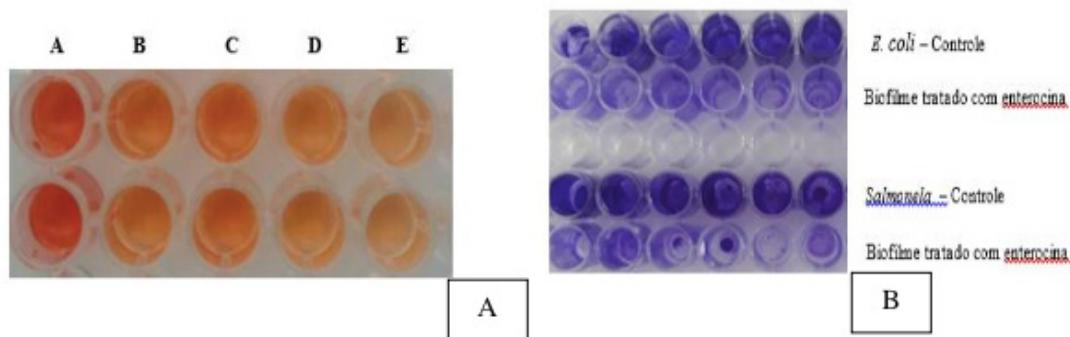


Figura 8 – (A) Biofilme de *Listeria monocytogenes* formado em poços de placa de poliestireno. Em (A) controle; (B a E) biofilme maduro tratado com bacteriocina produzida por *Enterococcus* sp. A revelação da integridade celular no biofilme foi realizada com XTT (cloreto de trifenil tetrazolium), que revela a respiração celular bacteriana. Observar a perda da intensidade de cor (vermelha) no biofilme tratado com enterocina, indicando morte celular. (B) Biofilme de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp e *Enterococcus* sp formado em poços de placa de poliestireno. A quatificação do biofilme foi realizada pela mensuração da biomassa total do biofilme formado, utilizando o corante cristal violeta. Observar a perda da intensidade de cor (azul) no biofilme tratado com enterocina, indicando morte celular.

REFERENCIAS

- ALLAN, J.T., YAN, Z., GENZLINGER, L.L.; KORNACKI, J.L. **Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface.** J Food Prot, v.67, p.2661–2665, 2004.
- BAYLES, K.W. **The biological role of death and lysis in biofilm development.** Nature Reviews Microbiology, v.5; p. 721-726, 2007.
- BELOIN, C., et al. **Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression.** Mol Microbiol, v.51, p.659–674, 2004.
- CASSENEGO, A.P.V. **Análise dos fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados de humanos, alimentos e frangos,** 2014. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia molecular de procariotos) - Instituto de ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- CASTRO, M. S. R. ***Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes.** 2012. 225 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.
- CLONTZ, L. **A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água.** Revista Controle de Contaminação, n. 109, 2008.
- COOKSON, A.L., COOLEY, W.A.; WOODWARD, M.J. **The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces.** Int J Med Microbiol, v.292, p.195–205, 2002.
- COTTER, P. D.; ROSS, R.P; HILL, C. **Bacteriocins — A viable alternative to antibiotics?** Nature Reviews Microbiology, n.11, p.95-105, 2013.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. **Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation.** Journal of Bacteriology, v.183, p.2888-2896, 2001.

de REZENDE, C.E., ANRIANY, Y., CARR, L.E., JOSEPH, S.W.; WEINER, R.M. (2005) **Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104.** Appl Environ Microbiol, v71, p. 7345– 7351, 2005.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINOB, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDIA, E.; GHIDINIA, S.; IANIERI, A. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity.** Food Control, v. 50, p. 930–936, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. ***Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation.** Nature, v.416, p. 740–743, 2002.

DUNNE JUNIOR, W. M. **Bacterial adhesion: see any good biofilm lately?** Clinical Microbiology Reviews, v. 15, p.155-166, 2002.

FONSECA, J.F.S.G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares,** 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

FUSTER-VALLS, N. et al. **Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces.** Food Control, v. 19, n. 3, p. 308- 14, 2008.

GIRAFFA, G. **Functionality of enterococci in dairy products.** International Journal of Food Microbiology, v.88, n.2-3, p.215–222, 2003.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. **Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.** Nat. Rev. Microbiol. 2, 95–108, 2004.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. **Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions.** Food Microbiology, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

KUBOTA, H., SENDA, S., TOKUDA, H., UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. **Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149.** Food Microbiol, v26, p.592–597, 2009.

LIAQAT, S.I. AHMED, N JAHAN. **Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*.** International Journal of Microbiology Research and Reviews, v.1, p. 61-67, 2013.

JAIN, S.; CHEN, J. **Attachment and Biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis.** J Food Prot, v70, p2473–2479, 2007.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. **Biofilm and Desinfection in Meat Processing Plants.** International Biodegradation & Biodegradation, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

JOERGER R. D. **Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages.** Poultry Science Association. V. 82, p. 640-647, 2003.

JOSEPH, B., OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers.** Int J Food Microbiol, v.64, p.367–372, 2001.

OKUDA,K et al. **Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy Aug, p. 1-28, 2013.

KLEMM, P.; KROGFELT, K.A. Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. In **Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines** ed. Klemm, p. 9–26, 1994.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. T. **Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface.** LWT – Food Science and Technology, v. 41, p. 988-993, 2008.

MANSFELD, F. **The interaction of bacteria and metal surfaces.** Electrochimica Acta, v. 52, p. 7670-7680, 2007.

MARINHO, A. R. et al. **Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food Brazilian,** Journal of Microbiology, v. 44, 2, p. 423-426, 2013.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILASANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p.327-356, 2003.

MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. **Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers.** Food Control, v. 25, p. 469-475, 2012.

MEYER, B. **Approaches to prevention, removal and killing of biofilms.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 51, p. 249–253, 2003.

MINEI, C.C., GOMES, B.C., RATTI, R.P., D'ANGELIS, C.E.M.; DE MARTINIS E.C.P. **Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation.** Journal of Food Protection, v. 71, p. 634- 638, 2008.

MOHAMED, J. A.; HUANG, W.; NALLAPAREDDY, S. R.; TENG, F.; MURRAY, B. E. **Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*.** Infection and Immunity, v. 72, p. 3658–3663, 2004.

MOHAMED, J. A.; HUANG, W. **Biofilm formation by enterococci.** Journal of Medical Microbiology, v. 56, p. 1581–1588, 2007.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. ***Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food processing environments.** Biofilms, v. 1, p. 107–121, 2004.

PARKAR, S.G., FLINT, S.H., PALMER, J.S.; BROOKS, J.D. **Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel.** J Appl Microbiol, v.90, p.901–908, 2001.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. **Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 24, p. 181-186, 2000.

PILLAI, S. K.; SAKULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERLING, R. C.; JR, MURRAY, B. E.; INOUYE, R. **Effects of glucose on fcs-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*.** The Journal of Infectious Diseases, v. 190, p. 967–970, 2004.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. **Biofilms: a survival strategy of bacteria.** Current Science, v. 85, p.1299.-1306, 2003.

PRIGENT-COMBARET, C., PRENSIER, G., LE THI, T.T., VIDAL, O. LEJEUNE, P.; DOREL, C. **Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid.** Environ Microbiol, v. 2, p.450–464, 2000.

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. **Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass.** Infect Immun 71, 7154–7158, 2003.

REN, D., BEDZYK, L.A., THOMAS, S.M., YE, R.W. WOOD, T.K. **Gene expression in *Escherichia coli* biofilms.** Appl Microbiol Biotechnol 64, 515–524, 2004.

ROBBINS, J. B., FISHER, C. W., MOLTZ, A. G., MARTIN, S. E. **Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms with ozone, chlorine, and hydrogen peroxide.** Journal of Food Protection, v.68, p.494–498, 2005.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C.; **Preservation and fermentation: past, present and future.** International Journal of Food Microbiology, v. 79, p. 3-16, 2002.

RUSSELL, A.D.; FURR, J.R. **Susceptibility of porin- and lipopolysaccharide-deficient strains of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants.** J Hosp Infect, v. 8, p.47–56, 1986.

RYU, J.H., KIM, H., FRANK, J.F.; BEUCHAT, L.R. **Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production.** Lett Appl Microbiol 39, 359–362, 2004.

SCHEMBRI, M.A., BLOM, J., KROGFELT, K.A. KLEMM, P. **Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*.** Infect Immun, v.73, p. 4626–4633, 2005.

SCHER, K., ROMLING, U.; YARON, S. **Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface.** Appl Environ Microbiol. V.71, p. 1163– 1168, 2005.

SHI, X.; ZHU, X. **Biofilm formation and safety in food industries.** Trends in Food Science & Technology, v. 20, p. 407-413, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. **A review of current and emergent biofilm control strategies.** LWT – Food Science and Technology, v. 43, p. 573-583, 2010.

SOMERS, E.B.; WONG, A.C. **Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue.** J Food Prot, v.67, p.2218–2229, 2004.

SOUZA, E. L. et al. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers.** Brazilian Journal of Microbiology, v.45, p. 67–75, 2014.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HÁ, S.D. **Biofilm formation in food industries: A food safety concern.** Food Control, v. 31, p.572-585, 2013.

STOPFORTH, J.D., SAMELIS, J., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A.; SMITH, G.C. **Biofilm formation by acid-adapted nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh its beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers.** J Food Prot. V.65, p.1717–1727, 2002.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu. Rev. Microbiol. V.56, p.187–209, 2002.

VAN HOUDT, R; MICHELS, CW. **Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface**. Journal Applied Microbiology, v. 109, p. 1117–1131, 2010.

WATNICK, P.; KOLTER, R. **Minireview – Biofilm, City of Microbes**. Journal of Bacteriology, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WINKELSTRÖTER, L. K., TULINI, F. L., DE MARTINIS, E. C. P. **Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplatnarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation**. LWT - Food Science and Technology, v.64, p. 586–592, 2015.

ZHAO, T., DOYLE, M.P. ZHAO, P. **Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms**. Applied and Environmental Microbiology, v.70, p. 3996–4003, 2004.

ZOGAJ, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. ROMLING, U. **The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix**. Mol Microbiol, v. 39, p.1452–1463, 2001.

BIOFILTRO DE RESÍDUO ORGÂNICO APLICADO NA DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA SALOBRA

Francielle Fernandes Gonçalves de Barros

Discentes do Curso Técnico em Meio Ambiente,
Centro Estadual de Educação Profissional de
Curitiba – Paraná.

Rebecca Carvalho Mendes e Silva

Discentes do Curso Técnico em Meio Ambiente,
Centro Estadual de Educação Profissional de
Curitiba – Paraná.

Charles Albert Moises Ferreira

Docente Curso Técnico em Meio Ambiente,
Centro Estadual de Educação Profissional de
Curitiba – Paraná.

Juliana Parolin Ceccon

Docente SEED/PR graduada em ciências
biológicas – Uningá – Paraná

RESUMO: Apenas 2,5% dos recursos hídricos no mundo são de água doce sendo em torno de 0,3% distribuídos de forma desigual sobre a terra. Essa situação gera problemas de escassez de água doce em diferentes países, incluindo o Brasil, onde as localidades mais atingidas encontram-se no Nordeste. Essa região é caracterizada climaticamente como semiárida, principalmente o sertão nordestino, que sofre com a escassez de água devido à baixa pluviosidade. Agravando este cenário, a qualidade de água de poços artesianos apresenta-se quase sempre imprópria para consumo humano devido ao alto grau de

salinidade. Com a escassez de água doce e seus efeitos socioambientais, tem-se buscado novas tecnologias de dessalinização. Confrontando a realidade de que os recursos existentes atualmente são inviáveis para diversas classes sociais, especialistas buscam alternativas para a obtenção de processos sustentáveis que contemplam esta demanda ambiental. Dentro deste contexto o presente trabalho avaliou, em estudo preliminar, o potencial para dessalinização de água salobra de um biofiltro utilizando os resíduos orgânicos do coco correspondente ao endocarpo e a semente de mamão. Obtiveram-se resultados positivos por meio das análises que utilizaram a densidade para avaliar a quantidade de sais retidos, resultando em um percentual de aproximadamente 50% (coco e mamão). A dessalinização por métodos alternativos, dessa maneira, pode representar, no futuro, uma solução para o problema da água salobra e salina.

PALAVRAS-CHAVES: Dessalinizador; salinidade de poços; adsorção; crise hídrica.

**ORGANIC RESIDUE BIOFILTER APPLIED ON
BRACKISH WATER DESALINATION**

ABSTRACT: Only 2,5 % of water resources in the world are of fresh water being around 0,3% distributed unevenly over the Earth. This is to the job has been produced in the continental

countries in the countries, including the Brazil, where more localized localities found themselves in the Northeast. This region is characterized climatically as semi-arid, mainly the northeastern sertão, which suffers from the scarcity of water due to the low rainfall. Aggravating this scenario, the water quality of artesian wells is almost always unfit for human consumption due to the high degree of salinity. With a shortage of fresh and fine water and socio-environmental, it has been looking for new desalination technologies. Confronting the reality of their resources are currently unviable for various social classes, experimentalists seek alternatives to a search for sustainable processes that comprise this environmental demand. In this context the present work is, in preliminary study, the potential for the desalination of brackish water from a biofilter using the organic components of the coconut to the endocarp and the papaya seed. Positive results were obtained through analyses that used the density to evaluate the amount of amount of salts retained, resulting in a percentage of approximately 50% (coconut and papaya). Desalination by alternative methods, in this way, can represent, in the future, a solution to the problem of brackish and saline water.

KEYWORDS: Desalination; salinity of wells; adsorption; water crisis.

1 | INTRODUÇÃO

A água é um complemento do meio ambiente e também é essencial para a existência e qualidade de vida do homem, sendo o principal recurso natural imprescindível para sua sobrevivência. O acesso à água potável é primordial e por isso é um direito humano, segundo o Pacto Internacional sobre os Direitos Econômicos, Social e Cultural.

A qualidade da água para consumo não pode trazer riscos à saúde, a mesma deve atender algumas exigências de natureza física, ou seja, tem de possuir características inodora, incolor e insípida. A participação do governo, dos usuários e das comunidades locais é essencial para o gerenciamento dos recursos hídricos pois a água é um bem natural público (SILVA, 2015).

A distribuição da água no planeta Terra possui uma grande desproporção entre água doce e água salgada, apenas 2,5% representa o número em relação à água doce, o que implica a obtenção de novas tecnologias de dessalinização da água (ANA, 2010).

A escassez da água é eminentemente afetando assim a sua qualidade no sistema de distribuição, a mesma pode sofrer alterações pelo fato de alternância química e biológica causada pela perda de integridade do sistema. A escassez difusa, as destruições sucessivas e a poluição cada vez mais intensa nas nascentes de rios requerem mudanças em atitudes da população, uma conscientização ambiental para que se possa preservar a água.

Na medida em que o problema de escassez se torna cada vez maior é indiscutível procurar-se origens tecnológicas que possam suprir a demanda de forma sustentável que correspondam à procura de água, assim é necessário que se encontre uma origem

que seja sustentável (LIMA, 2015). Segundo o mesmo autor:

Da água salgada no mundo, 97% possui o grau de salinidade que oscila entre 33.000 e 37.000 mg/l de SDT (sólidos dissolvidos totais). Assim para a água salgada possa ser utilizada para a produção de água potável, é necessário à remoção da excessiva concentração de sais presentes, recorrendo assim a uma nova tecnologia, a dessalinização (LIMA, 2015).

A dessalinização por métodos alternativos pode representar, no futuro, uma solução para o problema da água salobra e salina. Alguns desses métodos consistem remoção ou redução da concentração de sais e sólidos dissolvidos nas águas salgadas, para assim se obter a água doce, remove também componentes químico, orgânicos e biológicos.

2 | UNIVERSO DA PESQUISA

2.1 Formulações do problema

É crescente a demanda de água doce em todo o planeta devido ao rápido crescimento populacional. Dos recursos hídricos presentes na superfície e nos aquíferos apenas 2,5% se dispõem em água doce, distribuídos de forma desproporcional pela superfície terrestre.

No Brasil, uma das regiões mais afetadas pela escassez da água é o Nordeste, caracterizado climaticamente como semiárido, algumas áreas em específico o sertão nordestino, possui baixos índices pluviométricos que se restringem há poucos meses (OLIVEIRA, *et al.*, 2017).

Outro problema encontra-se nas áreas em que o clima semiárido é dominante, estando relacionado à hidrografia do tipo intermitente ou sazonal, ou seja, os rios secam no período de estiagem mais rigorosas diminuindo ainda mais a disponibilidade de água doce como recurso hídrico (DANTAS *et al.*, 2010), além disso, a qualidade da água presente em poços artesianos nestas regiões apresenta alto grau de salinidade.

As tecnologias existentes para a dessalinização como, por exemplo, a osmose reversa muito utilizada em países desprovidos de água doce como Dubai requerem investimento e manutenção de elevado custo, inviáveis às cidades e comunidades mais carentes das regiões afetadas pela falta de água. Dentro deste contexto, faz-se necessário o estudo e elaboração de dessalinizadores alternativos, acessíveis e de baixo custo que visem amenizar este problema.

2.2 Objetivos da pesquisa

2.2.1 *Objetivo Geral*

Construir um dessalinizador biológico de baixo custo utilizando biofiltro à base de resíduos orgânicos de coco e mamão.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir carvão a partir de resíduos orgânicos de coco (endocarpo) e semente de mamão para testes de eficiência de adsorção da água salina;
- Testar a eficiência do processo de filtração de água salina em filtro de carvão de resíduo de coco e mamão;
- Analisar a qualidade da água filtrada a fim de verificar seu enquadramento nos padrões estabelecidos pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA nº 357 2005, sendo águas doces com salinidade igual ou inferior a 0,5 %.
- Compilar dados obtidos e analisar os resultados de eficiência do substrato estudado para sua utilização como adsorvente na confecção do biofiltro;
- Realizar testes de funcionamento e efetividade do biofiltro confeccionado.

2.3 Métodologia aplicada

O método descrito a seguir pode ser utilizado para sementes, massas ou fibras, como por exemplo, endocarpo e mesocarpo do coco e semente de mamão (LIMA, 2015).

2.3.1 Preparação do endocarpo e mesocarpo do coco para o biofiltro

O resíduo orgânico do coco foi lavado com água deionizada cinco vezes para remover o sal original. Após o processo, foi seco durante 24 horas a temperatura ambiente, moídos e triturados em moedor e triturador industrial, peneiradas em uma peneira de malha de 0,8mm; em seguida colocados na estufa por 24 horas à 150° C para ocorrer à carbonização (FIGURA 1) (MENEZES, 2009).



FIGURA 1: RESÍDUO ORGÂNICO DO COCO TRITURADO E AQUECIDO A TEMPERATURAS ELEVADAS DISTINTAS.

FONTE: AUTORES, 2017

2.3.2 Extração dos lipídios

Para a extração de óleos dos resíduos do coco foram utilizados um Soxhlet

(FIGURA 2) e solvente Éter Etílico ($C_2H_5)_2O$. O processo consistiu em repetidas lavagens no qual os óleos foram extraídos com o solvente sob-refluxo. Primeiramente a amostra triturada foi seca e envolvida por cartucho poroso, devidamente pesado em balança analítica antes e após o processo, essa diferença representa o total de lipídios que foram extraídos (LIMA, C. et al 2017).

Para avaliar a eficiência da extração de lipídios, duas amostras foram utilizadas sendo a amostra I, resíduo após queima e amostra II, resíduo antes da queima. Ambas foram introduzidas na câmara de extração suspensa acima de um balão com solvente e abaixo de um condensador. Com o aquecimento do balão o solvente se moveu na fase gasosa em direção ao condensador, o qual é convertido em um líquido que goteja no cartucho que contém a amostra. As amostras permaneceram por 3 horas em refluxo, tempo necessário para extraer todos os componentes lipídicos (BRAZACA, S. 2016).

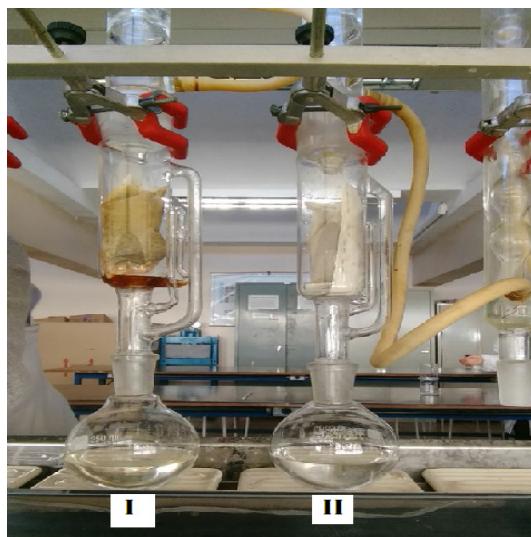


FIGURA 2. EXTRATOR DE SOXHLET AMOSTRA I E II

FONTE: AUTORES, 2017

2.3.3 Preparação da água concentrada

Para verificar a diminuição de concentração de sais na água após a filtração utilizou-se um densímetro (Massa específica 20°C g/ml). A água salobra concentrada foi utilizada na filtração, pois o equipamento não se mostrou suficientemente preciso para medir a densidade da água salobra (3,5g/l). Para a água salobra concentrada utilizou-se 3 g de NaCl em 250ml de água deionizada (20°C), após foi agitada até sua homogeneização completa. A densidade da água deionizada (20°C) foi de 1,005 g/ml. A densidade final para a solução preparada de 3g/ 250 ml foi de 1,015 g/ml.

2.3.4 Teste de salinidade do coco

Para o teste de dessalinização utilizou se de um béquer de 500 ml e um funil de vidro com papel filtro. A este foi adicionado 1g do resíduo orgânico do coco e logo após despejou-se a solução salobra concentrada. Para verificar a possível interferência do papel filtro no processo de dessalinização repetiu-se esta etapa sem uso do carvão obtendo-se assim o branco.

2.3.5 Preparação do mamão para o biofiltro

O resíduo orgânico do mamão foi lavado com água deionizada cinco vezes para remover o sal original. Após o processo foi seco por 24 horas a temperatura ambiente, macerado e triturado em macerador e triturador, peneiradas em uma peneira de malha de 0,8mm; em seguida colocadas na estufa por 24 horas à 150° C para ocorrer à carbonização (FIGURA 3) (MENEZES, 2009).

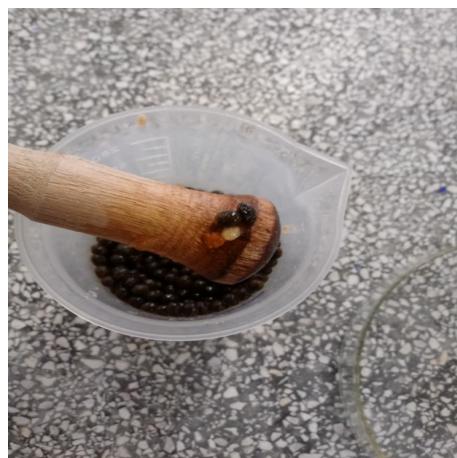


FIGURA 3: RESIDUO ORGÂNICO DO MAMÃO LAVADO

FONTE: AUTORES. 2018

2.3.6 Teste de salinidade do mamão

Para o teste de dessalinização utilizou se de um béquer de 500 ml e um funil de vidro com papel filtro. A este foi adicionado 1g do resíduo orgânico do mamão e logo após despejou-se a solução salobra concentrada (FIGURA 4). Para verificar a possível interferência do papel filtro no processo de dessalinização repetiu-se esta etapa sem o uso do carvão, obtendo-se assim um “branco”.



FIGURA 4: MISTURA DA SEMENTE NA ÁGUA SALOBRA PARA REALIZAR A FILTRAGEM
FONTE: AUTORES, 2018

2.3.7 Preparação e análise das amostras

Para realizar a análise das amostras (FIGURA 5) e enviá-las para o Instituto Ambiental do Paraná utilizou-se o seguinte método de classificação e organização separadas em etapas (FIGURA 6).

1º etapa:

As sementes do mamão foram submetidas a quatro lavagens com água deionizada, com o intuito de ser analisada uma possível redução do sal original na sequência de lavagens. A quinta amostra foi à água deionizada pura utilizada para os procedimentos. Obteve-se a sexta amostra após a passagem da água salobra pelo filtro sem o carvão, sendo o branco.

2º etapa:

As amostras após a dessalinização tem o objetivo de verificar a durabilidade do carvão após ser submetido a três passagens da água salobra. Sendo a sétima amostra filtrada em 250 ml de água salobra em 1 g de carvão; a oitava amostra filtrada em 250 ml de água salobra de 1 g de carvão da sétima amostra e por fim a nona amostra filtrada em 250 ml de água salobra na mesma 1 g de carvão da sétima amostra.

3º etapa:

Verificação com o objetivo de analisar a potência de adsorção do carvão com o dobro do utilizado, ou seja, com 2 g de carvão e filtrações com 250 ml, décima amostra.

4º etapa:

Com o objetivo de analisar o percentual de adsorção da amostra salina pelo carvão em diferentes filtragens, mantendo a concentração de sal em todas as fases de filtragem. A décima primeira amostra filtrada em 750 ml de água salobra em 1 g de carvão. A décima segunda amostra filtrada em novamente 500 ml de água salobra da amostra décima primeira em 1 g de carvão e por fim, a décima terceira amostra filtrada em novamente 250 ml de água salobra da amostra décima segunda em 1 g de carvão.



FIGURA 5: CARVÃO PARA AS AMOSTRA

FONTE: AUTORES, 2018



FIGURA 6: AMOSTRAS PARA O IAP

FONTE: AUTORES, 2018

3 | PROTÓTIPO DO BIOFILTRO

Na confecção do protótipo (FIGURA 7) para análise foram utilizados dois cap de 150 mm, dois pedaços de 30 centímetros do cano 150 mm, uma torneira de plástico para filtro e uma broca 12 mm aço rápido. Cortaram-se dois pedaços de cano sendo um deles liso nas duas pontas e o outro com um lado e outro com luva, encaixaram-se os caps no lado liso de cada pedaço e após os dois canos um utilizando o lado com luva para cima e o outro o lado liso para baixo, por o protótipo ser cilíndrico. Em um espaço de 10 cm de baixo para cima no protótipo perfurou-se com uma broca de 12 mm para a instalação da torneira.



FIGURA 7: PROTÓTIPO DO BIOFILTRO

FONTE: AUTORES, 2018

4 | ANALISE DOS RESULTADOS

4.1 Resultados do coco

A tabela abaixo (TABELA 1) demonstra a quantidade de sal retirada após as amostras de resíduo de coco serem submetidas a cinco lavagens com água deionizada antes de iniciar a queima para produção de carvão.

Lavagem Sal original do resíduo	Endocarpo Brix°	Mesocarpo Brix°
1 ^a Amostra	0,85	0
2 ^a Amostra	0,34	0
3 ^a Amostra	0,17	0
4 ^a Amostra	0	0
5 ^a Amostra	0	0

TABELA 1. QUANTIDADES DE SAIS PRESENTES ORIGINALMENTE NO RESÍDUO ORGÂNICO DO COCO

FONTE: AUTORES, 2017

Observou-se que em cada lavagem a quantidade de sais diminuía aproximadamente 50%. Esta etapa é necessária para garantir menor interferência dos sais presentes no resíduo orgânico no processo de dessalinização. Após a lavagem para a retirada do sal, as amostras foram trituradas e o carvão foi obtido após a matéria orgânica ser submetida a queima na estufa por 25 horas a 150°C e 4 horas a 200°C. Após 25 horas a 150°C o resíduo orgânico resultou em carvão fragmentado. Os resultados para extração do óleo pertencente à massa vegetal do coco com solvente orgânico estão apresentados na TABELA 2. A quantidade de lipídios extraídos foi aproximadamente 4% maior na amostra de carvão em relação à quantidade presente antes da queima (TABELA 3). Após a extração as amostras ficaram em estufa para volatilização total do solvente. O éter caracteriza-se por ser volátil em temperatura ambiente sendo assim não houve alterações nas amostras finais.

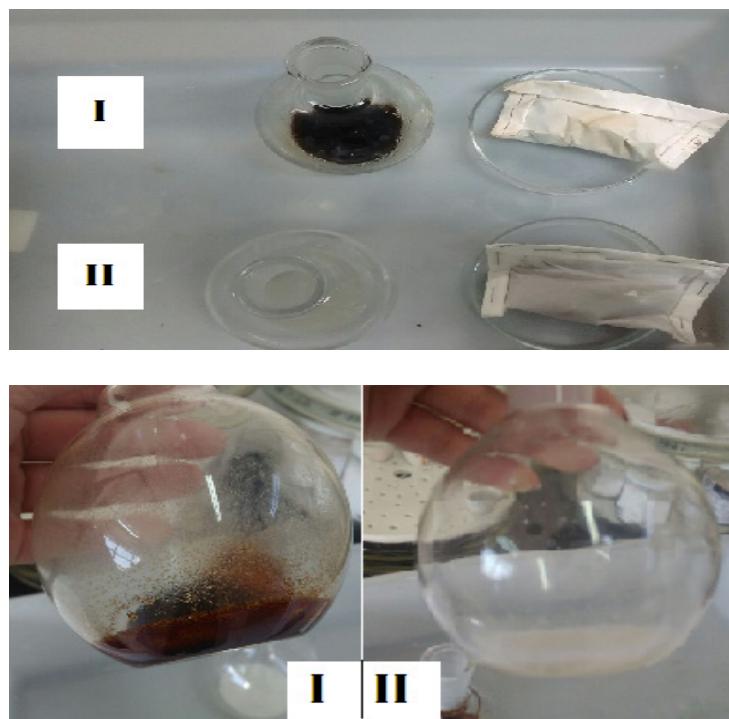


FIGURA 8: AMOSTRA (I) E (II) APÓS A PASSAGEM PELO SOLVENTE ÉTER ETILICO

FONTE: AUTORES, 2017

Amostras (g)	Peso inicial	Peso final	Percentual de óleos extraídos
I	19,5574	10,3822	9,1752g > 46,91%
II	23,7804	16,0177	7,7627g > 32,64%

TABELA 2. QUANTIDADE DE ÓLEOS EXTRAÍDOS DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO POR SOXHLET

FONTE: AUTORES, 2017

Balão de 250 ml	
I	II

8,2423g	9,8099g
---------	---------

TABELA 3. GORDURA TOTAL REMOVIDA DO RESÍDUO ORGÂNICO

FONTE: AUTORES, 2018

Soluções e densidades		
Água deionizada	Água salina Concentrada	Água submetida à filtragem no biofiltro
1,005	1,015	1,010

TABELA 4. TESTE DE DESSALINIZAÇÃO

FONTE: AUTORES, 2017

No teste de filtragem da água salina concentrada, que apresentou densidade de 1,020 a 20° C, após a adsorção e filtragem pelo biofiltro obteve-se uma variação de 0,005 equivalendo a 50% da remoção do NaCl da solução salina (TABELA 4). Repetiu-se a metodologia, porém sem o resíduo orgânico do coco para verificar a possível interferência do papel filtro no processo de dessalinização, obtendo-se assim um teste branco sem alterações.

4.2 Resultados dos mamões papaia e formosa

Os mamões papaia e formosa passaram pelo mesmo procedimento de filtragem ao qual o carvão do coco foi submetido, no entanto o mamão papaia não apresentou resultados positivos. Porém, o mamão formosa apresentou uma adsorção na filtragem pelo biofiltro de 0,005 equivalendo a 50% da remoção do NaCl da solução salina, pela análise da redução percentual de sal na última amostra.

Portanto apresentando um nível igual de eficiência da adsorção do NaCl pelo carvão do coco, entretanto o carvão do mamão se faz mais eficiente, econômico e eficaz para a produção devido à baixa concentração de lipídios eliminando assim uma etapa a mais que ocorre na produção do carvão do coco.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo em caráter preliminar possibilitou o entendimento sobre as características físicas e químicas de um biofiltro alternativo que utiliza material orgânico na forma de carvão. Foi possível verificar que, em relação às propriedades físicas e químicas de compostos orgânicos, se faz necessário avaliar o comportamento previamente aos experimentos para que se possa alcançar melhor eficiência adsorptiva de sais. No caso do coco o elevado teor de óleos pode comprometer seu desempenho no biofiltro, no entanto após a extração dos óleos verificou-se resultados positivos, pois um percentual de aproximadamente 50% de sais foram retidos da solução teste. Em relação ao mamão, análises posteriores realizadas no laboratório do IAP foram inconclusivas devido a erros de leitura no equipamento utilizado e que impossibilitaram

o estabelecimento de padrões comparáveis. Destacando-se o percentual de 50% de dessalinização em ambos os materiais orgânicos utilizados nas análises por densidade.

Tem se por objetivos futuros aprimorar os experimentos com materiais orgânicos que possam ser utilizados na forma de carvão em biofiltro, a fim de se obter água com qualidade próxima aos padrões CONAMA. Obteve-se, assim, o processo mais eficiente com o biofiltro de resíduo a base das sementes do mamão formosa, pois sua metodologia de preparo do carvão apresentou menos etapas sendo, portanto, mais prática e econômica em comparação ao preparo do biofiltro à base de coco.

Empenho e dedicação à iniciação científica são razões que motivam continuar a desenvolver essa pesquisa, que sem sombra de dúvida será de suma importância para resolver a qualidade de água de forma à sustentabilidade ambiental.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Recursos Hídricos no Brasil**, Brasília: ANA, 2010. Disponível em:<<http://www3.ana.gov.br>>. Acesso em: 02 de Maio de 2016.

BRAZACA, S.; **Determinação de lipídios**. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP, São Paulo. 2016. Disponível em: <edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1061690/mod_resource/content/1/Aula_6_Determinacao_Lipideos_Solange.pdf> Acesso em: 12 Setembro 2017.

DANTAS, M.; MORAIS, D.; OLIVEIRA, S.; ROCHA, B. **Geografia do Nordeste**. 2 ed. Natal, RN. EDUFRN, 2010. Disponível em: <http://sedis.ufrn.br/bibliotecadigital/site/pdf/geografia/Geo_Nord_LIVRO_WEB.pdf>. Acesso em: 20 de Julho de 2017.

KOVDÁ, D.A. **Irrigation, drainage and salinity: An international sourcebook**. Paris: FAO/ UNESCO, 1973. p.177- 205. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0000/000057/005702eo.pdf>>. Acesso em: 17 de Agosto de 2017.

LIMA, C.; LUDWIG, R.; MORO, J.; MULLER; OLIVEIRA. SILVA, E.; PRISCILLA da S.; TOLENTINO, S.; VALANDRO, J. **Extração de Lipídios**: Método Soxhlet, 2017. Disponível em:<www.unicruz.edu.br>. Acesso em: 04 de agosto de 2017.

LIMA, S. NEVES, H. **Dessalinização de Água Salobra Através de Bioadsorventes**. Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico - Faculdade ASCES, Caruaru PE. Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade - Vol. 3: Congestas 2015. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/127799/000970356.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

MENEZES, J. **Desenvolvimento de Dispositivo Caseiro para Dessalinização**; ao da água Salobra para Dessedentação Humana. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2009. Disponível em:<www.repositorio.ufba.br>. Acesso em: 02 de Maio de 2017.

OLIVEIRA, G., MACHADO, L., QUADRO, M., BATISTA, N. e CALBETE, S. **Climatologia de precipitação e Temperatura de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos** - CPTEC/INPE, 2017. Disponível em: <climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliesp10a/chuesp.html>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

SILVA, L. **Dessalinização: um dos métodos de se obter água potável**. 2015. Disponível em: <www.cepae.ufg.br/up/80/o/TCEM2015-Qu%C3%ADmica-StefannyAlvesLimaSilva.pdf>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

BIOLOGIA E APLICAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DO MODELO EXPERIMENTAL SARCOMA 180

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Departamento de Biofísica e Fisiologia,
Laboratório de Cancerologia Experimental,
Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI
E-mail para correspondência: pmpf@ufpi.edu.br

Renata Rosado Drumond

Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí,
Teresina - PI

Carla Lorena Silva Ramos

Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí,
Teresina – PI

Rayran Walter Ramos de Sousa

Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí,
Teresina – PI

Débora Caroline do Nascimento Rodrigues

Departamento de Biofísica e Fisiologia,
Laboratório de Cancerologia Experimental,
Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI

Ana Paula Peron

Departamento de Conservação da Natureza e da
Biodiversidade, Universidade Federal Tecnológica
do Paraná, Campos Mourão – PR

RESUMO: Os sarcomas são agressivos localmente e capazes de apresentar crescimento invasivo e destrutivo, recidiva e metástases. O presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o modelo experimental

Sarcoma 180, destacando sua biologia e suas principais aplicações biomédicas. Para tanto, realizou-se uma busca e análise de fontes primárias na literatura científica nas bases de dados *SciELO*, *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus* e Periódicos CAPES, de 1966 até 2018, usando o descritor “sarcoma 180”. As bases com maiores números de resultados foram *Scopus* (5444) e *PubMed* (2.040). O tumor Sarcoma 180 ou tumor de Crocker, descoberto em 1914, é indiferenciado e pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal. Ele cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais, apresentando-se como massa sólida formada por células polimórficas, hiperplásicas, poliedrinas, arranjadas em ninhos ou cordões, com citoplasma basófilo e núcleo central e invade o músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Suas células possuem número variável, instável e poliplóide de cromossomos (20 a 480 cromossomos) e, pelo menos, três cromossomos resultantes de translocações. Além de sua intensa aplicação na busca de novas entidades químicas com atividade anticâncer, o tumor S180 tem possibilidade de uso em estudos de hipercalcemia, reabsorção óssea, metabolismo de lipídeos e de respostas imunológicas às neoplasias. Assim, esse modelo S180 é utilizado, principalmente, na investigação do mecanismo de ação de

substâncias com potencial antitumoral, mas poucos estudos esclarecem sobre sua biologia e informações mais específicas desse modelo experimental.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor murino. Ação anticâncer *in vivo*. Características teciduais. Aplicações biomédicas.

ABSTRACT: Sarcomas are locally aggressive and may present invasive and destructive growth, recurrence and metastasis. This paper presents a bibliographic review about the experimental model Sarcoma 180 (S180), highlighting its biology and its main biomedical purposes. To this end, we carried out a search and analysis of primary sources in scientific literature in SciELO, PubMed, Science Direct, Scopus e *Periódicos CAPES* databases, from 1966 to 2018, using the keyword “sarcoma 180”. Databases with superior results were Scopus (5,444) and PubMed (2,040). S180 Crocker tumor was discovered in 1914, is undifferentiated and can be transplanted by subcutaneous, intraperitoneal or intramuscular inoculation. It grows rapidly at 90 % to 100 % of the animals as a solid mass constituted by polymorphic, hyperplastic and polyhedral cells, arranged in nests or cords, with basophilic cytoplasm and invades the skeletal muscle, adipose tissue, nerves and blood vessels. Its cells have variable number, unstable and polyploid of chromosomes (20 to 480 chromosomes) and, at least, three chromosomes resulting from translocations. In addition to its intense utilities in the search for new chemical entities with anticancer activity, S180 tumor can be used in studies about hypercalcemia, bone resorption, lipid metabolism and immune responses to tumors. So, S180 is mainly used to investigate the mechanism of action of substances with potential antitumor, but a few studies have illuminated the biology and more specific details about this experimental model.

KEYWORDS: Murine tumor. *In vivo* anticancer action. Tissue features. Biomedical purposes.

1 | INTRODUÇÃO

As doenças não transmissíveis (DNT) representaram 71% do número total de mortes no mundo e o câncer ocupa a posição de segunda doença mais prevalente deste grupo (WHO, 2018; BRAY et al., 2018). Esta doença é caracterizada como um conjunto de mais de 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais de vários tipos, presentes em um mesmo microambiente, geralmente, se espalham pelos tecidos e órgãos adjacentes e para regiões distantes do organismo por metástase. Essas características geralmente são favorecidas por um acúmulo de mutações herdadas ou induzidas por radicais livres, luz ultravioleta, microrganismos, alimentação e xenobióticos em oncogenes, genes supressores de tumor e em genes reparadores de DNA. Essas mutações, quando fixadas no código genético, associam-se à reprogramação metabólica da célula e/ou às alterações dependentes de hormônio(s), influenciando coletivamente as interações entre o tumor e o microambiente por meio

da superexpressão e/ou ativação excessiva de receptores, de fatores de crescimento, de vias citoplasmáticas de transdução de sinais ou por meio de processos inflamatórios (sub)crônicos, o que cria um ambiente propício para a iniciação, promoção e para o estabelecimento definitivo do tumor por progressão do grau de agressividade e metástase (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; INCA, 2014; FERREIRA; PESSOA, 2017).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele e mucosas, ele é denominado carcinoma, o qual corresponde a maioria dos cânceres humanos. Eles surgem a partir de células epiteliais que, sob condições normais, são separadas por lâmina basal do tecido conjuntivo adjacente (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010; INCA, 2014). Se o câncer se origina em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem é classificado como sarcoma (INCA, 2014).

A dificuldade em torno dos tumores sarcomatosos tem sido agravada por muitos autores que combinam sarcomas de tecidos moles com sarcomas ósseos, já que eles são duas entidades diferentes, mas continua, até hoje, levando a falhas e atrasos no diagnóstico, o que, por sua vez, implica na escolha de tratamentos inadequados (HUSSEIN; SMITH, 2005).

Os sarcomas são neoplasias que surgem de células mesenquimais e são responsáveis por cerca de 1 % a 2 % de todas as malignidades em adultos e por cerca de 15 % dos casos em crianças, afetando cerca de 200.000 pessoas por ano em todo o mundo (TAYLOR et al., 2012; KELLEHER; VITERBO, 2013). A maioria dos sarcomas primários de partes moles origina-se nas extremidades (59 %), seguidas pelo tronco (19 %), retroperitônio (13 %) e cabeça e pescoço (9 %), como, a partir do músculo, gordura e nervos periféricos e de tecidos conjuntivos de sustentação como osso e cartilagem (CORNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2012).

Apesar de menos comuns, os sarcomas representam um desafio terapêutico quando atingem grandes proporções, pois são agressivos localmente e capazes de apresentar crescimento invasivo e destrutivo, recidiva local e metástases (FLEURY; SANCHES, 2006; TONETO; LUCCHESE; REICHEL, 2013), variando, portanto, desde indolentes até altamente invasivos e metastáticos. Do ponto de vista molecular, eles têm sido tradicionalmente classificados em duas grandes categorias, cada uma das quais inclui diversos tipos de sarcomas clinicamente identificados (TAYLOR et al., 2012). O primeiro subtipo são os sarcomas com cariótipo quase diploides e alterações genéticas simples, incluindo translocações ou mutações somáticas ativadoras específicas, caracterizados por uma única aberração genética recorrente e tendem a ocorrer em pacientes mais jovens. O segundo subtipo inclui os sarcomas com várias aberrações cromossômicas, cariótipos complexos e desequilibrados. Estes tumores são tipificados pela instabilidade cromossômica, fato que favorece aberrações genômicas em uma única célula tumoral, levando à heterogeneidade da população celular dentro da massa tumoral de um mesmo paciente. Essa instabilidade possivelmente surge por

causa da perda de telômeros, que encurtam com sucessivas divisões celulares, ou, no caso específico de carcinomas de cólon, de hepatocarcinomas e de glioblastomas, tem sido associada à perda ou inativação do gene *AP* (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; KELLEHER; VITERBO, 2013; DOW et al., 2015; MÉNIER et al., 2015).

A maioria dos sarcomas com alterações genéticas simples são os sarcomas associados à translocação (aproximadamente um terço de todos os sarcomas). Estes tumores tendem a ocorrer de novo e, em alguns casos, apenas o único ponto de anomalia citogenética que está presente no início é mantido ao longo da sua evolução clonal. Em contraste com os sarcomas associados à translocação, alguns sarcomas com cariotipos complexos podem surgir de uma forma menos agressiva e passar por inúmeras fases de progressão, acompanhados por aumento da complexidade do genoma (TAYLOR et al., 2012).

Para entender a complexa biologia do câncer, diversas linhagens de camundongos e de células são utilizadas como modelos experimentais (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Além das linhagens de células, vários outros tipos de modelos têm sido utilizados e são susceptíveis de forma semelhante aqueles *in vivo*. Estes incluem estudos *ex vivo* de culturas de fatias de tecido que preservam o microambiente do tumor original (MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; TAYLOR et al., 2012).

Uma característica muito útil de algumas linhagens tumorais é que, além de serem cultivadas *in vitro*, há a possibilidade de estudar seu comportamento *in vivo* por meio da inoculação destas células em modelos animais, sendo instrumentos importantes para validar o papel etiológico de candidatos a oncogenes e genes supressores tumorais na iniciação e progressão de tumores e úteis na descoberta de como estas lesões genéticas contribuem para a biologia dos tumores (CRUZ et al., 2009). Quanto ao teste de novos protótipos e candidatos farmacologicamente ativos, é essencial a utilização de modelos *in vivo* de sarcomas, como, por exemplo, o Sarcoma 180 (S-180) (TAYLOR et al., 2012), pois, nem sempre, os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, sendo necessário estudar os efeitos de compostos em sistemas biológicos completos e mais complexos (RIOS, 2013).

O presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o modelo experimental Sarcoma 180, destacando sua biologia e as suas principais aplicações biomédicas, com o intuito de proporcionar uma fonte de informação para os pesquisadores interessados em utilizá-lo como modelo laboratorial.

2 | METODOLOGIA

Para uma revisão confiável, apenas recursos primários foram utilizados. Foi realizada uma busca e análise de documentos (artigos, comunicações curtas, teses e dissertações) encontrados na literatura científica e publicados em português, inglês ou espanhol nas bases de dados *SciELO*, *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus* e Periódicos

CAPES, de 1966 até 2018, e indexados pelo descritor “Sarcoma 180”. Foram excluídos, por não se enquadrarem nos critérios do estudo proposto, os documentos que não continham os descritores no título ou no resumo e as publicações repetidas. Também não foram utilizados textos incompletos e artigos que não estavam disponíveis na íntegra e publicações que abordavam focos não relevantes, fugindo da temática abordada.

3 | RESULTADOS

Neste trabalho, o levantamento de dados quanto ao descritor utilizado (sarcoma 180) revelou um total de 8.185 documentos (**Tabela 1**).

Descriptor	Bases de Dados					Total
	CAPES	Science Direct	PubMed	SciELO	Scopus	
Sarcoma 180	1.248	524	2.040	29	5.444	9.589

Tabela 1. Número de artigos disponíveis nas bases de dados.

As bases com maiores números de resultados foram *Scopus* (5.444) e *PubMed* (2.040), além do Periódicos CAPES (1.248), *Science Direct* (524) e *SciELO* (29). Após eliminadas as referências duplas e aplicados os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 46 artigos para esta revisão.

3.1 Biologia do Tumor Sarcoma 180

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso na última década após a constatação de que os animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (KAMB, 2005; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009). Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos, uma vez que a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos foi fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Esses organismos são modelos acessíveis, prolíferos, com período de gestação curto, de fácil domesticação e manutenção e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos. Logo, o camundongo de laboratório se tornou o modelo experimental de mamífero mais usado e mais acessível, compartilhando genes, sistemas orgânicos e sistemas fisiológicos com os seres humanos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; RANGARAJAN et al., 2003; KAMB, 2005; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; GUIMARÃES et al., 2015).

O S180 foi um dos primeiros tumores experimentais de camundongos a ser transplantado em animais. Inicialmente, este tumor, descoberto em 1914, foi

identificado como uma massa sólida espontânea de linhagem epitelial na axila direita de um camundongo albino e denominado de Tumor de Crocker, por ter sido descoberto pelo Dr. William H. Woglom no Crocker Laboratory (Columbia University, New York). Inicialmente, o S180 foi classificado como carcinoma mamário (origem epitelial). Em estudos morfológicos, com microscopia ótica e eletrônica, mostrou contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, sugerindo que se tratava de um carcinoma, e não possuía qualquer partícula viral (SUGIURA, 1965; ZUCKERBERG, 1973; OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009). Após várias passagens subcutâneas, verificou-se que as células de S180 não expressam laminina e, desta forma, não podem ter origem epitelial, e que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180. Após assumir a forma sarcomatosa, por volta de 1919, manteve-se como um tumor indiferenciado, sem alterações até os dias de hoje (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MACHADO; MELO JÚNIOR, 2009; OLIVEIRA, 2012; RIOS, 2013).

Embora o tumor tenha sido repassado para diversos laboratórios ao redor do mundo, a linhagem de células S180 pode ser obtida pela ATCC (*American Type Culture Collection*), onde recebe o código TIB-66. Este banco de células possui diversos tipos celulares de diferentes animais, fornecendo também as informações citogenéticas de muitos deles (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). No entanto, não são disponibilizadas as informações cariotípicas referentes ao S180.

As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais e pode ser implantado de duas maneiras: a) células inoculadas na cavidade intraperitoneal, que se desenvolvem formando um tumor ascítico (em suspensão, **Figura 1**); b) células neoplásicas inoculadas via subcutânea ou no músculo (**Figuras 2 e 3**), formando tumores sólidos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2015).



Figura 1. Aspecto externo de camundongos portadores de Sarcoma 180 na região intraperitoneal no oitavo dia após a inoculação de células neoplásicas. Arquivo pessoal.



Figura 2. Aspecto externo de camundongos portadores de Sarcoma 180 na região axilar no

oitavo dia após a inoculação de 4×10^6 células/mL. Camundongos sacrificados com tiopental (100 mg/kg). Arquivo pessoal.

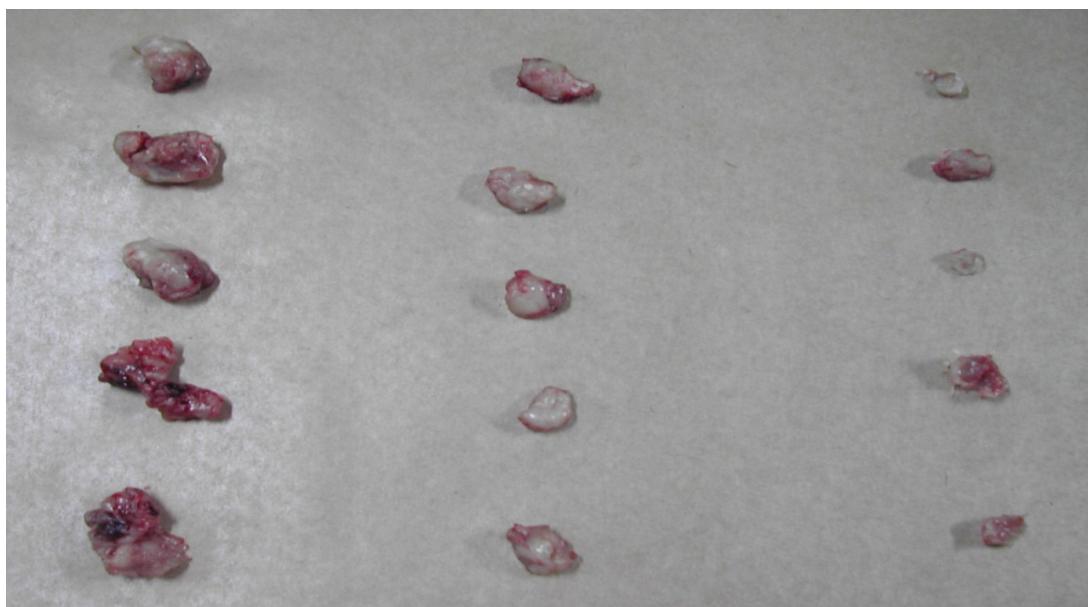


Figura 3. Aspecto macroscópico de tumores Sarcoma 180 dissecados após inoculação na axila de camundongos albinos Swiss e tratamento de 7 dias consecutivos. **A** representa tumores do grupo controle negativo (Dimetilsulfóxido 5%); **B** representa tumores do grupo controle positivo (5-Fluorouracil, 25 mg/Kg/dia); **C** são tumores removidos de animais tratados com uma substância antitumoral de origem natural (Ferreira et al., 2016).

Histologicamente, apresenta-se como massa sólida, formada por células redondas ou poliédricas arranjadas em ninhos ou cordões, citoplasma basófilo e núcleo central. O pleomorfismo celular e nuclear em diferentes graus é uma marca comum e há outras características de malignidade, como anisocariose, binucleação, mitoses frequentes, grandes áreas de invasão muscular e pontos de coagulação e necrose (**Figura 4**). Há estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor, embora, frequentemente, ocorra necrose central. Após sucessivos implantes subcutâneos, o padrão histológico torna-se misto apresentando aspecto de carcinoma e de sarcoma. Além de invadir o músculo esquelético, o tumor invade tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (ZUCKERBERG, 1973; OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; MAGALHÃES et al., 2010; MILITÃO et al., 2012; FERREIRA et al., 2016).

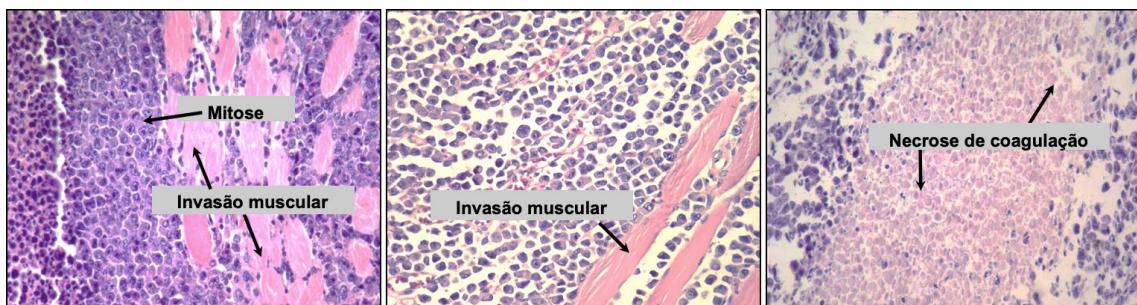


Figura 4. Aspectos microscópicos de tumores Sarcoma 180 histologicamente processados com xilol e parafina e corados por hematoxilina e eosina. Aumento de 400x (Ferreira et al., 2016).

Apesar da maioria dos tumores sólidos de S180 desenvolver necrose a partir da 3^a semana de implante (PEREIRA; CHAVES, 1983), apenas uma semana de crescimento tumoral é o bastante para o surgimento de necroses até mesmo nos grupos experimentais tratados apenas com salina fisiológica. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a forma sólida do S180 caracteriza-se por um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias de transplante (SCHABEL et al., 1977), sendo, portanto, a capacidade de oxigenação dos vasos sanguíneos locais e daqueles em formação (angiogênese) ultrapassada pelo aumento da massa neoplásica (PADERA et al., 2004). A necrose de coagulação que ocorre principalmente nas áreas centrais do tumor é determinada pela desnaturação da maioria das proteínas celulares (inclusive as lisossômicas), devido à queda acentuada no pH celular durante o processo de lesão por hipóxia ou isquemia. Nestes casos, o citoplasma celular se torna bastante eosinofílico e, como a maioria das enzimas autolíticas foram desnaturadas, a arquitetura tecidual é mantida por alguns dias até digestão e remoção do tecido necrótico por leucócitos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

O número de cromossomos observados em células do S180 é variável em todos os estágios de desenvolvimento do tumor e em todas as formas de manutenção tumoral. Estudos demonstraram que o complemento cromossômico do S180 é altamente instável, variando de 20 a 480 cromossomos (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008). Chakrabarti; Roychowdhury (1980) descreveram o número modal de 75 cromossomos, enquanto que outros autores observaram o número modal de 73 cromossomos (GHOSH; CHAUDHURI, 1984). Agrupando-se todos os dados, foram encontradas metáfases com números cromossômicos variando entre 16 e 232 e número modal de 68 cromossomos, o que indica que a linhagem celular S180 é composta por uma população heterogênea de células (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008).

Também foram encontrados três cromossomos resultantes de translocações, os quais foram denominados marcadores A, B e C. O marcador A é um cromossomo com dois braços. Pelo padrão de banda-G, foi verificado que o braço maior deste marcador é derivado do cromossomo 6 e o braço menor, provavelmente, do cromossomo 9. A técnica de banda-C revelou dois blocos heterocromáticos, próximos um do outro, localizados na região central do cromossomo. No marcador B foram encontrados dois blocos heterocromáticos nas regiões terminais do cromossomo. Provavelmente, os cromossomos 9 ou 10 e 13 estão envolvidos nesta translocação. O marcador C também apresentou dois blocos heterocromáticos, um na região terminal e outro na região intersticial, próximo ao fim do cromossomo. O padrão de banda-G indica que os cromossomos 14 e 19 podem estar envolvidos nesta translocação (GHOSH; CHAUDHURI, 1984).

O núcleo de células de S180 apresenta polimorfismo de tamanho, acompanhado por diferenças no tamanho da célula. Uma consequência fisiológica da poliploidia é o aumento no tamanho da célula, pois o volume da célula aumenta linearmente com

cada complemento cromossômico extra. Este fato é explicado pela maior dosagem gênica encontrada nas células poliplóides, o que acarreta uma elevação na síntese de proteínas (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008).

Um dos aspectos mais característicos das células sarcomatosas é a basofilia pronunciada do citoplasma. Uma vez que essa basofilia citoplasmática pode ser abolida por tratamento com a ribonuclease, presume-se que a mesma seja devido à presença de ácido nucléico. A basofilia é geralmente difusa. O material basófilo parece ser mais fortemente concentrado na periferia e extremidades da célula, que são excepcionalmente alongadas, ou seja, as células perdem a sua basofilia abruptamente na área mais necrótica. Algumas células, especialmente as células pequenas, mostram todo o citoplasma intensamente basófilo, mas, em células consideradas mais típicas, a basofilia ou é muito menos intensa ou falta completamente em uma área esférica de tamanho variável perto do núcleo. Nesta área há concentração de lipóide. As células coradas para observação do citoplasma basofílico não mostram o lipóide como tal, mas a sua localização é característica, indicada por esta área esférica muito pálida (WORLEY; SPATER, 1952).

Assim como em outras neoplasias, a hipercalcemia, frequentemente aparece nos estados avançados de S180. Essa hipercalcemia é resultante do aumento de reabsorção óssea e parece ser derivada da ação de células tumorais produtoras do fator de crescimento transformante alfa (*Transformant Growth Factor-α*, TGF- α), IL-1 α (*Interleukin-α*), IL-6 (*Interleukin-6*) e por ação de fatores ainda desconhecidos, como proteína relacionada ao paratormônio (*Parathyroid Hormone-related Protein*, PTHrP), IL-1 β (*Interleukin-1β*) e fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α), sendo que estes fatores desconhecidos causam reabsorção óssea por uma via que é independente de PGE₂ (Prostaglandina E₂) (SUZUKI; YAMADA, 1994).

3.2 Aplicações do modelo experimental Sarcoma 180

Células tumorais murinas são usadas como ferramentas pré-clínicas em pesquisas de novas entidades químicas (*New Chemical Entities - NCE*) com propriedades antitumorais e seus mecanismos de ação (OLIVEIRA JÚNIOR, 2008; FERREIRA et al., 2015, 2016). Já em 1922, o tumor de S180 e o carcinoma de ratos chamado Flexner-Jobling foram utilizados para avaliar a influencia de sais inorgânicos sobre o crescimento tumoral (SUGIURA, 1965; ZUCKERBERG, 1973).

Pesquisadores estudam os efeitos de fármacos ou protótipos em células de S180 *in vitro* em relação à concentração da droga e a duração da exposição ao fármaco. Estas investigações podem mostrar se essa letalidade é dependente da duração da exposição e se existe uma relação concentração-resposta (RITCH et al., 1981; MAGALHÃES et al., 2010; MILITÃO et al., 2012; OLIVEIRA, 2012; RIOS, 2012; FERREIRA et al., 2015, 2016). A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou o aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores

diretamente relacionados à atividade antitumoral. O melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL et al., 1977).

Com base nessas indicações, mostramos previamente que uma fração rica em diterpenos clerodânicos, principalmente aqueles do grupo das casearinás, extraída das folhas de *Casearia sylvestris* (Salicaceae), quando administrada por 7-8 dias consecutivos, com início de tratamento após 24 h da inoculação do tumor, foi capaz de reduzir a taxa de crescimento do tumor S180 em 35,8, 86,2 e 53,7 % nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral por gavagem (FERREIRA et al., 2016), embora tal atividade não tenha aumentado significativamente o tempo de sobrevida dos animais após a interrupção do tratamento. Uma vez que os animais tratados com essa fração causaram potente redução nos tumores S180, foram realizadas análises bioquímicas *ex vivo* por citometria de fluxo na tentativa de compreender esta ação biológica. Assim, a cultura primária de células de S180 serviu como modelo laboratorial para mostrar que o mecanismo de ação das substâncias analisadas envolve morte celular por apoptose. Anteriormente, nosso grupo já havia demonstrado atividades citotóxicas promissoras dessa mesma fração e do seu composto majoritário Casearina X em cultura *ex vivo* de S180 usando o ensaio do Alamar Blue (FERREIRA et al., 2014).

Outros estudos de avaliação da atividade antitumoral em tumores de S-180 podem ser observados na **tabela 2**.

Substância	Inibição tumoral (%)	Referência
Compostos à base de platina (8 mg/kg/dia)	83,0 a 100	ROSENBERG; VAN CAMP (1970)
Piplartina e Piperina (<i>Piper</i> sp.)	28,7 e 52,3 para piplartina e 55,1 e 56,8 para piperina	BEZERRA et al. (2006)
SVLV (<i>Sargassum vulgare low viscosity</i>) e SVHV (<i>S. vulgare high viscosity</i>) (100 mg/m ² /dia)	74,8 e 88,8	SOUSA et al. (2007)
Piperlonguminina (<i>Piper tuberculatum</i>) (25 e 50mg/kg/dia)	38,7 e 40,7	BEZERRA et al. (2008)
Pisosterol (50 e 100 mg/m ²) de <i>Pisolithus tinctorius</i>	43,0 e 38,7	MONTENEGRO et al. (2008)
Extrato bruto de <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (50 mg/kg/dia)	52,8	MACHADO; MELO JÚNIOR (2009)
1,2-dihidroxibenzeno (200 mmol/kg/dia)	70,0	PESSOA et al. (2010)
Proteínas laticíferas de <i>Calotropis procera</i> (5 mg/kg/dia)	51,8	OLIVEIRA et al. (2010)
Extrato de acetona e de acetato de etila de <i>Calotropis procera</i> (250 mg/kg/dia)	53,1 e 64,3	MAGALHÃES et al. (2010)

Óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i> (50-200 mg/kg/dia)	43,4 e 54,2 para tratamento i.p. (50-100 mg/kg/dia) e 6,6 e 42,8 para o tratamento oral (100-200 mg/kg/dia)	BRITO et al. (2012)
(2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-22-oxocucurbita-5-en) (25 mg/kg/dia)	52,	MILITÃO et al. (2012)
Extrato acetônico das folhas de <i>Annona muricata</i> L. (50 mg/kg/dia)	90,0	OLIVEIRA (2012)
Óleo essencial de <i>Xylopia frutescens</i> (50 e 100 mg/kg/dia)	31 e 37,5	FERRAZ et al. (2013)
Extrato acetônico das sementes de <i>Annona muricata</i> L. (30 mg/kg/dia)	48,4	RIOS (2013)
Óleo essencial das folhas de <i>Mentha x villosa</i> (50-200 mg/kg/dia)	29,4 e 40,5 para tratamento i.p.(50-100 mg/kg/dia) e 25,0 e 45,2 para o tratamento oral (100-200 mg/kg/dia)	AMARAL et al. (2015)
Talidomida (50 mg/kg/dia)	53,5	FERREIRA et al. (2015)
Fração com Casearinás das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	35,8; 86,2 e 53,7 para doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral	FERREIRA et al. (2016)
Casearina X	90 e 65,5 para doses de Casearina X 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral	FERREIRA et al. (2016)
Extrato hidroalcoólico de <i>Cereus jamacaru</i> (5, 10 e 20 mg/kg/dia i.p.)	86 após tratamento i.p. (20.0 mg/kg/dia)	DUTRA et al. (2018)
<i>Arginine methyltransferase inhibitor-1</i> (0,5 mg/200mL/dia)	41,4	ZHANG et al. (2018)
4-(pyridin-4-yl)-6-(thiophen-2-yl) pyrimidin-2(1H)-one (SK-25) (20 mg/kg/i.p. and 30 mg/kg/i.p.)	32,9 e 45,7	KUMAR et al. (2018)
Óleo voláteo da <i>Annona leptopetala</i> (100 e 150 mg/kg/dia i.p.)	59,3 e 58,8	BRITO et al. (2018)

Tabela 2. Relação de alguns estudos da aplicação do tumor Sarcoma 180 como modelo experimental na avaliação da atividade antitumoral in vivo.

Nos testes *in vivo* também podem ser utilizados camundongos geneticamente modificados, especificamente preparados, de linhagem atílicas, ou seja, sem linfócitos T maduros, como a linhagem Balb-c nu/nu. Nesses animais são implantados tumores humanos no tecido subcutâneo (também chamado de modelo xenográfico) e são acompanhados quanto à regressão tumoral após a aplicação de substâncias quimioterápicas. O modelo xenográfico possui custo muito elevado, o que o torna restrito a grandes centros de pesquisa (MATSUZAKI et al., 2006). Esse modelo também têm outras limitações: a) algumas anomalias genéticas presentes em tumores

primários não estarão presentes em xenotransplantes, não permitindo o estudo do desenvolvimento tumorigênico e, inversamente, passagens em série, podem introduzir alterações adicionais que não refletem os tumores primários; b) o câncer é tratado como uma doença celular isolada e não como o resultado da interação tumor-hospedeiro (PANTALEÃO; LUCHS, 2010; TAYLOR et al., 2012). De fato, muitos tratamentos que inicialmente se mostraram promissores nestes modelos não se traduziram com sucesso na clínica (TAYLOR et al., 2012). Dessa maneira, as vantagens do modelo S180 prevalecem, favorecendo melhores resultados nos estudos da atividade antitumoral *in vivo*, uma vez que todas as respostas sistêmicas se fazem presentes, inclusive a imunidade, já que a modulação do sistema imunitário é um conceito emergente no controle do crescimento tumoral. Embora existam muitos mecanismos subjacentes, é muito importante a função que o sistema imunitário desempenha em células de tumor, minimizando a metástase através da atenuação da expressão de citocinas pró-angiogênicas e regulando a expressão de fatores endoteliais que são cruciais para o crescimento do processo angiogênico em metástase. Em vista disso, a descoberta de agentes imunomoduladores é uma tarefa que está atualmente recebendo muita atenção, inclusive sendo testada em modelo experimental de S180 (STREET; CRETNEY; SMYTH, 2001; HASTIE et al., 2008; PESSOA et al., 2010). No estudo de SATO et al. (2005), mostrou-se que a resposta imunológica a um tumor inclui a observação de infiltração linfóide, fibrose peritumoral, crescimento e o tamanho do tumor do S180.

Inclusive, o modelo de S180 tem sido usado para desenvolver protocolos pré-clínicos de dor oncológica na tentativa da descobrir novas ferramentas farmacológicas com ação analgésica de curta ou longa duração. As células tumorais são inoculadas na pata de camundongos na concentração de 10^6 células, aguardam-se alguns dias para o estabelecimento do tumor e no final do estudo os animais são avaliados clinicamente após o tratamento com o protótipo por meio de parâmetros comportamentais de deambulação (*rota rod* e campo aberto) e nociceptivos (Von Frey) (GUIMARÃES et al., 2014, 2015).

Uma mudança observada em animais portadores de S180 é a diminuição específica da atividade da lipoproteína lipase (LPL) do tecido adiposo. Uma diminuição na atividade da LPL do tecido adiposo é acompanhada por aumentos na atividade do coração e do próprio tumor. Depleção de lipídeos é, frequentemente, uma situação observada em animais portadores de tumor e em humanos com câncer, mas a razão para este esgotamento não é totalmente compreendida. Vários mecanismos possíveis podem estar envolvidos, incluindo as alterações nas taxas de deposição ou mobilização de lipídeos ou em ambas. A caquexia, que acomete 80 % a 90 % de pacientes oncológicos adultos e pode acabar sendo um fator contribuinte ou mesmo causador de óbito, acompanha esse esgotamento energético, e é uma síndrome que se caracteriza por perda de peso, lipólise, atrofia muscular, anorexia, náusea crônica e astenia, contribuindo de maneira significativa para uma pior qualidade de vida, maior

morbidade e mortalidade (SILVA, 2006). A descoberta de alterações nessa enzima abriu um novo campo de aplicação com possibilidade de estudar a ação enzimática da LPL em camundongos transplantados com o S180 (MASUNO, 1984).

4 | CONCLUSÕES

O Sarcoma 180 é um dos modelos tumorais mais utilizados na atualidade na busca de novas entidades químicas com ações terapêuticas, principalmente, antitumorais e, mais recentemente, com capacidade antinociceptiva contra dor crônica induzida por cânceres. Apesar do grande número de estudos que mencionam o Sarcoma 180, poucos são aqueles que esclarecem sobre a biologia tumoral e informações mais específicas desse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. G.; FONSECA, C. S.; SILVA, T. K. M.; ANDRADE, L. N.; FRANCA, M. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; SOUZA, D. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. O.; CARVALHO, ADRIANA A.; THOMAZZI, S. M. **Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.67, n.8, p.1100-1106, 2015.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. **In vivo growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, alkaloid amides from *Piper*.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, n.6, p.801-807, 2006.
- BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. **In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine.** Journal of Applied Toxicology, v.28, n.2, p.156-163, 2008.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. **In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from *Piper* species.** Journal of Applied Toxicology, v.28, n.5, p.599-607, 2008.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: a cancer journal for clinicians, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRITTO, A. C.; OLIVEIRA, A. C.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. **In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*.** Planta Medica, v.78, n.5, p.409-414, 2012.
- BRITO, M. T.; FERREIRA, R. C.; BELTRÃO, D. M.; MOURA, A. P. G.; XAVIER, A. L.; PITA, J. C. L. R.; BATISTA, T. M.; LONGATO, G. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. S.; MEDEIROS, K. C. P.; SANTOS, S. G.; COSTA, V. C. O.; TAVARESA, J. F.; DINIZ, M. F.; SOBRAL, M. V. **Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*.** Revista Brasileira de

CHAKRABARTI, A.; ROYCHOWDHURY, J. Chromosome analysis with special reference to centromeric heterochromatin and ploidy variation in mouse Sarcoma-180 cells. Cytology, v.45, n.1-2, p.177-184, 1980.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. **Animais de laboratório: o camundongo**. Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.28, n.1, p.11-23, 2007.

CORMIER, J. N.; PEARSON, A. S.; METERISSIAN, S. H.; TANABE, K. K. Bone and soft tissue sarcoma. In: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. **The MD Anderson surgical oncology handbook**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 322 p.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. **Modelos Experimentais em Oncologia: o contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro**. Revista Portuguesa de Pneumologia, v.15, n.4, p.669-682, 2009.

DOW, L. E.; O'ROURKE, K. P.; SIMON, J.; TSCHAHARGANEH, D. F.; VANES, J. H.; CLEVERS, H.; LOWE, S. W. **Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer**. Cell, v.161, n.7, p.1539-1552, 2015.

DUTRA, J. C. V; MOISÉS, J. M.; PEREIRA; P. R. C.; BEN-HUR OLIVEIRA, J.; GERVÁSIO, S. V.; XAVIER, M. B.; MOTA, M. M.; LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; FRANÇA, H. S.; JAMAL, C. M.; BATITUCCI, M. C. P. **Cereus jamacaru D.C. hydroalcoholic extract promotes anti-cytotoxic and antitumor activity**. Pharmaceuticals, v.11, n.4, p.130, 2018.

FERRAZ, R. P.; CARDOSO, G. M.; DA SILVA, T. B.; FONTES, J. E.; PRATA, A. P.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. **Antitumour properties of the leaf essential oil of Xylopia frutescens Aubl. (Annonaceae)**. Food Chemistry, v.141, n.1, p.196-200, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. **Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.87, n.1, p.313-330, 2015.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. **Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from Casearia sylvestris and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations**. Journal of Ethnopharmacology, v. 186, p. 270-279, 2016.

FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. **Molecular biology of human epidermal receptors, signaling pathways and targeted therapy against cancers: new evidences and old challenges**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.53, n.2, p.1-17, 2017.

FLEURY, L. F. F. J.; SANCHES, J. A. J. **Primary cutaneous sarcomas**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.81, n.3, p.207-221, 2006.

GHOSH, S.; CHAUDHURI, A. **Analysis of three whole-arm translocations in a mouse sarcoma cell line**. Cytogenetics and Cell Genetics, v.38, n.3, p.161-164, 1984.

GUIMARÃES, A. G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; MELO, N. S. R.; ALVES, R. S.; DE LUCCA JUNIOR, W.; BEZERRA, D. P.; GELAIN, D. P.; QUINTANS JUNIOR, L. J. **Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study**. Life Sciences, v.116, n.1, p.8-15, 2014.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; ALVES, R. D. S.; MENEZES, P. D. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; BEZERRA, D. P.; QUINTANS, L. J. **Encapsulation of carvacrol, a monoterpenic present in the essential oil of oregano, with β-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols.** *Chemico-Biological Interactions*, v.227, n.1, p.69-76, 2015.

HASTIE, C.; MASTERS, J. R.; MOSS, S. E.; NAABY-HANSEN, S. **Interferon-γ reduces cell surface expression of annexin 2 and suppresses the invasive capacity of prostate cancer cells.** *Journal of Biological Chemistry*, v.283, n.18, p.12595-12603, 2008.

HUSSEIN, R.; SMITH, M. A. **Soft tissue sarcomas: are current referral guidelines sufficient?** *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, v.87, n.3, p.171-173, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Tipos de Câncer.** 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. **New antitumor principles, Casearin A-F, from Casearia sylvestris Sw. (Flacourtiaceae).** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.38, n.12, p.3384-3388, 1990.

KAMB, A. **What's wrong with our cancer models?** *Nature Reviews Drug Discovery*, v.4, n.2, p.161-165, 2005.

KELLEHER, F. C.; VITERBO, A. **Histologic and genetic advances in refining the diagnosis of “undifferentiated pleomorphic sarcoma”.** *Cancers*, v.5, n.1, p.218-233, 2013.

KUMAR, D.; SHARMA, P.; NEPALI, K.; MAHAJAN, G.; MINTOO, M.J.; SINGH, A.; SINGH, G.; MONDHE, D.M.; SINGH, G.; JAIN, S.K.; GUPTA, G.K.; NTIE-KANG F. **Antitumour, acute toxicity and molecular modeling studies of 4-(pyridin-4-yl)-6-(thiophen-2-yl) pyrimidin-2 (1H)-one against Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180.** *Heliyon*, v.4, n.6, p.e00661, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, M. **Pathology Basis of Disease.** China: WB Saunders, 2004. 1525 p.

MACHADO, C. F. P.; MELO JÚNIOR, M. R. **Avaliação do efeito antitumoral da Kalanchoe brasiliensis sobre o sarcoma 180 em camundongos.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.6, n.1, p.1-6, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. **In vitro and in vivo antiproliferative activity of Calotropis procera stem extracts.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MASUNO, H.; TSUJITA, T.; NAKANISHI, H.; YOSHIDA, A.; FUKUNISHI, R.; OKUDA, H. **Lipoprotein lipase-like activity in the liver of mice with Sarcoma 180.** *Journal of Lipid Research*, v.25, n.5, p.419-427, 1984.

MATSUZAKI, W. S.; RODRIGUES, F. C. M.; MALHEIROS, C. A.; RAHAL, F. **Uso de teste de quimio-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no câncer gástrico avançado.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.33, n.4, p.228-234, 2006.

MÉNIEL, V.; MEGGES, M.; YOUNG, M. A.; COLE, A.; SANSOM, O. J.; CLARKE, A. R. **Apc and p53 interaction in DNA damage and genomic instability in hepatocytes.** *Oncogene*, v.34, n.31, p.4118-4129, 2015.

MILITÃO, G. C. G. DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. **In vitro and in vivo anticancer properties**

of cucurbitacina isolated from *Cayaponia racemosa*. *Pharmaceutical Biology*, v.50, n.12, p.1479–1487, 2012.

MONTENEGRO, R. C.; FEIO, F. R. A.; PINHO, P. M. R.; NEGREIROS, N. A. A. P.; SILVA, B. F.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. **Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor**. *Biology of Pharmaceutical Bulletim*, v.31, n.3, p.454-457, 2008.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** Fortaleza, 2012, p. 174. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. **In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera***. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology*, v.382, n.2, p.139-49, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. J. **Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180**. Uberlândia, 2008, p. 97. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (MG).

PADERA, T. P.; STOLL, B. R.; TOOREDMAN, J. B.; CAPEN, D.; DI TOMASO, E.; JAIN, R. K. **Pathology: cancer cells compress intratumour vessels**. *Nature*, v.427, n.6976, p.695, 2004.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. **Câncer e modelos experimentais de tumores murinos**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.69, n.4, p.439-445, 2010.

PEREIRA, F. B. C.; CHAVES, F. B. **Evolution of Sarcoma 180 in mice treated with hyperchlottedinated water**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.78, n.2, p.209-214, 1983.

PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, S. M. T.; COÊLHO, L. C. D.; HERNANDES, M. Z.; LEITE, A. C. L.; DE SIMONE, C. A.; COSTA, V. M. A.; SOUZA, V. M. O. **Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes**. *Chem Med Chem*, v.5, n.4, p.523–528, 2010.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. A. **Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice**. *Nature Reviews Cancer*, v.3, n.1, p.952-959, 2003.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. **Activation of fibroblasts in cancer stroma**. *Experimental Cell Research*, v.316, n.17, p.2713-2722, 2010.

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. Fortaleza, 2013, p. 122. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC.

RITCH, P.; GLAZER, R. I.; CUNNINGHAM, R. E.; SHACKNEY, S. E. Kinetic **Effects of sangivamycin in Sarcoma 180 *in vitro***. *Cancer Research*, v.41, n.5, p.1784-1788, 1981.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. **The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds**. *Cancer Research*, v.30, n.6, p.1799-1802, 1970.

SATO, D. Y.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. **Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication**. *Homeopathy*, v.94, n.1, p.26-32, 2005.

SCHABEL, F. M.; GRISWOLD JR, D. P.; LASTER JR, W. R.; CORBETT, T. H.; LLOYD, H. H.

Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. Pharmacology & Therapeutics, v.1, n.4, p.411-435, 1977.

SILVA, M. P. N. **Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia, v.52, n.1, p.59-77, 2006.

SOUZA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ROCHA FILHO, F. D.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. **In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*.** Carbohydrate Polymers, v.69, n.1, p.7-13, 2007.

STREET, S. E.; CRETNEY, E.; SMYTH, M. J. **Perforin and interferon-activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.** Blood, v.97, n.1, p.192-197, 2001.

SUGIURA, K. **Tumor transplantation.** In: GAY, W. I. Methods of animal experimentation. New York: Academic Press, 1965. 357p.

SUZUKI, K.; YAMADA, S. **Ascites sarcoma 180, a tumor associated with hypercalcemia, secretes potent bone-resorbing factors including transforming growth factor interleukin-1 α and interleukin-6.** Bone Miner, v.27, n.3, p.219-233, 1994.

TAYLOR, B. S.; BARRETINA, J.; MAKI, R. G.; ANTONESCU, C. R.; SINGER, S.; LADANYI, M. **Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets.** Nature Reviews Cancer, v.11, n.8, p.541–557, 2011.

TONETO, M. G.; LUCCHESE, I. C.; REICHEL, C. L. **Liposarcoma gigante de retroperitônio.** Revista Brasileira de Cancerologia, v.59, n.2, p.255-260, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory.** Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em: <https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/> Acesso em: 28 fev. 2019.

WORLEY, L. G.; SPATER, H. W. **The cytoplasmic cytology of Sarcoma 180.** Quarterly Journal of Microscopical Science, v.93, n.4, p.413-425, 1952.

ZHANG, B.; CHEN, X.; GE, S.; PENG, C.; ZHANG, S.; CHEN, X.; LIU, T.; ZHANG, W. **Arginine methyltransferase inhibitor-1 inhibits sarcoma viability *in vitro* and *in vivo*.** Oncology Letters, v.16, n.1, p.2161-2166, 2018.

ZUCKERBERG, C. **Ultrastructure of Sarcoma 180.** Cancer Research, v.33, n.1, p.2278-2282, 1973.

BIORREPOSITÓRIO DE SALIVA EM ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Natália Ramos

Universidade Estadual Paulista- Júlio de Mesquita Filho.
Bauru- SP

Thais Francini Garbieri

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.
Bauru- SP

Thiago José Dionísio

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.
Bauru- SP

Carlos Ferreira dos Santos

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.
Bauru- SP

Lucimara Teixeira das Neves

Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais HRAC-USP.
Bauru- SP

invasiva e necessita de pessoal especializado para o procedimento. Nesse contexto, a saliva vem ganhando reconhecimento como uma fonte alternativa para o isolamento de DNA, pois além do método de coleta não ser invasivo, sendo tolerado pela maioria dos indivíduos, apresenta também menor o risco de contaminação. As amostras de saliva, diferente do sangue, podem ser congeladas por longos períodos, possibilitando a implementação de biorrepositório com a finalidade de pesquisa na área de genética. Portanto, o intuito deste estudo foi analisar a qualidade e quantidade de DNA extraído a partir de amostras de saliva total armazenada por congelamento pelo período de 2 e 6 anos, utilizando dois protocolos de extração. Após a extração, o DNA genômico foi submetido à análise espectrofotométrica e genotipagem do polimorfismo rs12532, do gene *MSX1*, a fim de, verificar a influência do congelamento das amostras de saliva a -20°C e do protocolo de extração utilizado nos experimentos de genotipagem por PCR Real Time.

Os resultados encontrados possibilitam inferir que a concentração e qualidade do DNA analisado foram viáveis para estudos de genotipagem.

PALAVRAS-CHAVE: Biorrepositório, Saliva, DNA e PCR.

RESUMO: No campo das análises genéticas e moleculares é de fundamental importância o uso de materiais biológicos eficazes no que tange a qualidade dos resultados. No caso do DNA, dentre os materiais biológicos nos quais é possível isolá-lo para estudos, o sangue é, até então, o mais utilizado, porém sua coleta é

ABSTRACT: In the field of genetic and molecular analyzes it is of fundamental importance the use of biological materials effective in what concerns the quality of the results. In the case of DNA, among the biological materials in which it is possible to isolate it for studies, blood is the most used up until now, but its collection is invasive and requires specialized personnel for the procedure. In this context, saliva has been gaining recognition as an alternative source for DNA isolation, since besides the non-invasive collection method, being tolerated by the majority of individuals, it also presents a lower risk of contamination. Samples of saliva, other than blood, can be frozen for long periods, allowing the implementation of a biorepository for the purpose of genetic research. Therefore, the purpose of this study was to analyze the quality and quantity of DNA extracted from samples of total saliva stored by freezing for the period of 2 and 6 years using two extraction protocols. After extraction, the genomic DNA was subjected to spectrophotometric analysis and genotyping of the rs12532 polymorphism of the MSX1 gene in order to verify the influence of the freezing of the saliva samples at -20 ° C and the extraction protocol used in the genotyping experiments by Real Time PCR. The results obtained allow us to infer that the concentration and quality of the analyzed DNA were feasible for genotyping studies.

KEYWORDS: Biorepository, Saliva, DNA and PCR.

1 | INTRODUÇÃO

Os princípios básicos da biologia celular e molecular tiveram início em 1665, com a construção do primeiro microscópio óptico por Robert Hooke permitindo a visualização de pequenas delimitações que ele nomeou de célula, e descobriu ser um constituinte fundamental dos organismos, responsáveis por exercer funções características como o crescimento e por transmitir informações vitais para a sobrevivência de todas as espécies na reprodução (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; FARAH, 2007).

O material responsável por comandar as funções celulares foi devidamente elucidado em 1953, por James Watson e Francis Crick que divulgaram suas pesquisas sobre a descoberta da estrutura molecular do DNA. A partir de então, foi possível explanar sobre o fundamento da hereditariedade e definir o responsável pela informação genética que carregamos (SNUSTAD; SIMMONS, 2010; MICKOS et al., 2005).

O desenvolvimento de metodologias para análises moleculares têm sido de grande importância para a genética humana e médica. Essas técnicas visam buscar desde métodos acessíveis para coleta e armazenamento de materiais biológicos que fornecem bons resultados, até métodos de identificação e mapeamento de genes envolvidos com inúmeras patologias, auxiliando no prognóstico e futuros aconselhamentos genéticos (ZAMBUZZI, et al., 2012; KUCHLER, et al., 2001; ABRÃO, et al., 2005; YI; HUANG; WU, 2013; PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013). Essas técnicas desenvolvidas são também utilizadas em análises forenses, na qual técnicas testadas foram capazes de identificar indivíduos por meio de pequenas amostras biológicas de DNA coletadas em locais de delitos, por isso a relevância de se testar várias

metodologias e padronizar esses meios para estudos genéticos (CARVALHO, et al., 2009; KHARE, et al., 2014; PANDESHWAR, et al., 2013; PANDESHWAR, et al., 2013).

Um DNA com bom rendimento é essencial para que os resultados dos experimentos moleculares sejam satisfatórios. O sangue periférico é o material biológico mais utilizado nas pesquisas envolvendo análises moleculares investigando a etiologia de patologias, porém para obtenção desse material de partida são necessários profissionais capacitados para as coleta, além de ser um método invasivo, com difícil acesso ao público, como bebês, crianças e idosos (CARVALHO, et al. 2009; KHARE, et al., 2014; NUNES, et al., 2012; YI, HUANG, WU, 2013). Outro ponto a ser destacado, é que o sangue necessariamente deve ser processado para extração do DNA em até uma semana após a coleta. (QUINQUE et al., 2006).

Assim, devido a essas dificuldades, aventou-se a utilização de saliva como fonte alternativa para obtenção de DNA genômico, por meio das células do epitélio bucal, e observou-se ser um material de fácil obtenção, manejo e armazenamento, além de não necessitar de pessoas especializadas para proceder à coleta, não sendo um método invasivo, o que minimiza também o risco de contaminação. Em vários estudos, o DNA obtido de saliva apresentou pureza e rendimento semelhante aos obtidos a partir de sangue, confirmando a eficiência desse material como fonte de DNA genômico (EHLI et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; WALTRICK - ZAMBUZZI et al., 2012; KHARE, et al., 2014; YI, HUANG, WU, 2013; PANDESHWAR, et al., 2013). Além disso, a saliva contém um grande número de células descamadas do epitélio bucal o que garante a concentração de DNA necessária para as análises moleculares (POLGÁROVÁ; BEHULIAK, CELEC, 2010; QUINQUE, et al., 2006).

As células do epitélio bucal podem ser coletadas de diversas formas, além da saliva total, há coletas por meio de *swabbing*, *cotton swabs*, *foam swabs*, *flocked swabs*, *cytobrushes*, *cotton spit wads*, entre outros meios. Estudos realizados observaram que o meio de coleta pode interferir na quantidade e qualidade do DNA obtido, no entanto, os valores de concentração considerados adequados podem variar dependendo do tipo de técnica de extração que será realizada, portanto, é necessário padronizar essas técnicas de acordo com as análises a serem realizadas posteriormente. (VERDON, et al., 2014; WALTRICK-ZAMBUZZI, et al., 2012; EHLI, et al., 2008).

A técnica de extração de DNA consiste em várias etapas laboratoriais que buscam o isolamento e a purificação do DNA genômico a ser estudado. Os protocolos de extração variam de acordo com o tipo de material biológico de partida utilizado (células animais e vegetais, vírus e bactérias); no entanto, existem etapas básicas e comuns a todos. Inicialmente é necessário que ocorra a ruptura das membranas celulares, sendo que essa lise deve ser realizada de maneira eficiente e de modo que não danifique a estrutura do DNA, a ruptura pode ser realizada utilizando enzimas em combinação com soluções detergentes que solubilizam as membranas e uma substância inibidora de DNase, que evita a degradação do DNA. A próxima etapa é a purificação dos ácidos nucleicos da mistura onde se encontram dispersos moléculas que não serão utilizadas

para análises como o RNA, proteínas, lipídeos, polissacarídeos e que também podem interferir nas fases seguintes (FARAH, 2007; PANDESHWAR, et al., 2013).

A concentração e a pureza do DNA extraído são geralmente determinadas pela espectrofotometria com leitura da absorbância em razão de A260/A280nm, levando-se em conta a proporção de pureza entre 1,6 a 2,0 para um DNA considerado de qualidade.

Várias pesquisas realizadas com DNA genômico a partir de amostras de células bucais presente na saliva, obtiveram resultados satisfatórios com bom rendimento e integridade do DNA (NEVES, L.T., 2009; CARVALHO, S.P.M., et al., 2009; KHARE, et al., 2014) sendo que nesses trabalhos as amostras apresentaram DNA com alto grau de pureza, apontando que o nível de degradação foi baixo, possibilitando a amplificação com as técnicas de PCR e até mesmo o sequenciamento direto de pelo método de Sanger. Nas reações de amplificações também foram observadas sucessos com 100% de precisão na determinação de genótipos com a PCR em tempo real (ZAMBUZZI, et al., 2012; NEMODA, et al., 2011; NUNES, et al., 2012; YI, HUANG, WU, 2013). Em muitos estudos em que a saliva foi utilizada como material biológico de partida para a extração de DNA genômico os autores obtiveram resultados compatíveis quando comparados ao sangue (CARVALHO, S.P.M., et al., 2009; NEVES, L.T., 2009; ZAMBUZZI, et al., 2012; KHARE, et al., 2014) Períodos distintos de congelamento também foram avaliados e tiveram poucos efeitos sobre a qualidade do DNA, desde que o material em questão não sofresse repetidos ciclos de congelamento e descongelamento para não alterar a estrutura do DNA (AIDAR; LINE, 2007; KUCHLER et al., 2011; NEMODA et al., 2011; KHARE, et al., 2014; PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013).

Contudo ainda em relação ao DNA extraído vale ressaltar que este pode apresentar maior ou menor grau de rendimento e pureza de acordo com o protocolo de extração utilizado. Desta forma, os protocolos de extração que vem sendo disponibilizados no mercado devem ser testados e selecionados levando-se em conta a qualidade e quantidade de DNA genômico final obtido, para análises moleculares mais específicas, de modo que, esse DNA obtido da saliva possibilite obter resultados precisos, independente do tipo de análise molecular que será utilizada nos estudos genéticos (YI, HUANG, WU, 2013; EHLI, et al., 2008; CARVALHO, et al., 2009; ZAMBUZZI, et al., 2012; AIDAR, et al., 2007).

Pesquisas realizadas anteriormente no laboratório de Genética e Farmacologia da FOB-USP apresentaram resultados satisfatórios com amostras de saliva em diferentes períodos de congelamento para análises moleculares utilizando metodologias como a PCR e o sequenciamento direto (Garbieri et al., 2017). Os dois protocolos de extração utilizados nesse estudo de Garbieri e colaboradores (2017) que apresentaram os melhores resultados foram: o kit Oragene™, onde a partir de saliva fresca observou-se 70% de integridade na eletroforese em gel de agarose, após PCR convencional, e com saliva congelada por 6 e 12 meses observou-se 100% de integridade. O outro protocolo de extração utilizado que apresentou resultados satisfatórios foi o kit QIAamp® Mini

and Blood Mini Handbook da Qiagen®, no qual observou-se 100% de integridade com saliva fresca e congelada por 12 meses e 80% para as amostras de saliva congelada por 6 meses.

Diante do exposto, é possível inferir que DNA de boa qualidade é de fundamental importância para que nas análises moleculares seja possível identificar variantes genéticas. Os estudos genético-moleculares epidemiológicos em larga escala requerem delineamento e implementação de biorrepositórios. Para isto é necessário que as amostras biológicas possam ser conservadas por um período relativamente longo de armazenamento entre o procedimento de coleta e processamento para obtenção do DNA genômico para as análises propostas. Nesse quesito relativo ao armazenamento, deve-se atentar aos períodos de congelação que as amostras serão submetidas, temperaturas ideais de armazenamento e se haverá interferência caso haja descongelamentos, dados importantes para a implantação de um biorrepositório. Além disso, não basta ter armazenado o material de partida adequadamente, mas também é fundamental elencar quais protocolos de extração DNA a partir de saliva apresentam os melhores resultados após longos períodos de armazenamento por congelação desse material de partida (PRAMANIK, et al., 2012; PANDESHWAR, et al., 2013).

2 | OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a concentração, pureza e integridade do DNA genômico extraído a partir de células do epitélio bucal presentes na saliva total fresca e congelada por período de dois e seis anos, utilizando 2 protocolos de extração de DNA distintos.

2.2 Objetivos Específicos

Analizar a viabilidade de utilização dessas amostras de DNA extraídas a partir de saliva após longos períodos de congelação em análises moleculares para identificação de polimorfismos genéticos (rs12532) no gene *MSX1* por meio de PCR em tempo real.

3 | CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foi realizada tentativa de contato com 30 indivíduos que apresentavam saliva congelada em biorrepositório referentes a outros estudos em fase de finalização no Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB- USP, sob orientação da Prof.^a Dra. Lucimara Teixeira das Neves. Devido à dificuldade de contato, conseguimos ao final

que 17 voluntários participassem do estudo, portanto foram selecionados o máximo de voluntários que apresentavam saliva congelada nos períodos propostos (2 e/ou 6 anos).

Eles foram orientados acerca da presente pesquisa, convidados a participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. De todos os voluntários foi coletada também saliva fresca que foi utilizada como parâmetro comparativo. Assim, de cada voluntário de pesquisa foi extraído DNA de saliva fresca e congelada a -20°C por 2 anos (tempo intermediário de armazenamento) ou 6 anos (longo período de armazenamento), ou ambos.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do DNA

Para a coleta da saliva fresca, os voluntários receberam um tubo *falcon* estéril onde foram expectorados 5mL de saliva total não estimulada.

Para a realização das extrações de DNA, foram utilizados dois protocolos (1 e 2), respectivamente de Solução de Acetato e protocolo de Colunas (Kit comercial DNA Purification from Blood or Body Fluids, QIAamp®, Qiagen®). As salivas foram aliquotadas com os devidos volumes necessários para cada um dos protocolos e devidamente identificados. Após as extrações todas as amostras foram submetidas às leituras em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific).

Segue a descrição completa dos procedimentos de extração de acordo com cada um dos protocolos utilizados:

Protocolo 1 - Protocolo utilizando a Solução de Acetato de Amônio, baseado no trabalho de Aidar e Line (2007) e descrito abaixo:

Para esse protocolo foi aliquotado 500 µL de saliva descongelada em gelo picado e homogeneizada ressaltando que para esse protocolo 1 são necessários 2 dias, pois a extração é realizada em duas etapas, com intervalo *overnight*.

A saliva total foi centrifugada em um tubo de 1,5mL a 10.000g (ou rcf) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspensão em 1 mL de tampão de extração [10mM Tris – Hcl; pH7, 8; 5mM EDTA; 0,55% SDS]. Foi adicionado 5µL de proteinase K (20 mg/mL) para a degradação das proteínas. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 56°C *overnight*. Em seguida, foram centrifugados rapidamente (para baixar o líquido da borda). Foi adicionado aos tubos, 500µL de solução de acetato de amônio a 10M os quais foram agitados manualmente por 3 a 5 minutos e centrifugados a 15.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram transferidos 500µL do sobrenadante para um novo tubo, e 540µL de álcool isopropílico gelado foi adicionado em cada tubo que foi agitado em vortex por 15 segundos. As amostras foram mantidas em geladeira por 2 horas e em seguida foram centrifugados a 10.000g (ou rcf) por 20 minutos em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi descartado com cuidado para não ressuspender o pellet de DNA, 1 mL de álcool 70% gelado foi adicionado aos tubos que foram centrifugados a 10.000g (ou rcf) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e os tubos ficaram abertos por 3 a 4 horas para evaporar o excesso de álcool. Após 3 ou 4 horas o DNA foi hidratado em 50µL de água deionizada autoclavada.

Protocolo 2 - DNA Purification from Blood or Body Fluids (Kit comercial - QIAamp® Mini and Blood Mini Handbook da Qiagen®).

Para esse protocolo que faz uso de colunas, foi aliquotada 200 µl de saliva descongelada em gelo picado e homogeneizada, e foi realizada a extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.2 Quantificação das Amostras

Após as extrações foi realizada a leitura da qualidade e concentração do DNA, em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific). Este equipamento fornece duas medidas importantes que são: qualidade medida em (A260/280nm) e a quantidade em ng/µl. (EHLI et al., 2008; KUCHLER et al., 2011). Foi utilizada a quantidade de 2µl de DNA de cada amostra para essa leitura em espectrofotômetro. Os resultados gerados por este aparelho apresentam um padrão de índices de absorção com a razão A260/280, no qual um DNA considerado de boa qualidade deve estar compreendido entre os valores de 1,6 a 2,0 (RAJ et al., 2014; NEMODA et al., 2011).

3.2.3 Análise Molecular

3.2.3.1 Genotipagem por meio de PCR em tempo real (rs 12532 no gene MSX1)

Em seguida, o DNA extraído das amostras (frescas e armazenadas por 2 e 6 anos) foi submetido à discriminação alélica da variante polimórfica (rs 12532) no gene MSX1, realizada por PCR Real Time (Equipamento Via 7 pertencente ao laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP).

Para a discriminação genotípica do polimorfismo rs12532, no gene MSX1 foram utilizados reagentes para um produto final de PCR de 3µL utilizando o sistema Taqman® e o mix Genotyping Master Mix (Life Technologies®) o qual contém todos os reagentes necessários para a reação (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo as recomendações e instruções do fabricante (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados em aparelho de PCR em tempo real Via 7 (Life Technologies®, Estados Unidos), utilizando ensaios pré-fabricados e padronizados, produzidos e validados pela empresa Life Technologies®.

Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem para a realização da PCR no equipamento: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a avaliação da taq polimerase seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foram

utilizados controles negativos constituídos para todos os reagentes descritos, contudo sem a presença do DNA.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 abaixo, estão apresentados todos os resultados dos dois protocolos, para todas as amostras e todos os períodos analisados (6 anos, 2 anos e fresca) referentes à: leitura do espectrofotômetro, e da genotipagem (rs12532 do gene *MSX1*).

Amostras	Parâmetros	Protocolo	Protocolo	Protocolo	Protocolo	Protocolo	Protocolo
		1 (6 Anos)	1 (2 Anos)	1 Fresca	2 (6 Anos)	2 (2 Anos)	2 Fresca
I-1	ng/µL	1,90	1,50	7,90	105,50	18,70	8,40
	A260/280	1,22	1,69	1,51	1,87	1,97	1,88
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-2	ng/µL	0,70	1,60	9,40	2,00	9,00	31,00
	A260/280	2,11	1,71	1,80	1,30	1,72	1,96
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-3	ng/µL	32,30	2,10	2,90	1,70	4,80	53,10
	A260/280	0,90	1,52	1,85	1,63	1,57	1,85
	Genotipagem	-	+	+	+	+	+
I-5	ng/µL	0,90	2,60	174,80	1,70	5,30	2,30
	A260/280	-5,31	2,13	1,80	1,64	1,99	1,88
	Genotipagem	+	+	-	+	+	+
I-6	ng/µL	1,10	0,90	1,30	2,80	3,10	11,80
	A260/280	-1,81	1,14	1,17	1,51	1,91	1,74
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-7	ng/µL	2,90	1,10	41,80	1,80	3,70	39,90
	A260/280	1,76	1,96	1,93	1,47	1,65	1,90
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-8	ng/µL	4,40	2,00	77,50	2,50	6,30	22,80
	A260/280	1,78	1,15	1,88	2,07	1,78	1,86
	Genotipagem	-	+	+	+	+	+
I-9	ng/µL	3,70	7,20	15,70	1,50	16,80	59,20
	A260/280	1,74	1,84	1,90	2,32	1,95	1,95
	Genotipagem	+	+	-	+	+	+
I-10	ng/µL	1,10	2,20	2,00	2,30	2,80	32,40
	A260/280	0,60	1,66	1,81	1,93	1,59	1,88
	Genotipagem	+	+	+	+	+	+
I-11	ng/µL	1,00	7,90	211,70	1,00	2,00	223,50
	A260/280	0,72	1,70	1,85	3,89	1,78	1,88
	Genotipagem	-	+	-	+	+	+
I-12	ng/µL	2,40	1,80	247,80	2,30	5,30	61,30
	A260/280	1,87	2,17	1,80	1,30	1,94	1,95
	Genotipagem	+	+	+	-	+	+

I-14	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	1,60 1,79 +	0,70 1,41 -	177,50 1,85 +	2,20 1,49 +	0,50 1,34 +	96,90 1,91 +
I-21	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	2,50 1,37 +	3,30 2,00 +	41,30 1,80 +	0,30 0,66 +	5,40 2,12 +	33,10 1,87 +
I-22	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	1,00 1,86 +	2,40 1,19 -	35,70 1,20 +	1,30 1,33 +	5,80 1,57 +	21,20 1,93 +
I-23	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	1,10 1,03 +	1,40 1,48 +	22,10 2,00 +	2,60 1,51 -	7,20 1,78 +	34,40 1,88 +
I-25	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	10,28 1,30 +	55,10 0,98 -	9,50 1,95 +	2,20 1,70 +	1,88 1,91 +	28,30 1,90 +
I-30	ng/ μ L A260/280 Genotipagem	1,60 1,51 -	2,60 1,66 +	141,70 2,00 +	2,70 1,64 +	3,60 1,46 +	55,10 1,99 +

Tabela 1- Análises de qualidade (A260/280) e quantidade (ng/ μ L) geradas pela espectrofotometria (ng/ μ L A260/280), e da genotipagem, positivo para as amostras que apresentaram êxito e negativo para aquelas em que não foi possível estabelecer o genótipo.

Referente à concentração de DNA, a partir dos resultados representados na tabela 1 acima, podemos observar valores de concentração de DNA baixas várias amostras abaixo de 10ng/ μ L de DNA, em contrapartida a baixa concentração, muitas amostras apresentaram razão A260\280 dentro dos padrões ótimos aceitos e utilizados em vários outros estudos que está entre 1,6 e 2,0. Quinque e colaboradores (2006) verificaram que há uma grande proporção de DNA de microrganismos no DNA extraído de amostras de saliva, portanto, é possível que esse fator juntamente com a baixa concentração de DNA humano obtido possa ter influenciado nos resultados da PCR, fazendo desse método quantitativo direto não específico para DNA humano (QUINQUE et al, 2006; RAJ et al, 2014). Em muitos casos observa-se baixa concentração de DNA, verificada pela medida do espectrofotômetro. Mas em grande parte das amostras, foi possível por meio da reação de PCR em tempo real, descobrir o genótipo do polimorfismo em questão. Analisando esses resultados, é possível perceber que as baixas concentrações não determinam a inexistência de DNA ou inviabilidade de utilização na tentativa de genotipagem, independente da concentração.

As figuras de 1 a 3 (abaixo) ilustram resultados individuais obtidos na genotipagem, nas quais, as curvas em verdes são referentes à coloração (VIC) para o alelo ancestral, ou seja, sem a variação (A) e a curva representada pelo azul com coloração (FAM) evidencia o genótipo polimórfico (G). Assim, o gráficos que apresentavam ambas as curvas são referentes a indivíduos heterozigotos (AG) para essa variante (Fig 2). Caso o sujeito apresentasse uma cor somente, coloração verde refere-se ao genótipo homozigoto ancestral (AA) e somente coloração azul é homozigoto polimórfico (GG) (Fig. 1 e 3) (RAFIGHDOOST, H., et al, 2013).

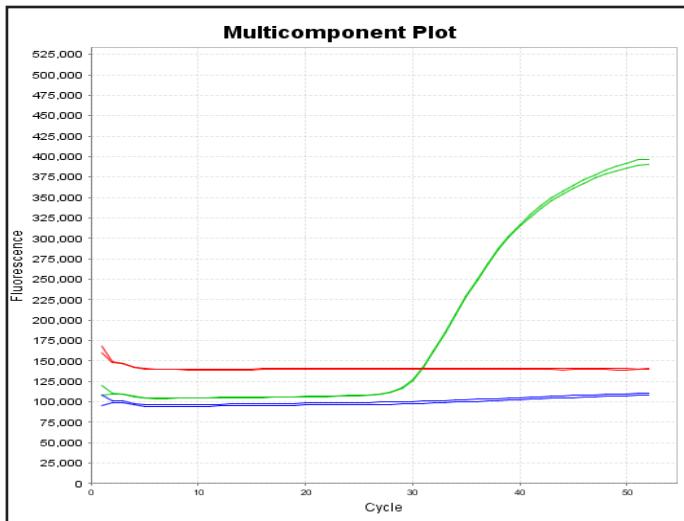


Figura 1 – Gráfico que caracteriza o genótipo ancestral AA (curva corada com VIC - verde).

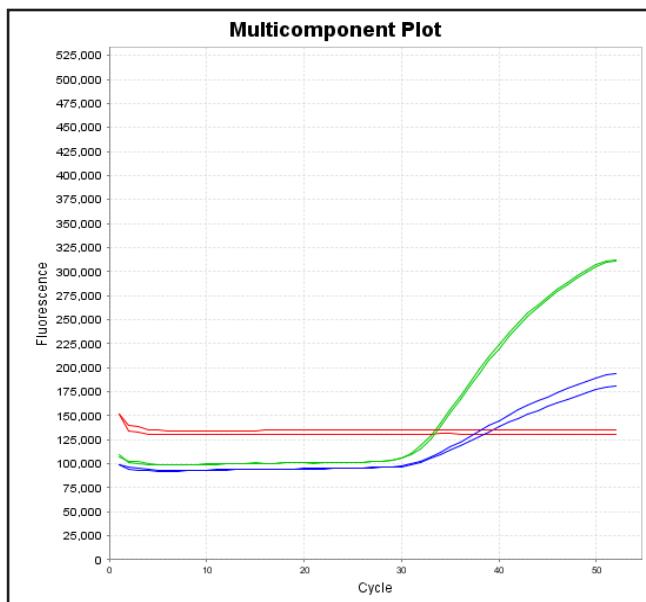


Figura 2 – Gráfico com caracterização alélica de um indivíduo heterozigoto para a variação (AG).

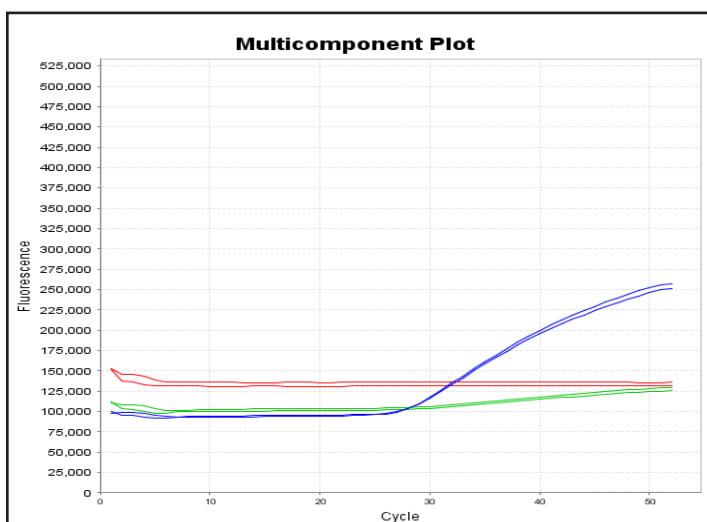


Figura 3 – Gráfico com caracterização de genótipo polimórfico (GG) representado pela curva em azul corado (FAM).

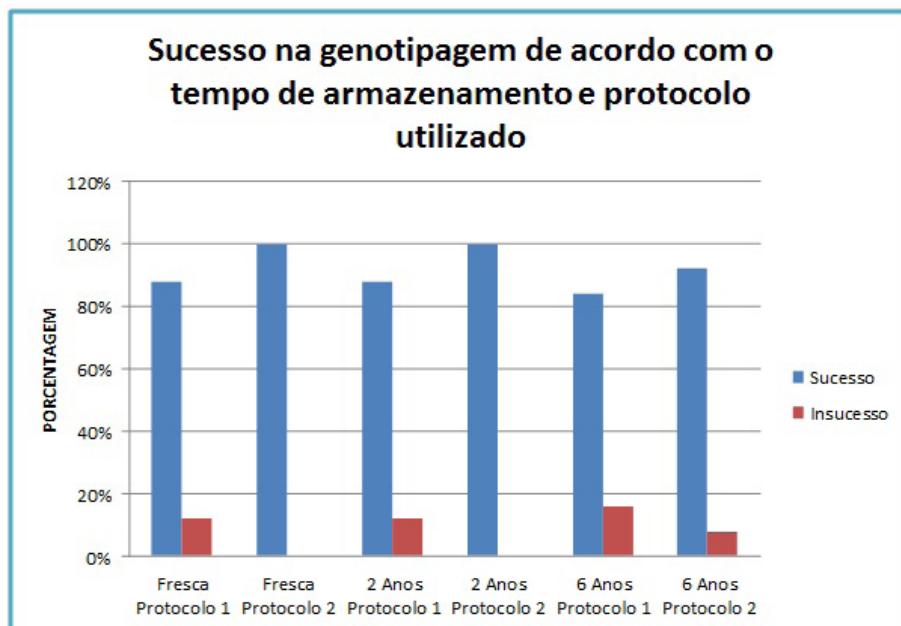


Figura 4. Gráfico de aproveitamento da genotipagem.

A figura 4 apresenta os resultados referentes ao aproveitamento nesse experimento de genotipagem (rs 12532 no gene *MSX1*) por PCR em tempo real para todas as amostras e todos os períodos. Na primeira reação para genotipagem, das 102 amostras testadas, 20 delas não funcionaram. Esta análise foi então realizada novamente com estas 20 amostras e no final somente 6 das 20 não apresentaram bons resultados. O insucesso de algumas amostras ocorreu com a ausência de caracterização de alelos na duplicata realizada no experimento de genotipagem nas duas tentativas realizadas. Apesar do insucesso de algumas amostras de determinados períodos como demonstra a figura 4, foi possível caracterizar os alelos de todos os participantes, pois para cada sujeito foi realizado experimento de genotipagem 6 vezes (para cada um dos dois protocolos e para cada um dos três períodos de armazenamento). Assim, em algumas dessas 6 genotipagens foi possível caracterizar os alelos do voluntário. De acordo com o figura 2, é possível observar que o protocolo 2 utilizado para extração apresentou índice de 100% de aproveitamento em amostras frescas e armazenadas pelo período de 2 anos, o protocolo 1 foi o que apresentou os piores resultados em relação ao aproveitamento, sendo o pior, com saliva armazenada por 6 anos, com 16% de amostras apresentando insucesso.

Provavelmente as altas taxas percentuais de sucesso nas genotipagens possam também ser atribuídas ao sistema Taqman, ensaio muito conhecido e com alto grau de eficiência, que apresenta grande especificidade, o que possibilita que as sondas utilizadas se liguem aos alvos, independente da amostra apresentar alguns contaminantes, como DNA microbiano. Por isso a PCR em tempo real apresenta grandes vantagens e altos percentuais de aproveitamento, próximos de 100%, além de ser um método automático e rápido, ele dispensa a análise de eletroforese em gel de agarose (FARAH,2017). Portanto, mesmo a genotipagem sendo uma análise

molecular mais simples e direta, foi possível verificar que até mesmo um DNA nas condições supracitadas apresentou bons resultados. Ainda assim, especialmente para algumas amostras congeladas por período de 6 anos e utilizando o protocolo 1, não houve sucesso na genotipagem, o que dificilmente ocorre neste tipo de experimento. Diante desse resultado, é possível inferir que provavelmente grande parte do DNA dessas amostras específicas estava realmente muito degradado.

Foi constatados que subsequentes congelamentos e descongelamentos podem degradar o DNA, uma provável possibilidade, pois as amostras se encontram em congeladores e estes possuem materiais de inúmeros outros projetos, fazendo com que as diferenças de temperatura aconteçam com grande frequência na abertura e fechamento desses refrigeradores. Foi analisado em outras pesquisas que a saliva pode ser armazenada por longos períodos de tempo sem ter influência no rendimento do DNA e nem na qualidade da genotipagem, mas para isso deve-se atentar a estes critérios de manipulação e armazenamento, e esse é mais um motivo para que no planejamento de um projeto que requeira biorrepositório, seja previsto que os materiais biológicos devam ficar isolados e somente retirados para uso (AIDAR; LINE, 2007; CARVALHO et al, 2009; QUINQUE et al, 2006).

Uma sugestão de logística ideal para pesquisas futuras na área de Genética envolvendo Biologia Molecular seria realizar a extração de DNA a partir de saliva fresca, como material biológico de partida para experimentação. Nessa linha poderia ser estabelecido um biorrepositório de macromoléculas (DNA) e outro concomitante com a saliva total para armazenamento. Desta forma, poderiam ser evitadas possíveis interferências de proteínas e enzimas presentes na saliva que poderiam agir no material durante o processo e tempo de armazenamento e os desequilíbrios decorrentes de ciclos de congelamento e descongelamento para uso do material, levando assim a resultados variados de integridade do DNA (NEMODA et al, 2011).

5 | CONCLUSÃO

O uso da saliva armazenada por períodos de 2 e 6 anos, como material biológico para análises moleculares, mostrou-se viável para experimentos de discriminação alélica de polimorfismos genéticos, sendo uma alternativa de fácil obtenção. O protocolo de extração de DNA utilizando colunas mostrou-se superior quando analisados o contexto geral dos dois tempos de armazenamento investigados, quando comparados à saliva fresca. A forma de armazenamento da saliva é uma questão fundamental, visto que o tempo de armazenamento não interfere diretamente na qualidade do DNA desde que não ocorram ciclos de congelamento e descongelamento, possivelmente o principal motivo dos resultados relatados neste estudo. A partir dessa premissa, sugere-se que a saliva seja processada ainda fresca e seja armazenado apenas o DNA genômico extraído. Os experimentos realizados mostraram que as amostras

armazenadas pelo período de 6 anos ainda podem ser viáveis para a realização da PCR em tempo real com a finalidade de caracterização genotípica de polimorfismos, fundamental para avanços na área da genética oral. Contudo, esse tipo de material armazenado e congelado por períodos mais longos provavelmente não apresente os mesmos resultados para técnicas mais sensíveis, como é o caso do sequenciamento, que exige DNA de excelente qualidade para sucesso na obtenção de sequências para as análises.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP, pelo apoio financeiro no processo nº 2014/24416-4.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, Marise, LINE, S.R.P. A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from Buccal Epithelial Cells. Piracicaba- SP, **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, SP, v 18, n 2, p 148-152, 2007.
- BRIONES, M. L. C., et al. Relevance of sampling and DNA extraction techniques for the analysis of salivary evidence from bite marks: a case report. **Genetics and Molecular Research**, Mexico, v. 14, n. 3, p. 10165-10171, ago 2015.
- EHLI, E. A., et al. Using a commercially available DNA extraction kit to obtain high quality human genomic DNA suitable for PCR and genotyping from 11-year-old saliva saturated cotton spit wads. USA, **BioMedCentral Research Note**, Londres, v. 1, n. 22, p. 133, dez. 2008.
- GARBIERI, T. F.; et al. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. **Journal Applied Oral Science**, Bauru SP, v. 25, n 2, p 147-158, 2017.
- GOODE, M. R., et al. Collection and Extraction of Saliva DNA for Next Generation Sequencing. **The Research Institute at Nationwide Children's Hospital**, Ohio, p. 1-13, Ago 2015.
- KÜCHLER, E. C., et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. **Journal of Applied Oral Science**, Niteroi- RJ, v. 20, n. 4, p. 467 - 471, set., 2012.
- NEMODA, Zsofia, et al. Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. Budapest, Hungary, **BMC Medical Research Methodology**, v.11,n.170, p.1-13. dez 2011.
- NEVES, L. T. **Triagem de mutação no éxon 3 do gene IRF6 em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para sequenciamento de DNA genômico a partir de saliva**. 2009. 103 f. Tese (Doutorado, Biologia Oral)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Departamento de ciências biológicas- Bauru-São Paulo. 2009.
- PANDESHWAR, Padma, et al. Role of oral fluids in DNA investigations. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. Índia, v. 22, p. 45-50. Dec 2013.
- QUINQUE, Dominique., et al. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 353, p. 272-227, mar. 2006.

RAFIGHDOOST, Hooshang., et al. Association Between CDH1 and MSX1 Gene Polymorphisms and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip and/or Cleft Palate in a Southeast Iranian Population, **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, Zahedan, Irã, v. 50, n.05, p.98-104, set 2013.

RAJ, P. K; CHANDRA, Shaleen; AGARWAL, Suraksha. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. Madhya Pradesh, India. **Journal of Forensic Dental Sciences**, India, v. 6 , n. 2 p. 81-85, Ago 2014.

SOLOMON, S. M., et al. Evaluation of DNA Extraction Methods from Saliva as a Source of PCR - Amplifiable Genomic DNA. **Revista de Chimie**, Galati, Romania, v.66, n. 12, p. 2101-2103, 2015.

SUN, Fanyue; REICHENBERGER, E. J. Saliva as a Source of Genomic DNA for Genetic Studies: Review of Current Methods and Applications. **Journal of Oral Health and Dental Management**, USA, v. 13, n. 2, p. 217- 222, jun, 2014.

ZAMBUZZI, M.G.W., et al. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do DNA genômico em diferentes protocolos de coleta de células bucais, **International Journal of Dentistry**, Recife-PE, v.11, n. 01,p.12-18, mar 2012.

CONTROLE DA ESTERILIZAÇÃO DE AUTOCLAVES DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIOESTE E DE UM ABRIGO PARA IDOSOS, CASCABEL, PR

Helena Teru Takahashi Mizuta
Fabiana André Falconi
Sara Cristina Sagae Schneider
Rodrigo Hinojosa Valdez
Leanna Camila Macarini

RESUMO: Esterilização é a eliminação de toda e qualquer forma de vida. O processo de esterilização, seja de materiais hospitalares, clínicos, destinados ao uso em idosos ou em animais de laboratório é algo prioritário quando se trata de segurança à saúde. Encontrar um método de esterilização seguro, efetivo e econômico tem sido um grande desafio. O uso de indicadores químicos, físicos e biológicos, constituem-se em ferramentas para monitorar e avaliar a eficácia do processo. Em um abrigo para idosos, localizado no município de Cascavel, Paraná e no Biotério Central da Unioeste, Campus de Cascavel, o método de esterilização através de autoclaves foi adotado. Um indicador biológico resistente, capaz de suportar altas temperaturas e não-patogênico foi utilizado para analisar a eficácia do processo. De maio de 2016 até maio de 2017, foram preparados semanalmente, no laboratório de Controle Microbiológico de Água, Alimentos e Medicamentos, os indicadores biológicos, transportados para os dois locais e desafiado o processo de autoclavação, juntamente com os

demais materiais do mesmo ciclo. Realizaram-se os monitoramentos do processo que comprovaram a eficácia do funcionamento dos esterilizadores do Abrigo e do Biotério Central da Unioeste em todas as semanas do período supracitado. A manutenção da parceria, através de projeto de extensão universitária tem sido de suma importância, comprovando-se, assim, que os materiais que precisam passar por esterilização e são empregados diariamente, poderão estar sendo utilizados com segurança.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus stearothermophilus*, Autoclave, Bioindicador

ABSTRACT: Sterilization is the elimination of any and all forms of life. The sterilization process, whether of hospital or clinical materials, intended for use in the elderly or in laboratory animals is a priority when it comes to health safety. Finding a safe, effective and economical sterilization method has been a great challenge. The use of chemical, physical and biological indicators are tools to monitor and evaluate the effectiveness of the process. In a shelter for the elderly, located in the municipality of Cascavel, Paraná and Unioeste Central Hospital, Cascavel Campus, the sterilization method through autoclaves was adopted. A resistant, high-temperature, non-pathogenic biological indicator was used to analyze the efficacy of the process. From May 2016 to May 2017, the biological indicators,

transported to the two sites and the autoclaving process, were prepared weekly, in the Laboratory of Microbiological Control of Water, Food and Medicines, along with the other materials of the same cycle. The monitoring of the process was verified that proved the effectiveness of the sterilizers of the Shelter and the Unioeste Central Vivarium in all the weeks of the aforementioned period. The maintenance of the partnership through a university extension project has been of paramount importance, proving, therefore, that the materials that need to undergo sterilization and are used daily, may be used safely.

KEYWORDS: *Bacillus stearothermophilus*, Autoclave, Bioindicator

1 | INTRODUÇÃO

Os micro-organismos podem ser agentes patógenos, transmissores de doenças, presentes em todos os ambientes. Portanto, o controle de micro-organismos corresponde a uma batalha diária em lares, hospitais, restaurantes. Existem vários métodos físicos e químicos para o controle dos micro-organismos, sendo a principal forma a esterilização, que geralmente ocorre pelo emprego de métodos físicos como o vapor e calor sob pressão (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A esterilização é o processo de destruição de todas as formas de vida microbiana, fungos, vírus, bactérias nas formas vegetativas (TIPPLE, 2011; BORINI; MACHADO, 2014). A esterilização a vapor é um processo amplamente utilizado, devido à facilidade de ser efetuada através de autoclaves. Nestes equipamentos, os micro-organismos são destruídos pela ação combinada da alta temperatura, pressão e umidade. A esterilização permite interromper a cadeia de transmissão de micro-organismos (CORRÊA, CASTILHO; PEREIRA, 2009; BERLET et al., 2014).

Para determinar se a esterilização foi adequada é necessário realizar o seu monitoramento. Os monitoramentos de esterilização podem abranger as avaliações biológicas, químicas e físicas. O controle físico pode ser realizado pelo próprio operador e consiste em verificar se a autoclave atinge os parâmetros físicos de tempo, temperatura e pressão de acordo com seu ciclo. Indicadores químicos são caracterizados por tinta termocrônica que mudam de cor quando expostas a alta temperatura por certo tempo. Indicadores biológicos são micro-organismos altamente resistentes ao calor úmido e não são patogênicos (TIPPLE et al., 2011; BARBOSA; PIOLA; ALVES, 2011). Enquanto, o monitoramento químico deve ser realizado a cada carga, o monitoramento biológico é realizado semanalmente (BARBOSA; PIOLA; ALVES, 2011).

O método do indicador biológico visa detectar e diminuir as falhas no processo de esterilização e garantir a eficiência das autoclaves (NIEHEUS, 2004). O micro-organismo utilizado é *Bacillus stearothermophilus*, uma bactéria termófila, produtora de esporos, que apresenta resistência ao vapor de água, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, sendo relativamente sensível ao calor seco (SILVA et al, 2014). A fabricação dos indicadores biológicos deve ser na forma esporulada devido ao fato dos esporos serem bem resistentes ao efeito letal do agente calor (BORINI; MACHADO, 2014).

A utilização de indicadores biológicos constitui-se em uma ferramenta adequada para a avaliação da eficácia dos processos de esterilização, minimizando os erros de interpretação. É importante garantir a confiabilidade da esterilização de materiais ou produtos, visto que um resultado falso-positivo pode ocasionar um dano econômico e operacional, onde artigos serão re-esterilizados sem necessidade. Entretanto, o resultado falso-negativo gera uma sensação de segurança indevida e um potencial risco ao paciente (SILVA et al., 2014).

Os indicadores biológicos são caracterizados como uma preparação padronizada de micro-organismo específico, da ordem de 10^6 esporos de micro-organismos por unidade de papel de filtro ou carreador, e que apresenta resistência definida e estável a um determinado processo de esterilização (SILVA et al., 2014; BORINI; MACHADO, 2014).

A autoclave no abrigo é destinada a esterilizar materiais para realização de curativos nos idosos que lá residem. Os materiais e instrumentos médico-hospitalares devem ser isentos de micro-organismos para garantir a segurança do paciente e dos profissionais que trabalham no local (BERLET et al., 2014). O controle das infecções exógenas, relacionadas aos serviços de saúde, depende da prática de prevenção exercida pelos profissionais da área da saúde quanto a uma série de medidas, entre elas, o reprocessamento de artigos médico-hospitalares, que é uma importante medida de proteção anti-infecciosa e inclui a validação e monitorização de todas as etapas (TIPPLE et al., 2011).

Já o Biotério Central da Unioeste, utiliza a autoclave para esterilizar garrafas empregadas como bebedouro de animais, maravalha e cepilho, oriundos dos laboratórios de experimentação animal. Em um biotério, os fatores ambientais podem ter efeito significativo na saúde e bem-estar dos animais, como também no resultado experimental. As reações biológicas dos animais de laboratório estão correlacionadas às condições sanitárias, genéticas e aos fatores relacionados ao meio ambiente (ANDRADE-SILVA et al., 2012). Em um biotério, as barreiras físicas visam a impedir que agentes indesejáveis, presentes no meio ambiente, tenham acesso às áreas de criação ou experimentação animal, bem como agentes patógenos em teste venham a se dispersar para o exterior do prédio. Entre as barreiras físicas, inclui a autoclave que é o principal equipamento utilizado na esterilização de materiais e insumos (ANDRADE; PINTO; SILVEIRA, 2002).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar o monitoramento nas autoclaves, a fim de detectar e resolver possíveis problemas na esterilização a vapor. As autoclaves pertencem ao abrigo para idosos São Vicente de Paulo e ao Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), ambos localizados no município de Cascavel, no Paraná.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa ocorreu semanalmente e foi realizada em um abrigo para idosos, localizado no município de Cascavel, Paraná e no Biotério Central da Unioeste. Em um ano, no período de maio de 2016 a maio de 2017, foram realizados os monitoramentos nas datas conforme descritas nas Tabelas 1 e 2.

Ano	Meses	Datas	Meses	Datas	Meses	Datas	Meses	Datas
2016	Maio	05	Julho	07	Setembro	01	Novembro	03
		12		14		08		10
		19		21		15		17
		26		28		22		24
	Junho	02	Agosto	04	Outubro	29	Dezembro	01
		09		11		06		08
		16		18		13		15
		23		25		20		

Tabela 1 - Datas do monitoramento biológico das autoclaves do abrigo e biotério no ano de 2016

Ano	Meses	Datas	Meses	Datas	Meses	Datas
2017	Janeiro	12	Março	02	Maio	04
		19		09		11
		26		16		18
		02		23		25
	Fevereiro			30		
		09	Abril	06		
		16		13		
		23		20		
				27		

Tabela 2 - Datas do monitoramento biológico das autoclaves do abrigo e biotério no ano de 2017

Para o monitoramento do processo de esterilização, foram preparados, no Laboratório de Controle Microbiológico de Água, Alimentos e Medicamentos da Unioeste, quatro tubos de ensaio contendo meio de cultura Caldo Triptona Dextrose, com indicador de pH Púrpura de Bromocresol, glicose 20% e o inóculo de esporos de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

Dois dos tubos eram transportados ao abrigo de idosos e dois ao Biotério Central para autoclavação. Um dos tubos-teste era introduzido nas autoclaves e submetidos à esterilização, juntamente com os demais materiais das instituições. O outro tubo correspondia ao controle positivo, que permanecia fora do equipamento, à temperatura ambiente.

Após o ciclo de esterilização, os controles biológicos eram acondicionados, transportados à Unioeste, incubados em banho-maria a 56°C por 24 horas juntamente com o respectivo controle positivo.

A leitura foi realizada avaliando-se visualmente e observando a variação de coloração do meio, onde o controle positivo deve apresentar coloração amarela, típica do crescimento de *Bacillus stearothermophylus* ATCC 7953, devido à produção de ácido e viragem do indicador e os tubos-testes devem continuar na cor púrpura, o que indica que não apresentou crescimento, ou seja, comprovando a eficiência do processo de esterilização (Figura1).

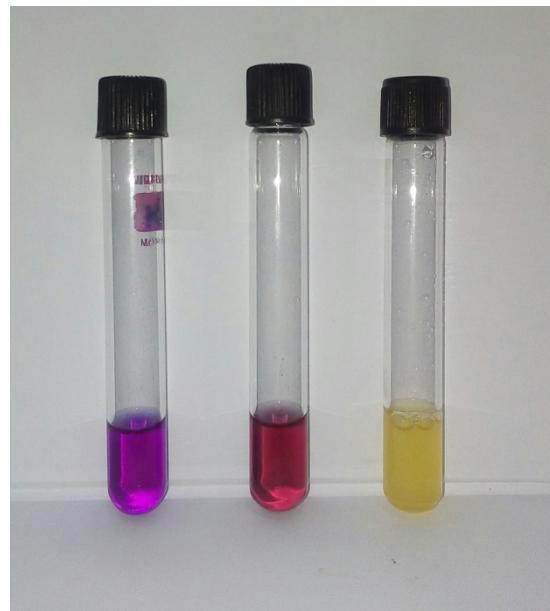


Figura 1 – Indicadores biológicos. Tubos com caldo Caseína Soja e Púrpura de Bromocresol. Da esquerda para a direita: O primeiro tubo não-inoculado com *Bacillus stearothermophylus* ATCC 7953. Segundo tubo (centro): Inoculado, autoclavado e incubado por 24 horas. Terceiro tubo (tubo-controle): Inoculado, não-autoclavado e incubado por 24 horas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos monitoramentos através do uso de indicadores biológicos, no período de maio de 2016 a maio de 2017 verificou-se que as autoclaves utilizadas pelo Biotério Central da Unioeste e do Abrigo para idosos, estariam qualificadas e aprovadas/adequadas para o uso, já que todos os tubos-testes não apresentaram crescimento do micro-organismo *Bacillus stearothermophylus* ATCC 7953. Isso indica que os micro-organismos foram inativados pelo processo de autoclavagem e que, portanto, todo o material estaria estéril, ou seja, seguro para o uso.

A eficácia da esterilização deve ser acompanhada por indicador biológico, utilizando-se o inóculo de *Bacillus stearothermophylus* ATCC 7953, devido à sua resistência ao calor úmido (LAUFER NETO; KERN; SANTOS, 2009).

O uso do indicador biológico mostrou-se eficaz no monitoramento de autoclaves. No ano de 2014, foi realizada uma pesquisa semelhante em quatro autoclaves odontológicas no município de Porto Velho, Rondônia. A efetividade do processo de esterilização pode ser comprovada, uma vez que todos os resultados do monitoramento biológico também mostraram-se negativos para o crescimento bacteriano (DIAS et al.,

2014).

É de extrema importância realizar o controle periódico das autoclaves já que o equipamento tem papel essencial na prevenção de infecções e contaminações (MADEIRA et al., 2015). O monitoramento do processo de esterilização dos materiais, seja da Central de Material Esterilizado (CME) de um hospital, clínica odontológica, abrigo para idosos ou biotérios é tão importante quanto o processo de esterilização (AHMED, 2015), uma vez que, de acordo com Righetti e Vieira (2012), o setor de esterilização de materiais de um biotério, é considerado o mais importante para a garantia da qualidade sanitária dos animais.

Estudo conduzido por Correa, Castilho e Pereira (2009), indicou que a esterilização em autoclaves e estufas é eficaz; contudo, o uso de “diferentes indicadores, químicos e biológicos devem ser utilizados simultaneamente para certificar o sucesso do processo.

Num estudo realizado por Chaves e colaboradores (2016) envolvendo acadêmicos do quarto período do curso de Odontologia do Centro Universitário de João Pessoa, constatou-se que, apesar de os alunos pesquisados terem demonstrado interesse e respeito pela temática, considerou-se como preocupante um dos resultados obtidos, quando apenas uma pequena parcela deles (26,1%), tinha o conhecimento sobre o que seria o monitoramento biológico em autoclaves.

A manutenção desta parceria, envolvendo a instituição de caridade, o biotério e a Unioeste, através de um projeto de extensão universitária, com o monitoramento do processo de esterilização nas autoclaves, permite avaliar se os materiais do abrigo estão, de fato, sendo esterilizados. Isso é um bônus na prevenção de infecções, que podem ser transmitidas aos idosos através de materiais contaminados, destinados à realização de curativos, além de tornar possível atestar a qualidade dos produtos utilizados no biotério, para que os experimentos, envolvendo os animais desse estabelecimento, continuem sendo conduzidos com sucesso.

Assim, pode-se verificar que os testes realizados nas autoclaves utilizadas pelo biotério e abrigo, foram positivos, de maneira que, os materiais que precisam passar por esterilização e são empregados diariamente, podem estar sendo utilizados de forma segura.

4 | CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o processo de esterilização, nas autoclaves analisadas do abrigo e biotério, estavam sendo conduzidos com sucesso.

REFERÊNCIAS

AHMED H. Methods of sterilization and monitoring of sterilization across selected dental practices in karachi, pakistan. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan: JCPSP*, v.25,

ANDRADE, A., PINTO, S.C., OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

ANDRADE-SILVA, B. E.; SOUZA, J. B.; KUZEL, M. A. A. ; SCHIRATO, G. V.; MÜLLER, C. A. Monitoramento dos pontos críticos relativos à biossegurança, barreiras sanitárias e macroambiente do biotério de experimentação do pavilhão Leônidas Deane - IOC/FIOCRUZ. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.2, p. 195-200, 2012.

BARBOSA, D.F; PIOLA, M.C; ALVES, M.R.C. Processo e monitoramento físico, químico e biológico de esterilização em autoclave. **I Fórum da Saúde: o foco é você**. Prefeitura de Jundiaí, São Paulo. 2011.

BERLET, L.J.; ASCARI, R.A.; SILVA, O.M.; TRINDADE, L.L.; KRAUZER, I.M.; JACOBY, A.M.. Fatores que influenciam a qualidade do processo de esterilização. **Revista de Enfermagem da UFPE on line**. Recife, v.8, n.7, p.1997-2003, 2014.

BORINI, J.C.; MACHADO, V.. Indicadores biológicos na esterilização por formaldeído. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB**, Uberlândia, Minas Gerais. 2014.

CHAVES, R.O.; SANTOS, C.A.O.; LACERDA, M.Ci; RIBEIRO, I.L.A.. **Conhecimento de graduandos em Odontologia sobre o processo de esterilização e o monitoramento biológico**. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v.28, n.2, p.96-100 2016.

CORRÊA, E.G.; CASTILHO, A.R.F.; PEREIRA, C.V.. Indicadores químicos e biológicos da eficácia de esterilização por autoclave ou estufa
Revista Odonto Ciência. v.24, n.2, p.156-160, 2009.

DIAS, A.G.A., SANTOS, S.S.F., NARDO, A.P.; LEÃO, M.. Esterilização no serviço público odontológico. **Clínica e Pesquisa em Odontologia-UNITAU**. v.6, p.02-10, 2014.

LAUFER NETO, J., KERN, R.; SANTOS, E.B.. Controle da esterilização em autoclave por meio de métodos químicos e biológicos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**. v.10, p.43-48, 2009.

MADEIRA, M.Z.A., SANTOS, A.M.R., BATISTA, O.M.A.; RODRIGUES, F.T.C. . Processamento de produtos para saúde em centro de material e esterilização. **Revista SOBECC**. v.20, p.220-227, 2015.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A.. **Microbiologia De Brock**. 14^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

NIEHEUS, R.C. **Autoclaves verticais: uma proposta de sistema para garantia do processo de esterilização**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. Universidade Federal de Santa Catarina. 2004. 74p.

RIGHETTI, Carlos, C.; VIEIRA, Paulo César Gomes. Autoclave: aspectos de estrutura, funcionamento e validação. **RESBCAL**. v.1, n.2, p.185-189, 2012.

SILVA, F.P.L.; ROCHA, A.; ALMODOVAR, A.A.B.; BUGNO, A. Indicadores biológicos: segurança no processo de esterilização. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**. V.244, n. 1, p. 21-22. 2014.

TIPPLE, A.F.V., VIEIRA, P. F., VIEIRA, T. G. S., & SOUSA M. D.. O monitoramento de processos físicos de esterilização em hospitais do interior do estado de Goiás. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v.45, p.751-757. 2011.

ELEIÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS PARA INCORPORAÇÃO DE CAFEÍNA PARA TRATAMENTO DE LIPODISTROFIA GINÓIDE

Julia Vila Verde Brunelli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
Araraquara – São Paulo

Maria Virgínia Scarpa

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
Araraquara – São Paulo

Flavia Lima Ribeiro Maccari

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
Araraquara – São Paulo

Tayara Luísa Paranhos de Oliveira Ribeiro de Almeida

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
Araraquara – São Paulo

ativo. A proposta deste trabalho foi manipular sistemas microemulsionados que apresentem a formação de estruturas líquido-cristalinas, aos quais será incorporada a cafeína (1,5%), para posterior avaliação da liberação e permeação cutânea. Desta forma, possibilitará a avaliação do sistema ideal para uso tópico e que tenha capacidade de promover a permeação e liberar o fármaco no tecido adiposo tendo os adipócitos como sítio de ação, em níveis terapêuticos relevantes e com baixos efeitos colaterais.

PALAVRAS-CHAVE: cafeína, microemulsão, cristal líquido, celulite.

ELECTION OF THE MICROEMULSION SYSTEMS FOR CAFFEINE INCORPORATION FOR TREATING GYNOID LIPODYSTROPHY

1 | INTRODUÇÃO

A crescente busca pela beleza tem chamado a atenção da indústria cosmética que vem buscando recursos de alta tecnologia para investir na melhoria da qualidade de seus produtos. Dentre os cosméticos mais procurados pelo consumidor estão os cremes para o tratamento da lipodistrofia ginóide (LDG) ou popularmente conhecida como celulite (MENOIA, 2011).

RESUMO: A lipodistrofia ginóide (LDG) popularmente conhecida como celulite desenvolve-se, entre outros fatores, devido ao alargamento das células adiposas e acúmulo de gordura. Em dermatologia, a cafeína é utilizada como uma substância lipolítica, tendo os adipócitos como sítio de ação. Sistemas microestruturados podem ser utilizados para melhorar a absorção e aumentar a eficiência terapêutica de fármacos. As microemulsões são consideradas como um sistema de transporte capaz de aumentar a permeação cutânea de fármacos quando comparada a outras formas farmacêuticas. Formulações que apresentam cristais líquidos geralmente possuem maior estabilidade e liberação controlada do princípio

A celulite se desenvolve devido ao crescimento das células adiposas, acúmulo de gordura; acúmulo de fluidos, devido a permeabilidade excessiva das paredes dos capilares; drenagem linfática insuficiente, que retarda a eliminação do excesso de fluidos; agrupamento das células adiposas, que ficam ligadas por fibras de colágeno e dificultam a circulação sanguínea; endurecimento das fibras de tecido conjuntivo, que contraem-se e puxam a pele para baixo (AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION, 2006). Tendo como resultado o aspecto irregular da pele.

Entre as inúmeras formulações mais complexas que permitem com que a liberação do fármaco seja mais direcionada e eficaz, temos as microemulsões. Estas são consideradas como um veículo capaz de aumentar a permeação cutânea de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos quando comparada a outras formas farmacêuticas (PEYREFITTE *et al.*, 1998). É preconizado que emulsões contendo cristais líquidos, que são considerados a terceira fase de uma emulsão, possuem uma estabilidade mais garantida (SANTOS *et al.*, 2004), e estes sistemas podem ser utilizados ainda para melhorar a absorção e aumentar a eficiência terapêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Entende-se que quando aplicados à produtos farmacêuticos e cosméticos, são capazes de encapsular o ativo, protegendo-o e mantendo assim a maior estabilidade, devido à alteração de viscosidade e coalescência (NESSEEM, 2001).

A fim de caracterizar-se as microemulsões obtidas, o diagrama de fases pode ser utilizado. Este, permite saber as proporções dos componentes, de forma rápida e simples, além de encontrarmos quais proporções nos revelam a formação de demais estruturas, como as fases líquido-cristalinas. Assim, encontra-se a região do diagrama que revela as melhores condições para incorporação do fármaco de interesse (FORMARIZ, 2004).

Partindo do princípio que em formulações cosméticas a cafeína é utilizada como uma substância lipolítica, tendo os adipócitos como sítio de ação (BOLZINGER *et al.*, 2008), esta maior estabilidade e direcionamento de um fármaco em microssistemas com fase líquido-cristalinas, permitiria uma ação mais eficaz e garantida da cafeína ao atingir aos adipócitos, quando utilizada para o tratamento da lipodistrofia ginóide, que possui atividade comprovada para o tratamento via tópica normalmente na concentração de 1 a 2% (HEXSEL *et al.*, 2005).

2 | OBJETIVOS

Preparar e Selecionar os melhores sistemas microemulsionados de acordo com o diagrama ternário de fase, em busca de um sistema ideal de uso tópico para o tratamento da lipodistrofia ginóide, utilizando a microscopia de luz polarizada com o intuito de encontrar cristais líquidos nos sistemas de interesse, a fim de manter maior estabilidade da cafeína quando incorporada. Aumentando assim, a eficácia do tratamento da lipodistrofia ginóide com penetração e direcionamento do ativo aos adipócitos de forma adequada.

3 | MATERIAS E MÉTODOS

Foram preparadas 49 microemulsões por mistura direta e padronizada, de fase oleosa (adipato de dibutila) e tensoativo (álcool etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP) previamente homogeneizados em tubos de vidro transparentes com aquecimento a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho aquecido, seguida pela adição de fase aquosa (água deionizada) com agitação, totalizando 2g cada. As concentrações de componentes para cada sistema foram definidas através do diagrama de fases. Após 24 horas da manipulação dos sistemas que permaneceram em repouso, avaliou-se cada um para sua caracterização e transcrição no digrama ternário de fases, para delimitação das diferentes regiões existentes. Para isto levou-se em conta a aparente viscosidade, e a partir dos resultados obtidos, apenas os sistemas classificados como viscosos transparentes, os quais possuem viscosidade adequada para uso tópico, foram observados em microscopia de luz polarizada, podendo diferenciar as estruturas e morfologia dos sistemas obtidos (FORMARIZ, 2004). Dentre estes, foram eleitos os que apresentavam fase líquida-cristalina através da microscopia para serem reproduzidos novamente com incorporação da cafeína.

Seguiu-se o mesmo preparo de mistura direta e padronizada de fase oleosa, tensoativo e a fase aquosa contendo a cafeína na concentração de 1,5%, previamente solubilizada na fase aquosa à 70°C e com a adição de benzoato de sódio na proporção de 1:1,

4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES.

Os 49 sistemas manipulados foram armazenados, e após 24 horas foram separados de acordo com suas características: sistema líquido transparente (SLT); sistema viscoso transparente (SVT); sistema viscoso opaco (SVO); sistema líquido opaco (SLO); separação de fase (SF). Como exemplificado na figura 1.



FIGURA 1: Fotografia de alguns sistemas microemulsionados obtidos durante o estudo, representando cada uma das características que foram definidas como método para identificá-los.

Com base nestas características e as suas diferentes concentrações de tensoativo, fase aquosa e fase oleosa, os sistemas foram então transcritos para o diagrama ternário de fases, como apresentado na figura 2, onde se observou a área de interesse de sistemas definidos como ideais para este estudo, os viscosos transparentes.

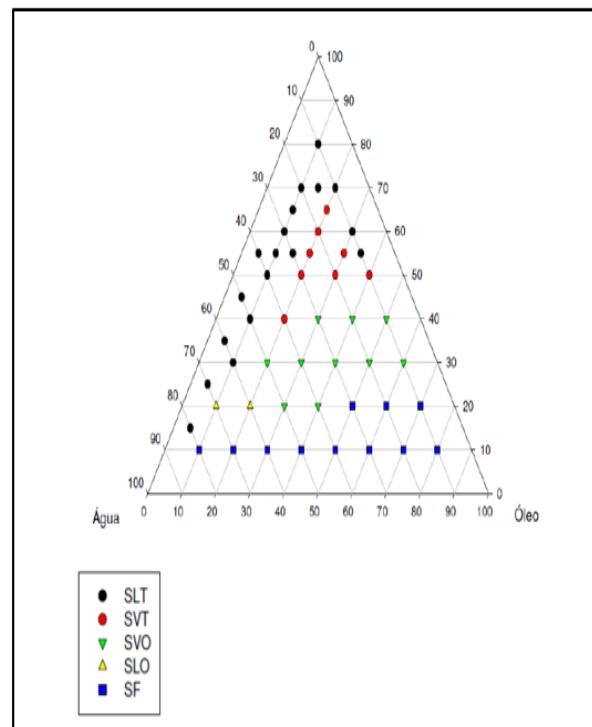


Figura 2: Diagrama Ternário de Fases

Cada sistema contido na área SVT, representados pela cor vermelha no diagrama, foi observado sob microscopia de luz polarizada, sendo esta uma forma utilizada para caracterizar a fase líquido-cristalina que está presente no sistema (TYLE, 1989).

Através da microscopia, determinamos a chamada isotropia óptica do sistema. Se observarmos um desvio do plano da luz, apresenta anisotropia, mas se a luz não for desviada é isotropia (FORMARIZ, 2004).

Foram encontrados 4 que possuíam fases líquidos-cristalinas. Obteve-se 3 sistemas de fase lamelar, tendo como característica principal as estruturas chamadas de “Cruz-de-malta” (FORMARIZ, 2004) e 1 sistema de fase hexagonal, ambas as fases são consideradas anisotrópicas (BRINON et al., 1998).

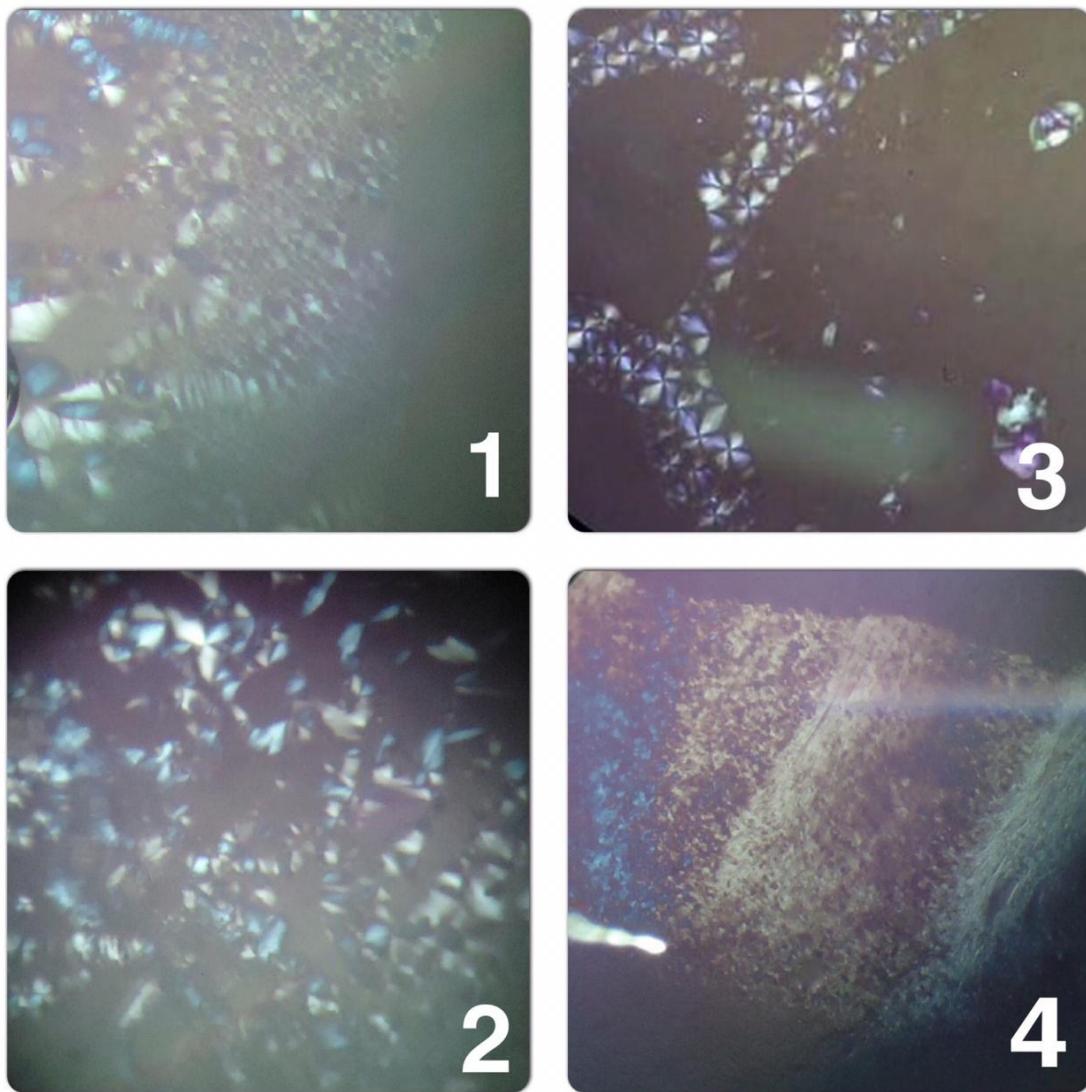


Figura 3: Fotomicrografias com luz polarizada das formulações. Onde, as representadas pelos números 1, 2 e 3 apresentam fase líquido-cristalina do tipo lamelar, confirmada pela presença das estruturas em Cruz-de-malta. E a representada pelo número 4 revela uma fase hexagonal.

Observou-se que, os sistemas que apresentaram as formações líquido-cristalinas, possuíam concentração de tensoativo igual ou superior à 50%, como apresentado na Tabela 1, sendo este um dos motivos da formação destas estruturas, pois quando presente estes agentes que são chamados de emulsificantes também, podem prevenir a coalescência e floculação da formulação, evitando a separação das fases (ANDRADE, 2008) e garantindo a alta estabilidade que é necessária no surgimento

destes sistemas. Como relatado também, que o aumento e variação das concentrações de tensoativos, revelam a formação de diferentes formas líquido-cristalinas, como as encontradas neste estudo, lamelares e hexagonais (GABBOUN *et al.*, 2001).

SISTEMAS	% TENSOATIVO	% ÁGUA	% ÓLEO
1. Lamelar	60	20	20
2. Lamelar	50	20	30
3. Lamelar	65	20	15
4. Hexagonal	50	40	10

Tabela 1: Concentração de tensoativo, fase aquosa e óleo de cada sistema.

5 | CONCLUSÃO

Selecionou-se o sistema de fase lamelar nº2, que além de apresentar maior estabilidade devido à uma espécie de camada protetora que são capazes de formar (BRINON *et al.*, 1998), este sistema também apresenta a fase lamelar, a qual foi relatado que pode aumentar a estabilidade física de sistemas, e é biocompatível (MAKAI *et al.*, 2003). Foi selecionado também o único sistema viscoso transparente de fase hexagonal, para poder avaliar e comparar a estabilidade de formulações contendo cristal líquido, quando compostas de uma fase lamelar ou fase hexagonal, assim como uma possível comparação do motivo de ter sido obtido dois sistemas com formações líquido-cristalinas diferentes mas com a mesma concentração de tensoativo.

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o sistema microestruturado desenvolvido e suas características organolépticas apresentam-se ideais para uso tópico. Ambos os sistemas serão avaliados posteriormente com 1,5% de cafeína para comparação em liberação e permeação *in vitro*, a fim de obter-se resultados mais satisfatórios a cerca das características dessas formulações.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SKINCARE e CELLULITE EXPERT ASSOCIATION. **Cellulite**. Disponível em: <http://www.celluliteexpert.com/index>.

ANDRADE, F. F. DE. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O / A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico**. Universidade de São Paulo, p. 151, 2008.

BOLZINGER, M. A. *et al.* **Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 68, p. 446-451, 2008.

BRINON, L; GEIGER, S; ALARD, V; TRANCHANT, J. F; POUGET, T; COURRAZE, G. **Influence of lamellar liquid Crystal structure on percutaneous diffusion of hydrophilic tracer form emulsion**. Jornal os Cosmetic Science, v. 49, p.1-11, 1998.

FORMARIZ, T.P., **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina**. Araraquara, 2004. P. 15-80. [Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. **Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin**. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

HEXSEL, D., ORLANDI, C., ZECHMEISTER, P. **Botanical extracts used in the treatment of cellulite**. Dermatol. Surg. v. 31, p. 867-872, 2005.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; EROS, I.; DÉKÁNY, I. **Preparation and structural determination of lyotropic lamellar liquid crystalline system with pharmaceutical importance**. Acta Pharmaceutica Hungarica, v.73, n.2, p.71-76, 2003a.

MENOIA, A. S., **Trabalho de Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética – UniFil**, 2011, disponível em http://www.unifil.br/portal/arquivos/publicacoes/paginas/2012/1/420_619_publipp.pdf

NESSEM, D. **Formulation and evaluation of itraconazole via liquid Crystal for topical delivery system**. J. Pharm. Biomed. Anal., v. 116, n. 6, p. 65-76, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.; FORMARIZ, T.P. **Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistemas de Liberação de Fármacos**. Quím. Nova, v. 27, p. 131-138. 2004.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral, Biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. p. 19-31.

SANTOS, O. D. H.; SACAI, F.; FERRARI, M.; ROCHA FILHO, P. A. **Liquid crystals in O/W emulsions with urea: development and testing**. Cosmetic and Toiletries, New York, v. 119, n. 12, p. 83-92, 2004.

TYLE, P. **Liquid crystals and their applications in drug delivery**. In: Rosoff, M. (ed) **Controlled release of drugs: polymers and systems**. New York, VCH, cap. 4, p. 125-162, 1989.

ESTATÍSTICA PARAMÉTRICA E NÃO PARAMÉTRICA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DO CAFÉ

Deusélio Bassini Fiorese

Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Coordenação do Curso Bacharel em Administração
Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo

Wilton Soares Cardoso

Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia de alimentos
Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo

Weliton Barbosa de Aquino

Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia de alimentos
Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo

Luzia Elias Ferreira

Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia de alimentos
Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo

Vinícius Serafim Coelho

Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia de alimentos
Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo

técnicas estatísticas paramétricas e não paramétricas para avaliar a atividade da amilase, durante 24 horas de fermentação, com o uso de culturas iniciadoras em grãos de cerejas Catuaí, provenientes de propriedades localizadas a 900 e 1200 metros no município de Venda Nova do Imigrante - ES. As cerejas foram descascadas, os grãos e polpa/hush foram separados e colocados em um tambor de 200 litros, contendo água, (20kg: 20kg: 20kg) e culturas iniciais de bactérias. Os tratamentos foram definidos pela adição de duas bactérias e o grupo controle, sem início de cultura. As atividades enzimáticas foram monitoradas a cada 03 horas. A reação foi interrompida pela adição de DNS e a liberação de açúcares redutores foi avaliada pelo método DNS, sendo a unidade de atividade enzimática definida como a quantidade de enzima liberando 1 µmol de glicose em 1 m sob as condições do teste. Os dados foram submetidos a testes preliminares de distribuição de probabilidade e homogeneidade de variâncias, identificando a necessidade do emprego de técnicas não paramétricas. Os testes revelaram que, a 900 m, há diferença entre os desempenhos dos tipos de fermentação e que o desempenho geral foi melhor nos processos mantidos até 12 h. Para a altitude de 1200 m não foram identificadas diferenças entre os tipos de fermentação, no entanto, foram formados cinco grupos de

RESUMO: Neste trabalho foram utilizadas

desempenho da atividade enzimática em função do tempo. Contudo, concluiu-se que as variações da atividade enzimática se comportam diferentemente em função da altitude e dos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Café, Amilase, Fermentação, Estatística

ABSTRACT: In this work, parametric and nonparametric statistical techniques were used to evaluate the amylase activity during 24 hours of fermentation with the use of starter cultures in Catuaí cherries grains from properties located at 900 and 1200 meters in Venda Nova do Immigrant - ES. The cherries were peeled, the grains and pulp / hush were separated and placed in a 200 liter drum containing water, (20kg: 20kg: 20kg) and initial cultures of bacteria. The treatments were defined by the addition of two bacteria and the control group, without beginning of culture. The enzymatic activities were monitored every 03 hours. The reaction was interrupted by the addition of DNS and the release of reducing sugars was evaluated by DNS method, the unit of enzyme activity being defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of glucose in 1 m under the conditions of the test. The data were submitted to preliminary tests of probability distribution and homogeneity of variances, identifying the need for non-parametric techniques. The tests revealed that at 900 m there was a difference between the performances of the fermentation types and that the overall performance was better in the processes kept up to 12 h. At the altitude of 1200 m no differences were identified between the fermentation types, however, five groups of performance of the enzymatic activity were formed as a function of time. However, it was concluded that the variations of the enzymatic activity behave differently according to the altitude and the treatments.

KEYWORDS: Coffee, Amylase, Fermentation, Statistics

1 | INTRODUÇÃO

A cafeicultura de montanhas exige esforços demasiados por parte dos produtores face ao relevo desfavorável impedindo uma mecanização apropriada, condições climáticas atuais atípicas e mão de obra escassa. O surgimento de mercados de cafés de qualidade trouxe expectativas ao pequeno agricultor, que mesmo em pequenas propriedades, nas condições supracitadas, vislumbra uma possibilidade de agregação de valor, utilizando técnicas que melhoraram a qualidade desse produto. Neste contexto, atualmente vem surgindo pesquisas sobre as variáveis que possam se associar à qualidade do café; qualidade essa, identificada pela opinião pessoal e experiência de degustação acumulada ao longo dos anos dos Q-Graders, como destacam Feria-Morales (2002); Alvarado & Linnemann (2010) e DiDonfrancesco et al. (2014), tornando-se uma tarefa muitas vezes complexa. Com o intuito de contribuir com as pesquisas nesta área, este capítulo traz um estudo sobre três diferentes métodos de fermentação de cafés cereja, fermentação natural ou espontânea, com a utilização da cultura starter de bactéria *Pediococcus acidilactici* CCT1622 (para fermentação com bactéria láctica) e outro com a cultura starter *Saccharomyces cerevisiae* (para

fermentação com levedura), com cafés provenientes de duas diferentes altitudes, 900 e 1200 metros, no qual foram avaliados a velocidade ou atividade enzimática da enzima amilase (U/mL). As atividades enzimáticas por cada método com fermentação foram comparação com o método controle ou fermentação natural, em que não é adicionado microrganismos starters no processo.

Em qualquer pesquisa, paralelo a identificação da população (grupo completo) de elementos associados a ela e, posteriormente a identificação das variáveis envolvidas, é de extrema importância a caracterização destas variáveis quanto a sua distribuição probabilística e a de seus parâmetros na população, uma vez que a conclusão para todo o grupo de elementos estudados (inferência) depende de uma confiança obtida por cada distribuição de probabilidade. Neste estudo, a variável “atividade enzimática” (U/mL) e o tempo de fermentação (h), são variáveis quantitativas e requerem uma verificação prévia de suas distribuições de probabilidade e homogeneidade de suas variâncias, a fim de compararmos seus comportamentos em diferentes tratamentos (métodos de fermentação) e altitudes.

Assim, os resultados que seguem trazem um panorama do produto de diferentes métodos de fermentação que podem caracterizar vantagens ou desvantagens, no que se refere a atividade enzimática como geração de voláteis ou compostos químicos, na formação de um café de qualidade.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

As atividades enzimáticas, referente as enzimas amilases, foram monitoradas a cada 03 horas. As atividades aparentes da amilase foram determinadas pela adição de uma alíquota do mosto de fermentação centrifugado (10000 rpm) a 1% de amido em tampão acetato de 0,2 M e pH 5,0, em uma reação a 40°C por 10 min. A reação foi interrompida e foi realizada a determinação da glicose ou dos açucares redutores liberados pelo método DNS (Miller, 1959) sendo a unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima liberando 1 µmol de glicose por minuto sob as condições do teste, sendo U/mL de mosto a unidade utilizada. O mosto é o meio líquido provenientes da fermentação dos cafés, nos diferentes métodos.

Estes dados foram analisados considerando o tempo de fermentação e a altitude, comparando-os entre métodos e controle. Para tanto, foram analisadas 3 repetições a cada 3 horas, sendo realizadas do tempo 0 minutos até 24 horas de fermentação, totalizando 27 repetições de cada tratamento (3 tratamentos) em duas altitudes diferentes (900 e 1200 m), totalizando 162 parcelas experimentais.

Os dados foram submetidos a testes preliminares de distribuição de probabilidade, como o Komolgorov Smirnov, e homogeneidade de variâncias como o Teste de Levene, identificando a necessidade do emprego de técnicas não paramétricas para a comparação dos métodos, como o Teste Kruskal Wallis – comparação múltipla das distribuições (equivalente à Análise de Variância nos casos paramétricos) e o

de Mann Whitney – comparação de distribuições duas a duas (equivalente ao Teste Tukey nos casos paramétricos). Nos casos em que o Teste de Kolmogorov Smirnov revelou normalidade dos dados e o Teste de Levene a homogeneidade de variâncias, simultaneamente, os métodos foram comparados pela ANOVA (Análise de variância) em um DIC (Delineamento Inteiramente ao Acaso) e as comparações dois a dois pelo Teste Tukey.

Além das comparações entre os métodos, foram utilizados modelos lineares e não lineares para explicar o comportamento de “atividade enzimática” (U/mL) em função do tempo de fermentação (h)

3 | RESULTADOS

A Distribuição de probabilidade da atividade enzimática (U/mL) tem características de assimetria à direita, influenciada pela altitude de 900 m (**Figura 1**), para a qual o teste estatístico de Kolmogorov Smirnov revelou Distribuição não Normal com $p=0,006$ de significância. Já para a altitude de 1200 m, o teste indicou normalidade dos dados a $p=0,313$ de significância e homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene, com $p=0,382$.

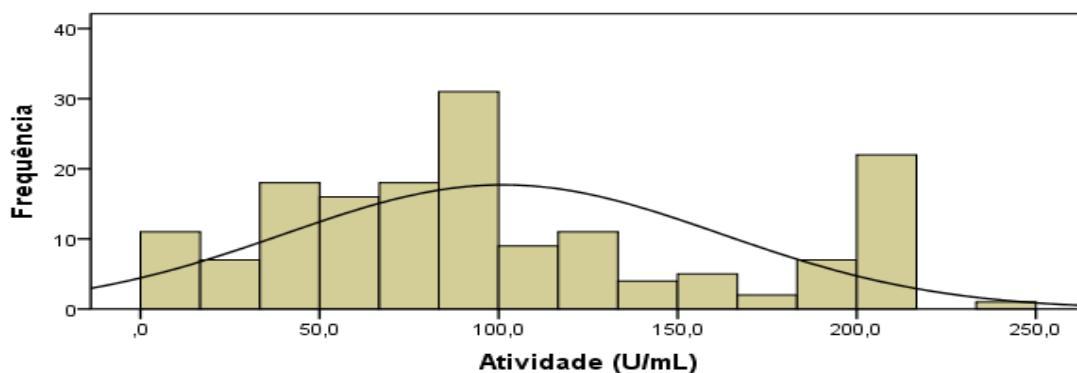


Figura 1: Distribuição da atividade enzimática nas altitudes 900 e 1200 metros

Sendo assim, para a altitude de 900 m utilizou-se técnicas estatísticas não paramétricas de comparação (*Teste de Kruskal Wallis para comparações múltiplas e teste de Mann Whitney para a comparação dois a dois*) tanto para o tipo de fermentação quanto para os tempos. Para a altitude de 1200 m foram utilizadas técnicas paramétricas de comparação (ANOVA para comparações múltiplas e Teste Tukey para a comparação dois a dois) e modelos de regressão linear e quadrático simples para o ajustamento da U/mL em função do tempo.

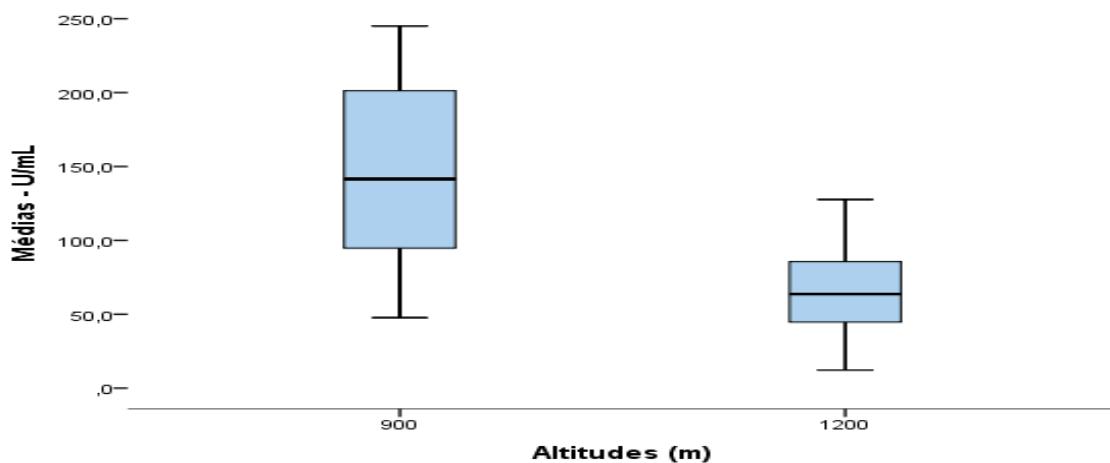


Figura 2: Comparação das atividades enzimáticas entre as altitudes.

O teste de Mann Whitney indicou diferença para a atividade (U/mL) entre as altitudes com $p=0,000$ de significância (**Figura 2**). Ou seja, na altitude de 900 metros há maior atividade enzimática, com media de 141,1 U/mL enquanto que na altitude de 1200 metros a atividade média é de 61,2 U/mL. Os respectivos desvios padrões, 56,8 e 31,3 U/mL, indicam uma dispersão relativa de 40,2% e 51,2% atribuindo à altitude de 1200 metros maior heterogeneidade das atividades, ou seja, atividades mais dispersas em relação à media quando comparadas às atividades da altitude de 900 metros.

3.1 Avaliação estatística dos cafés fermentados de altitude de 900 metros

Para a altitude de 900 metros, onde há maior atividade enzimática, o teste Kruskal Wallis revelou que há diferença significativa entre as distribuições das atividades para os diferentes tempos, com $p=0,000$.

Tempo	Média U/mL	Desvio Padrão	95% Intervalo de Confiança para média	
			Limite Inferior	Limite Superior
0	180,3	39,9	149,6	210,9
3	187,9	24,2	169,4	206,5
6	195,5	29,9	172,5	218,6
9	183,5	36,9	155,1	211,9
12	161,5	57,3	117,5	205,7
15	107,3	28,4	85,4	129,2
18	90,743	23,3427	72,800	108,685
21	83,467	22,2788	66,342	100,592
24	79,334	21,4763	62,826	95,842

Tabela 1: Descritivo das velocidades a 900 metros de acordo com os diferentes tempos.

Significa que pelo menos um tempo difere dos demais, sugerindo o teste de Mann Whitney para a comparação entre dois tempos quaisquer, possibilitando o diagnóstico de formação de grupos de diferentes tempos com atividades enzimáticas semelhantes.

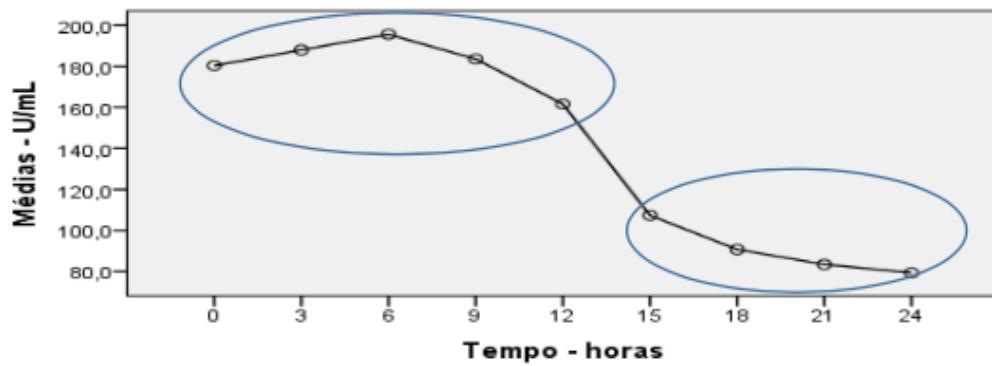


Figura 3: Médias das velocidades a 900 metros de acordo com os diferentes tempos.

O teste de Kruskal Wallis apontou não haver diferença entre as distribuições da U/mL para os tempos de 0 a 12 min, e entre as distribuições para os tempos entre 15 e 24 min, com $p=0,353$ e $p=0,07$, respectivamente (**Figura 3**). Para essa altitude, um modelo quadrático de ajustamento da U/mL em função do tempo:

$$f(T) = -0,156X^2 - 1,833X + 194,886$$

é significativo, com $p=0,000$, e com coeficiente de explicação de 60,7%. Isto significa que a atividade enzimática pode ser estimada pela equação obtida e que 60,7% das atividades enzimáticas podem ser explicadas por esta equação, de acordo com a variação do tempo. No entanto, a formação dos grupos de atividades até 12 h e acima de 12 h, sugerem modelos diferentes e mais precisos quando há interesse na estimativa da atividade em função do tempo.

3.1.1 Comparação entre os métodos de fermentação

Pela tabela 2 percebe-se que o tratamento Natural apresentou maior média de atividade com menor desvio padrão, quando comparado ao tratamento com Levedura. O tratamento com Bactéria láctea apresentou menor média de atividade. Os limites de confiança já dão uma ideia de que o tratamento com Bactéria Láctea difere dos demais, por ser disjunto dos demais. No entanto, estes fatos devem ser verificados por um teste de hipótese.

Métodos	Média de U/ mL	Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite Superior
Natural	162,9	50,0	143,2	182,6
Levedura	158,5	53,3	137,4	179,6
Bactéria Láctea	101,8	46,5	83,4	120,2

Tabela 2: Descritivo das velocidades a 900 metros em diferentes métodos de fermentação

Para os diferentes métodos de fermentação o teste de Kruskal Wallis indicou

haver diferenças entre as distribuições das atividades enzimáticas, com $p=0,000$. O teste de Mann Whitney, de comparação dois a dois, indicou não haver diferença entre as distribuições da atividade para as fermentações Natural e Levedura, com $p=0,789$ e indicou diferença entre os métodos de fermentação Natural e Levedura comparados com o método Bactéria Láctea, a uma significância de $p=0,000$ em ambas as comparações, como mostra a Figura 4.

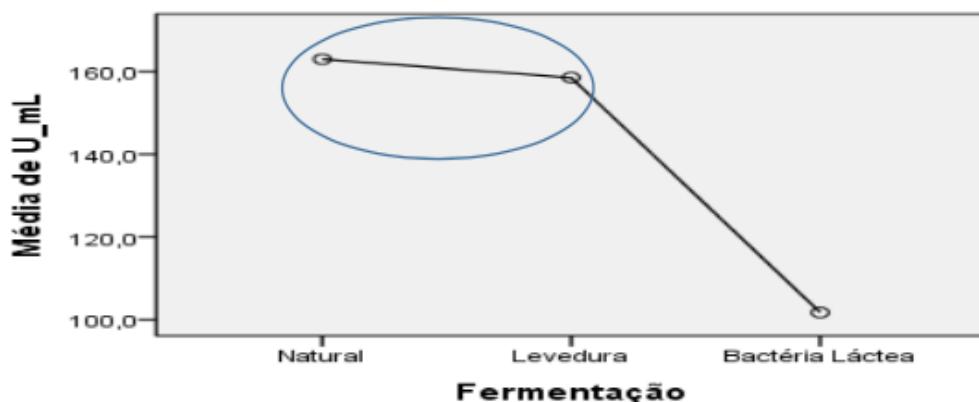


Figura 4: Médias das atividades em diferentes métodos de fermentação

Assim se confirma a menor atividade enzimática quando o café é submetido à fermentação com Bactéria Láctea as atividades são semelhantes quando submetido às fermentações Natural ou com Levedura.

3.2 Avaliação estatística dos cafés fermentados de altitude de 1200 metros

Para a altitude de 1200 metros a atividade enzimática apresentou Distribuição Normal de Probabilidade e homogeneidade entre as variâncias dos métodos, permitindo a comparação múltipla das médias pela Análise de Variância que revelou haver diferença significativa entre as médias das atividades para os diferentes tempos, com $p=0,000$.

Tempo	Média	Desvio padrão	95% Intervalo de Confiança	
			Limite Inferior	Limite Superior
0	100,8	11,0	92,3	109,2
3	101,8	16,3	89,2	114,3
6	83,8	4,0	80,7	86,9
9	76,4	1,3	75,3	77,4
12	59,2	8,7	52,5	65,9
15	49,8	0,9	49,1	50,5
18	45,2	0,9	44,5	45,9
21	14,5	1,3	13,5	15,5
24	19,1	3,2	16,7	21,6

Tabela 3: Descritivo das velocidades a 1200 metros de acordo com os diferentes tempos.

Isto significa que em pelo menos um dos tempos a média de atividade difere das médias nos demais tempos, sugerindo o teste Tukey para identificar possíveis grupos de médias iguais.

Tempo horas	Grupos obtidos, p = 0.05				
	Grupo1	Grupo2	Grupo3	Grupo4	Grupo5
21	14,5				
24	19,1				
18		45,2			
15		49,8	49,8		
12			59,2		
9				76,3	
6					83,8
0					100,8
3					101,8
Significância - p	0,920	0,925	0,169	0,461	1,000

Tabela 4: Grupos de tempos com médias de atividade iguais.

Os resultados do Teste Tukey revelam os tempos de fermentação em que as atividades enzimáticas se assemelham, como 21 e 24 h; 15 e 18h; 12 e 15h; 9 e 6h e por fim 0 e 3h, formando cinco grupos (**Figura 5**). Estes resultados mostram que é possível economizar tempo, uma vez que velocidades se igualam em diferentes tempos de fermentação.

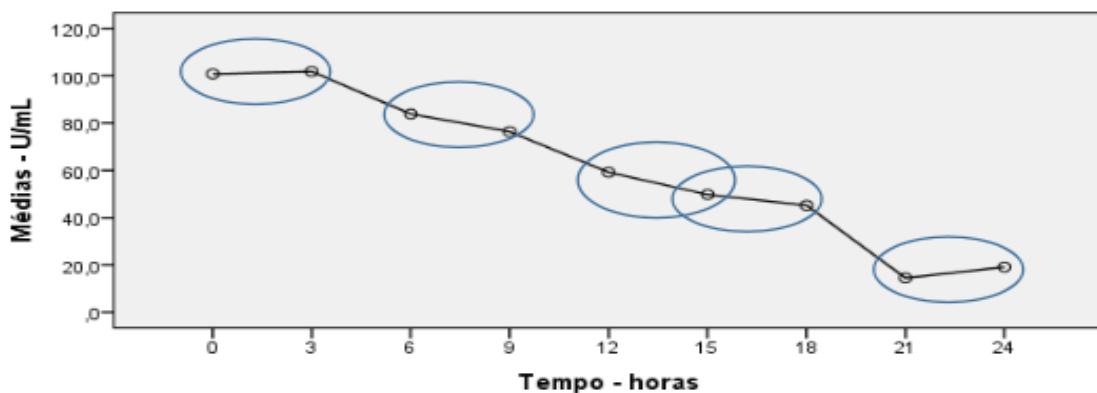


Figura 5: Médias das velocidades a 1200 metros de acordo com os diferentes tempos.

Para essa altitude, um modelo linear de ajustamento da atividade em função do tempo, como mostra a figura 3, e representado pela função $f(t)$

$$f(T) = -3,845X + 107,311,$$

que é significativo, com $p=0,000$, e com coeficiente de explicação de 91,4%. Ou

seja, a 1200 metros de altitude em 94,1% das vezes a atividade varia com o tempo de acordo com a função obtida. Essa função diz que para cada unidade variada no tempo a atividade enzimática varia 3,845 U/mL de forma negativa, ou seja, com o aumento do tempo a atividade diminui.

3.2.1 Comparação entre os métodos de fermentação

Para a altitude de 1200 metros não há diferença significativa entre os tratamentos, com $p=0,557$, obtido pela Análise de Variância, indicando não haver diferenças para a atividade enzimática (U/mL) entre os tipos de fermentação, formando um único grupo pelo teste Tukey.

Métodos	Média de U/ mL	Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite Superior
Natural	66,4	36,2	52,1	80,8
Levedura	59,4	29,1	47,9	70,9
Bactéria Láctea	57,7	28,7	46,3	69,0

Tabela 5: Descritivo das velocidades a 1200 metros em diferentes métodos de fermentação

Embora não haja diferença significativa entre as médias dos tratamentos, a dispersão relativa das médias, conhecida como Coeficiente de Variação, revela que a fermentação com Levedura apresenta atividades mais homogêneas, ou seja, com menores dispersões em relação à média.

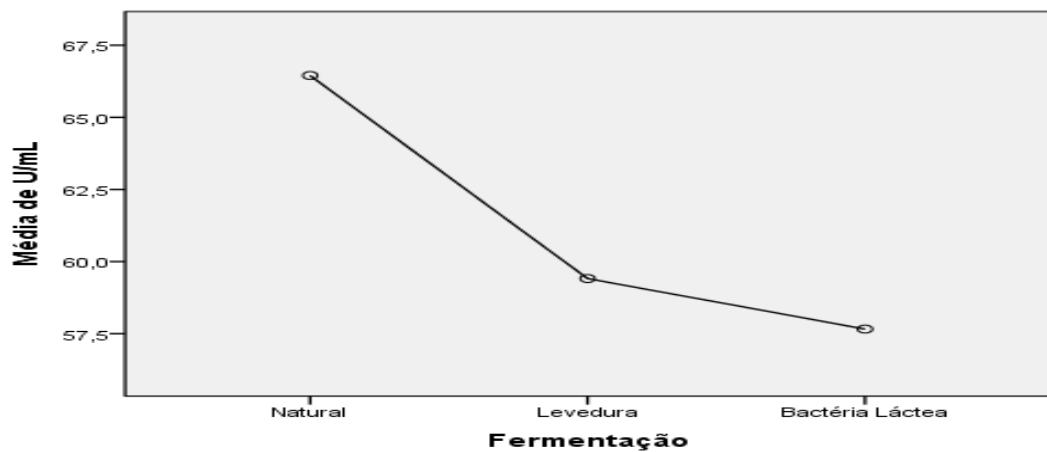


Figura 6: Médias das atividades em diferentes métodos de fermentação

Assim, para a altitude de 1200 metros os métodos de fermentação não diferem entre si pela média das atividades, indicando não haver preferências quando o interesse for a atividade enzimática.

4 | CONCLUSÃO

Há diferença significativa das atividades enzimáticas entre as altitudes de 900 e 1200 metros. Na altitude de 900 metros há diferença significativa da atividade enzimática entre os tempos. O modelo quadrático é o que melhor ajusta a atividade em função do tempo e sugere seu decréscimo ao longo do tempo, embora haja uma elevação até o período de 6 horas de fermentação, a partir do qual inicia-se a redução da atividade. Nesta altitude o método Natural e o com Levedura são equivalentes em relação à atividade, diferindo-se do tratamento com Bactéria Láctea, que apresentou menor atividade. Na altitude de 1200 metros também há diferença significativa das atividades entre os tempos de fermentação, porém estas diferenças ocorrem de forma linear e decrescente conforme o tempo aumenta. No entanto, não há diferença entre os métodos de fermentação, destacando-se maior homogeneidade das atividades para o método de fermentação com Levedura.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, R. A, LINNEMANN, A. R. (2010). **The predictive value of a small consumer panel for coffee-cupper Judgment**. British Food Journal, Vol. 112 No. 9, pp. 1023-1032.
- DI DONFRANCESCO, B. D., GUZMAN, N. G. CHAMBERS, E. (2014). **Comparasion of results from cupping and descriptive sensory analysis of Colombian brewed coffee**. Journal of Sensory Studies, ISSN 0887-8250.
- MILLER, G.L. (1959). **Uso de Reagente Ácido Dinitrosalicílico para Determinação de Açúcares Redutores**. Analytical Chemistry, 31 (3), 426-428.
- SIEGEL, S .; CASTELLAN, N. J. **Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento**. Bookman. 2a. Edição.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE PRE-TREATED BY ALKALINE SOLUTION IN FLUIDIZED BED REACTOR

Felipe A. F. Antunes

Engineering School of Lorena , University of São Paulo - Lorena – São Paulo

Guilherme F. D. Peres

Engineering School of Lorena , University of São Paulo - Lorena – São Paulo

Thaís. S. S. Milessi

Federal University of São Carlos – São Carlos

Letícia E. S. Ayabe

Engineering School of Lorena , University of São Paulo - Lorena – São Paulo

Júlio C. dos Santos

Engineering School of Lorena , University of São Paulo - Lorena – São Paulo

Silvio S. da Silva

Engineering School of Lorena , University of São Paulo - Lorena – São Paulo

enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pre-treated by alkaline solution in fluidized bed reactor. Biomass was pretreated in bioreactor by fluidization conducted by recirculation of sodium hydroxide solution. After hydrolysis, solid portion was washed, dried and submitted to enzymatic saccharification. Results showed that enzymes could act significantly better in the pre-treated material, compared to a non pre-treated raw material, presenting hydrolysate of 9,51 g/L of xylose and 21,4g/L of glucose .

KEYWORDS: *sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, alkaline pretreatment, fluidized bed reactor.*

1 | INTRODUCTION

In Brazil, sugarcane bagasse (SB) is one of the most generated lignocellulosic material, due to the high production of alcohol and sugar industries, that use sugarcane juice as raw material. In last years, Brazil has produced around 680 million tons of SB annually (Conab 2015). Once this material is composed mainly by cellulose, hemicellulose and lignin, it can be used as carbon source in fermentative process. However, recalcitrance of biomass is one of the challenges to be studied in order to release fermentable sugars of its composition. Cellulose is a polymer composed by glucose, linked by

ABSTRACT: Alkaline pretreatment is an efficient method that solubilize lignin of biomass, becoming a more accessible material to the action of enzymes that could breakdown remaining polymeric carbohydrates of its content in fermentable sugars, for use, e.g., as carbon source in bioprocess. Moreover, in Brazil, sugarcane bagasse is one of the most generated lignocellulosic material, due to the high production of alcohol and sugar industries that use sugarcane juice as carbon source. Within this context, this work presents

β (1 \rightarrow 4)-glycosidic bonds, while hemicellulose is a heteropolysaccharide composed by different compounds such as hexoses and pentoses sugars such as xylose, L-arabinose, besides some organic acids. Lignin, the third most abundant fraction is a complex aromatic compound, formed mainly by three phenyl-propane alcohols, such as p-coumarilic, coniferilic, and synapilic (Canilha et al., 2012). Different pre-treatment of biomass, such as physical, chemicals and biological methods can be carried out to separate these three main contents of biomass. For example, alkaline pre-treatment of lignocellulosic material is a method that removes high portion of lignin from biomass, providing a liquid fraction of lignin, and a remaining solid composed by cellulose and hemicellulose, called holocellulose (Alvira et al., 2010). However, fermentable sugars such as glucose and xylose are already in polymeric fraction of holocellulose. Thus, one strategy is the submission of this material to an enzymatic hydrolysis, where enzymes could cleave these polymers in monomeric sugars (KUMAR et al., 2009). We highlight that the importance of preliminary stage of delignification that promotes better accessibility of enzymes into biomass, enhancing enzymatic digestibility (Chandel et al., 2014). However, novel and differentiated strategies to enhance process yields must be investigated in more details. For example, process conducted in column reactors usually presents high efficiency (Sarrouh and Silva, 2013). Column reactors, operated in fluidized bed configuration promotes high homogenization of its content just by recirculation of fluids, without requirement of mechanical agitators or impellers, that need high energy demand, increasing process costs. Within this context, in this work, SB was conducted to alkaline pre-treatment mediated sodium hydroxide solution in fluidized bed reactor. After hydrolysis, solid portion was separated and submitted to enzymatic hydrolysis by using a complex of cellulase enzymes.

2 | MATERIAL AND METHODS

Alkaline pre-treatment of sugarcane bagasse (kindly provided by Usina Vale Onda Verde, located in Onda Verde-SP) was carried out by using fluidized bed reactor of 2.0L (PID Fermenter AWS - Bioengineering AG, Wald, Switzerland). Bed of reactor was filled with 30 g of milled sugarcane bagasse (14-20 Mesh) and solution of 0,1M of sodium hydroxide was recirculated in flow of 1600 mL/min by 90 min at 90 °C. After hydrolysis, solid portion was separated by solubilized lignin by filtration. Remained solid portion was washed and dried at 60°C.

Enzymatic hydrolysis was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks, containing 3 g of crude raw material or pre-treated sugarcane bagasse, 50 mL of citrate buffer (50 mM, pH 4.8), 0.10 g of surfactant Tween 20 and 20 FPU of cellulase complex (Cellulase CP CONC) from the Dyadic. Experiments were conducted by 72h in at 50°C at 150 rpm in an incubator shaker (Innova 4000; New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA).

The content of glucose and xylose in the enzymatic hydrolysate were verified by high performance liquid chromatography (HPLC) (chromatograph Schimadzu LC-

10 AD (Kyoto, Japan) with column equipped with BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) coupled to refractive index detector (RID-6A), with 0.01 N sulfuric acid as an eluent at a flow rate of 0.6 mL/min, column temperature of 45°C). For these analysis, samples were previously filtered through Sep Pak C18 filter.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Sugarcane bagasse pre-treated by alkaline solution in fluidized bed reactor and crude raw material were submitted to enzymatic hydrolysis. The content of both enzymatic hydrolysate after 72h of saccharification are presented in figure 1.

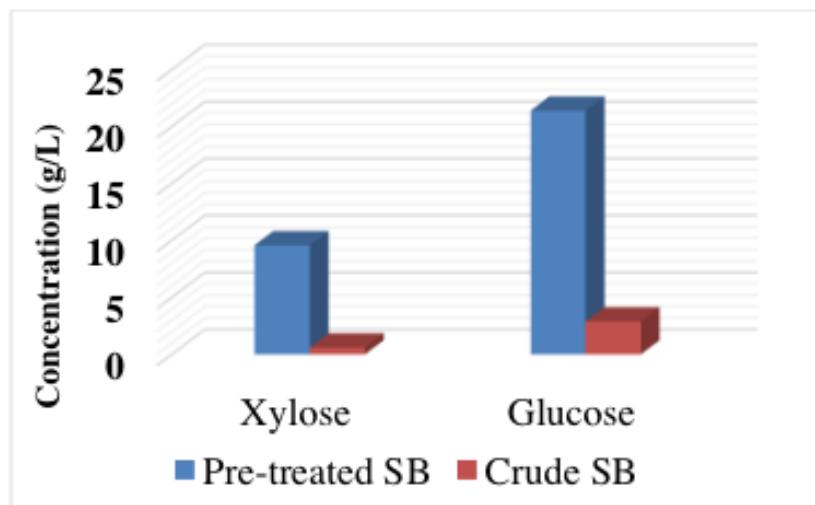


Figure 1. Concentration of xylose and glucose of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pre-treated by alkaline solution in fluidized bed reactor and crude raw material

Results showed that hydrolysate of alkaline pre-treatment material in fluidized bed reactor presented 21,4 g/L and 9,51 g/L of glucose and xylose, respectively, while crude raw material showed just 2,8 g/L and 0,6 g/L for these same sugars. Pre-treatment enhanced enzymatic digestibility, where it was achieved around 7.5 times more glucose releasing in pre-treated SB than crude raw material. Moreover, xylose, a C5 sugar, was also released around 16 times more, by the same comparing. Releasing of C5 sugars was probably due to hemicellulase content in the cellulase complex used. The requirement of a pre-treatment for enhance enzymatic digestibility is reported by different authors. For example, by working in Erlenmeyer flasks, Chandel et al. (2014) reported less sugars recovery of cellulignin from sugarcane bagasse when compared to the same sample mediated by alkaline solution (NaOH (1% m/v) at 121°C for 1 hour). In addition, Chandel et al., (2013) also presented 28.43 g/L of reducing sugars from saccharification of sugarcane bagasse pre-treated after soaking in concentrated aqueous ammonia (20% v/v ammonia solution, at 70°C; for 24 h after enzymatic hydrolysis). Moreover, Teran-Hilares et al., (2016), by using also column reactor, but in

packed bed flow configuration, conducted alkaline pretreatment for sugarcane bagasse delignification. In that work, authors reported lignin removal and hydrolysis of about 50% of cellulosic and 57% of hemicellulosic fractions of pretreated SB. Although authors have reported the efficiency of the process, new strategies and developments, such as use of column reactors in fluidized bed configuration must continue to be investigated in details, aiming to maximize process feasibility and increasing of enzymatic digestibility of biomass.

4 | CONCLUSIONS

Enzymatic hydrolysate of pre-treated sugarcane bagasse showed considerable sugars concentration than crude raw material without pre-treatment. This present work indicates the potential of use column reactor operated in fluidized bed configuration for enhancing of sugarcane bagasse digestibility for action of enzymes and optimization of glucose and other sugars releasing in enzymatic hydrolysate.

5 | ACKNOWLEDGMENTS

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – 154193/2018-6, Universal Project 483294/2013-6) FAPESP (Process 2014/27055-2) (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p.4851-6, 2010.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; ANJOS, V.; BELL, M.J.B.; RODRIGUES L.N.; SINGH, O.V.; ROSA, C.A.; PAGNOCCA, F.C.; DA SILVA, S.S. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, p. 1-15, 2013.
- CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; ANJOS, V., BELL, M.J.V.; RODRIGUES, L.N.; POLIKARPOV, I.; DE AZEVEDO, E.R.; BERNARDINELLI, O.D.; ROSA, C.A. PAGNOCCA FC, DA SILVA, S.S. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, p. 63, 2014.
- CONAB – National Supply Company, Monitoring of the Brazilian harvest, Brazilian Supply Ministry (Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, Ministério do Abastecimento – Brasil), Available from: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/>

KUMAR, P.; BARRET, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Chemical Engineering Research**, v. 48, p. 3713-29, 2009.

SARROUH, B.; DA SILVA, S.S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, doi: 10.1007/s12010-013-0127-0., 2013.

TERÁN-HILARES, R.; RESÉNDIZ, A.L.; MARTÍNEZ, R.T.; SILVA S.S.; SANTOS, J.C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries, **Bioresource Technology**, v. 203, p.42-49, 2016.

ESTUDO DESCRIPTIVO SOBRE O USO DE FOLHAS DA BATATA-DOCE E POTENCIAL PARA REDUÇÃO DE EFEITOS OXIDATIVOS

Thaís Cristina Coelho de Ornelas Salasar
Roberta Cattaneo Horn
Rodrigo Fernando dos Santos Salazar
Diego Pascoal Golle
Jana Koefender
Andreia Quatrin
Carolina Peraça Pereira Regis

DESCRIPTIVE STUDY ON THE USE OF SWEET POTATO LEAVES AND POTENTIAL FOR REDUCTION IN OXIDATIVE EFFECTS

Muitos estudos apontam a relação da alimentação com o desenvolvimento de algumas doenças crônicas, ligadas, em especial, ao estresse oxidativo, como: câncer, diabetes, obesidade, hipertensão, entre outros. Assim, é grande a importância dos alimentos e de uma dieta equilibrada e saudável para a manutenção e qualidade de vida.

Deste modo, a frase: “*Faça de seu alimento o seu medicamento*”, afirmada por Hipócrates no milênio passado, ganha local de interesse nos dias atuais, uma vez que os alimentos funcionais, em especial, desempenham o papel não apenas de nutrir, mas também, de agregar benefícios à saúde, haja vista que, pesquisas apontam que o uso desses alimentos pode

diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo e, desempenhar um papel positivo sobre a saúde humana.

Assim, o consumo e importância da batata-doce no contexto humano se tornam evidente quando consideramos nossa exigência nutricional e a conveniência de sua utilização como suplemento nutricional na dieta de diversos povos, inclusive os carentes (LEITE, 2017).

Neste sentido, observa-se que a batata-doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam*), um alimento produzido em todo Brasil, constitui um recurso natural renovável, com indicativo etnográfico medicinal, que pode diminuir a pressão sobre as substâncias de síntese química com interesse na alimentação e saúde (JOSÉ, 2015). E também, pode-se afirmar que as batatas-doces são boas fontes de minerais, especialmente por serem ricas em potássio, sendo que o genótipo deste alimento, exerce influência sobre a concentração do seu conteúdo (VIZZOTTO et al., 2018).

Além disso, a batata-doce varia com relação a cor, quantidades de carotenóides, antocianinas e ácidos fenólicos, chamando bastante atenção pela presença desses constituintes antioxidantes que podem ser importantes em várias doenças degenerativas,

onde se evidencia a ocorrência de estresse oxidativo (EO), conforme afirmam Kim et al. (2015).

O EO é definido como uma perturbação do equilíbrio entre componentes pró-oxidantes e antioxidantes, em que, a elevação da concentração de espécies altamente reativas geram efeitos deletérios em lipídeos, proteínas e DNA, que podem ir desde o desregulamento de rotas metabólicas, até na morte celular (LIU et al., 2017). Assim, alguns a batata-doce, podem contribuir em estudos relacionados à melhora da atividade antioxidante, frente a algumas patologias. Ademais, a utilização desse tubérculo na alimentação humana não se refere apenas ao consumo das raízes, tendo em vista que as folhas, são excelentes fontes de proteína, glicídios, cálcio, fósforo e ferro, além de vitamina A e vitamina C (JOSÉ, 2015).

Além disso, dentre os diversos compostos fitoquímicos presentes nas folhas de batata-doce, os que possuem maior atividade biológica são os compostos fenólicos (ISLAM, 2014). Pesquisadores como Dumitriu et al. (2015), afirmam que os compostos fenólicos desempenham importante papel na proteção celular, pois são capazes de sequestrar ou inibir as ERs, ativar enzimas antioxidantes e inibir enzimas oxidases, desempenhando forte ação na prevenção do dano oxidativo, apontado como causa de algumas doenças, como arteriosclerose, diabetes e doenças neurodegenerativas (ASADI et al., 2010).

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA BATATA-DOCE

A batata-doce é uma excelente fonte de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos que incluem ácidos fenólicos e antocianinas, carotenoides e tocoferóis. Estes compostos bioativos atuam como neutralizadores de ERs e suas concentrações variam conforme as cores das cultivares (PARI, 2015). Mosca et al. (2017), mostraram que as antocianinas poderiam inibir a injúria oxidativa de células do endotélio em virtude das suas estruturas, tendo assim um efeito protetor contra a oxidação do LDL.

Além de amidos simples, batata-doce é rica em carboidratos complexos como fibra dietética, minerais como potássio e fósforo, vitaminas como a tiamina, vitamina A, betacaroteno, vitamina B2, vitamina C e vitamina E e compostos antioxidantes. A raiz, no entanto, não contém gorduras saturadas ou colesterol (MOHANRAJ & SIVASANKAR, 2014). A composição química da batata-doce varia com o cultivar, condições climáticas, época da colheita, tratos culturais, duração e condições de armazenamento (VIZZOTTO et al., 2018)

Pesquisadores como Miyazaki et al. (2008), avaliaram o potencial protetor das antocianinas da batata-doce roxa, da cultivar *Ayamurasaki* (Antocyanins Purple Sweet Potato - APSP), contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) *in vitro* e o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em ratos com deficiência de apolipoproteína

E., onde foi dada uma dieta enriquecida com colesterol e gordura, com e sem 1% de APSP, adicionado por 4 semanas na dieta de camundongos com 6 semanas de idade. As antocianinas da APSP foram capazes de aumentar a resistência da LDL à oxidação, comparado ao ácido L-ascórbico. Os animais que receberam a dieta suplementada com antocianinas da batata-doce roxa apresentaram uma redução nas lesões ateroscleróticas (45%), nos níveis de TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico) no fígado e nos níveis plasmáticos de VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular). Porém, o APSP não demonstrou efeito no perfil lipídico no plasma e no fígado.

EFEITOS DO CONSUMO DE FOLHAS DE BATATA-DOCE SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Alguns estudos têm apresentado o efeito do consumo das folhas de batata-doce sobre o estresse oxidativo. Pesquisas têm demonstrado que as folhas da batata-doce são compostas por combinações químicas que atuam, beneficamente sobre o metabolismo de outros organismos, em especial o humano (XU et al., 2010; UDEM et al., 2011). Os compostos fenólicos estão entre as diversas substâncias presentes nas folhas de batata-doce, sendo estas, as que possuem o maior número de atividades biológicas (SONG et al., 2011). Estes compostos pertencem a um grupo diversificado de substâncias, que têm como principais representantes os flavonoides, metabólitos secundários que desempenham diferentes papéis na ecologia das plantas (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) e potenciais benefícios para a saúde.

Pesquisadores avaliaram a composição nutricional de folhas de 40 cultivares de batatas-doce chinesas, as quais contém uma série de nutrientes e compostos bioativos presentes, sugerindo que as folhas de batata-doce deveriam ser consumidas como vegetais de folhas, especialmente por povos que apresentam problemas de desnutrição (SUN et al., (2014).

Segundo Maluf (2003), por unidade calórica, as folhas de batata-doce superam em teor de proteína até mesmo do feijão, uma das principais fontes proteicas da população brasileira. Têm um valor alimentício semelhante ao das folhas de mandioca (porém, sem cianogênicos) e são bem aceitas como complemento alimentar, como as multimisturas, utilizadas por Pastorais, como a da Criança e outras organizações não governamentais.

Deste modo, segundo Huber e Rodriguez-Amaya, (2008), os compostos fenólicos presentes nas folhas da batata-doce se configuram como bons antioxidantes, capazes de sequestrar radicais livres e, dependendo das variedades e condições de crescimento, comparando as folhas desse tubérculo às do espinafre, em nutrientes, tais como vitaminas e minerais.

Na tabela 1 estão elencados a composição centesimal e valor energético das

folhas de batata-doce e mandioca, comparadas com grãos crus ou cozidos de feijão comum.

Composição	Batata doce (Folhas secas)	Mandioca (Folhas secas)	Feijão preto (Cozido)	Feijão preto (Cru)
Calorias (em 100g) ⁽¹⁾	49,00	91,00	84,80	343,60
Glicídios (g/100g) ⁽¹⁾	10,20	18,30	14,28	62,37
Proteínas (g/100g) ⁽¹⁾	4,60	7,00	6,00	20,74
Lipídios (g/100g) ⁽¹⁾	0,20	1,00	0,42	1,27
Cálcio (mg/100g) ⁽¹⁾	158,00	303,00	46,00	145,00
Fósforo (mg/100g) ⁽¹⁾	84,00	119,00	98,00	471,00
Ferro (mg/100g) ⁽¹⁾	6,20	7,60	2,40	4,30
Glicídios (g/100 cal) ⁽²⁾	20,82	20,11	16,84	18,15
Proteínas (g/100g) ⁽²⁾	9,39	7,69	7,08	6,04
Lipídios (g/100 cal) ⁽²⁾	0,41	1,10	0,50	0,37
Cálcio (mg/100 cal) ⁽²⁾	322,45	332,97	54,25	42,20
Fósforo (mg/100 cal) ⁽²⁾	171,43	130,77	115,57	137,08
Ferro (mg/100 cal) ⁽²⁾	12,65	8,35	2,83	1,25

Tabela 1- Comparação dos teores minerais, proteico, lipídico e calórico fornecidos pelo consumo de 100 g da folha de batata-doce em relação ao consumo de 100 g de folhas secas de mandioca, feijão preto cozido e feijão preto cru.

⁽¹⁾ Nutrição-Composição química e valor energético dos alimentos, (MALUF, 2003).

⁽²⁾ Dados calculados com base em unidades calóricas.

Em estudo sobre os principais compostos presentes nas folhas da batata-doce, SUN et al. (2014), examinaram folhas de 40 espécies, analisando, entre outros compostos, Proteína bruta, Fibra, Gordura, Carboidratos, Energia bruta, Cinzas, Macro e Micronutrientes, Polifenóis Totais e Atividade antioxidante. Na tabela 2, os autores relataram as variações de compostos presentes nas Folhas de Batata-doce analisadas:

Teor de compostos nutricionais presentes nas folhas de Batata-doce (FBD)	Variação de Compostos nutricionais presentes nas FBD
Proteína Foliar	16,69 a 31,08g 100g (peso seco:p.s)
Fibra bruta	9,15 a 14,26g 100g-1 p.s
Gordura	2,24 a 5,23 g 100g-1 p.s
Micronutrientes: Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn, Zn e Cu	Variação de quantidade significativa, de cultivar a cultivar
Potássio (K)	1625,1mg 100g-1 p.s.)
Compostos Fenólicos	Antioxidantes de maior importância
Polifenóis	12,46g 100g-1 d.b*

Tabela 2- Teor e variação de compostos nutricionais presentes nas folhas de Batata-doce

*Baseado no método de Folin-Ciocalteu usando ácido clorogênico como padrão, que se correlaciona com atividades antioxidantes de $1,28 \pm 0,07 \mu\text{g}$ de Trolox equiv / mg, d.b. com base no método ORAC.

Fonte: Adaptado de Akoeley et al. (2017).

Sendo assim, Sun et al. (2014), observaram que as folhas de batata-doce continham quantidades consideráveis de compostos fenólicos 5-O-cafeoilquínico ácido 3-O-cafeoilquínico, 4-O-cafeoilquínico ácido, ácido cafeico; ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, 3,5-diO-cafeoalquínico ácido, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, e ido 3,4,5-tri-O-cafeoilquino. Em comparação com os vegetais tradicionais, as folhas de batata-doce contêm concentrações de polifenóis comparáveis ao espinafre e ao brócolis.

Desse modo, de acordo com Xu et al. (2010), o teor de luteína (31,5-42,6mg 100g-1p.s.) da variedade *Suioh* de batata-doce excedeu o teor de luteína de 120 outras frutas e vegetais, sendo que a luteína é um carotenóide de cor amarela à laranja, responsável por proteger a mácula da retina humana dos comprimentos de ondas nocivos e por eliminar espécies reativas de oxigênio. Portanto, folhas de batata-doce merecem consideração como um alimento desejável para a prevenção de doenças oculares, ademais, a luteína contida nas folhas de batata-doce pode ser potencialmente utilizada como substituto da tartrazina (AKOETEY et al., 2017).

Também em análises, Antial et al. (2006), verificaram que os níveis de alguns nutrientes de batata-doce foram determinados usando métodos analíticos padrão e os resultados revelaram que as folhas contêm baixos níveis de substâncias tóxicas, (exceto o oxalato, o qual pode ser reduzido pelo cozimento), e uma quantidade apreciável de nutrientes, vitaminas e elementos minerais, devendo ser incluídas em dietas para suplementar o subsídio diário necessário para o corpo humano.

Algumas pesquisas têm demonstrado que as folhas da batata-doce são compostas por combinações químicas que atuam, beneficamente sobre o metabolismo de outros organismos, em especial o humano (XU et al., 2010; UDEM et al., 2011). Os compostos fenólicos estão entre as diversas substâncias presentes nas folhas de batata-doce, sendo estas, as que possuem o maior número de atividades biológicas (SONG et al., 2011). Estes compostos pertencem a um grupo diversificado de substâncias, que têm como principais representantes os flavonoides, metabólitos secundários que desempenham diferentes papéis na ecologia das plantas (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) e potenciais benefícios para a saúde.

Assim, o teor médio de minerais em uma cultivar desenvolvida recentemente ('*Suioh*') por Islam (2014), apresenta em torno de 117 mg de cálcio, 1,8 mg de ferro, 3,5 mg de Caroteno, 7,2 mg de vitamina C, 1,6 mg de vitamina E e 0,56 mg de Vitamina K para cada 100g de peso fresco das folhas. Níveis de ferro, cálcio e caroteno estão entre os primeiros, comparado com outros vegetais.

A literatura etnofarmacológica registra o uso do chá das folhas para aumentar a lactação, sendo o tipo "amarelo" especialmente aquele de polpa cor de abóbora detentor de β-caroteno em teor superior ao encontrado em cenoura, sendo seu uso recomendado como alimento-remédio e indicado contra a deficiência de vitamina A (JOSÉ, 2015).

Neste sentido, Silva et al. (2010), realizaram um estudo sobre o uso de plantas

medicinais em saúde bucal e observaram que a batata-doce foi a planta com o maior número de indicações de uso em saúde bucal. Usada em extrações dentárias, dor de dente, feridas na boca, hemorragia, abscessos, gengiva inflamada e aftas; utilizada também para alteração na cavidade oral, combater gengivites, pulpites, dor de dente e aftas, além de evitar a reprodução de bactérias cariogênicas.

Também em estudo sobre a atividade antioxidante das folhas de batata-doce, Salasar (2018), avaliou a capacidade antioxidante de extratos de folhas de algumas espécies em um modelo de células humanas expostas ao herbicida 2,4-D, *in vitro*, através da medida dos níveis de lipoperoxidação e Glutatona reduzida. Neste estudo as espécies de folhas de batata-doce utilizadas eram oriundas da CNPH-EMBRAPA, Brasília e outras de produtores rurais do Rio Grande do Sul. Neste estudo foi observado um aumento nos níveis de GSH (Glutatona reduzida), indicando efeito benéfico dessas espécies de batatas, em termos de prevenção, já que com o aumento da GSH, aumenta-se o potencial antioxidante, frente a possíveis elevações nas produções de espécies reativas que, quando não neutralizadas, desencadeiam o estresse oxidativo.

Por outro lado, também foi verificado o aumento dos níveis dos danos lipídicos em duas espécies estudadas (BRS Cuia e BRS Coquinho), mesmo com um significativo aumento da GSH, sendo evidenciada também, a presença de hemólise nos testes *in vitro* realizados.

Dessa forma, observa-se que mesmo com toda riqueza de nutrientes e importantes níveis de polifenóis e carotenóides, os quais podem ser usados como antioxidantes e também, como corantes alimentícios e farmacêuticos, alguns indicativos apontam para a importância de se verificar todos os possíveis modos de toxicidade, pois como neste estudo, a folha pode apresentar fatores positivos como conter fitoquímicos, aumentar a GSH, mas também pode desenvolver lipoperoxidação e hemólise, podendo desencadear doenças graves como a anemia hemolítica.

REFERÊNCIAS

- AKOETEY, W.; BRITAIN, M M; MORAWICKI, R O. **Potencial para utilização de subprodutos do cultivo e processamento de batata-doce.** Ciência Rural, Santa Maria, v.47: 05, e20160610, 2017.
- ANTIAL, B. S.; AKPANZ, E. J.; OKONL, P. A.; UMORENL, I. U. **Nutritive and anti-nutritive evaluation of sweet potatoes.** Pakistan Journal of Nutrition, v. 5, n. 2, p. 166-168, 2006.
- ASADI S.; AHMADIANI A.; ESMAEILI M A.; SONBOL A.; ANSARI, N; KHODAGHOLI F. **In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, n. 5, p. 1341-1349, 2010.
- DUMITRIU, D.; PEINADO, R. A.; PEINADO, J.; LERMA, N. **Grape pomace extract improves the *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes.** Journal of Functional Foods, v. 17, p. 380-387, 2015.
- HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108,

2008.

ISLAM, S. **Nutritional and Medicinal Qualities of Sweet potato Tops and Leaves**. Cooperative Extension Service, University of Arkansas, 2014.

JOSÉ, A. E. **Compostos fenólicos e atividade antibacteriana em acessos de Ipomoea Batatas (L.) Lam. Batata doce**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR RS, 2012.

JOSÉ, A. E.; CHAVES CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M. **Avaliação do efeito antibacteriano de extratos de folhas de batata-doce (Ipomoea batatas L.) frente a bactérias de interesse em alimentos e correlação com os compostos fenólicos**. Revista Ceres, v. 62, n. 5, 2015.

KIM, H.J.; Park, WS.; BAE, J.-Y.; KANG, SY.; YANG, MH.; LEE, S.; LEE, H.-S.; KWAK, S.-S.; AHN, M.-J. **Variations in the carotenoid and anthocyanin contents of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes**. Journal of Food Composition and Analysis, 41, 188-193, 2015.

LIU, F.; MA, C.; GAO, Y.; MCCLEMENTS, D. J. **Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 16, n. 1, p. 76-95, 2017.

LEITE, C. E. C. **Novas cultivares de batatas-doces (Ipomoea batatas L. Lam.): potencial nutricional, composição de bioativos, propriedades antioxidantes e análise digital de imagem**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MALUF, W. R. **A batata-doce e seu o potencial na alimentação humana, na alimentação animal, e na produção de etanol biocombustível**, 2003. Disponível em: . Acesso em: 08/05/2017.

MOHANRAJ, R.; SIVASANKAR, S. **Sweet Potato (Ipomoea batatas [L.] Lam) -A valuable medicinal food: A review**. Journal of Medicinal Food, v. 17, n. 7, p. 733-741, 2014.

MOSCA, S.S; SANCHES, R.A; COMUNE, AC. **A Importância dos Antioxidantes na neutralização dos Radicais Livres**: Revista Saúde em Foco – Edição nº 9, 2017

SALASAR, T.C.C.O. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da folha da batata-doce [Ipomoea batatas (L.) Lam] – 2018. 80f.: il.; color. ____393 Dissertação (mestrado) – Universidade de Cruz Alta–UNICRUZ e Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul UNIJUI, Mestrado do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Atenção Integral à Saúde, 2018.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products**. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SONG, J.; LI, D.; LIU, C.; ZHANG, Y. **Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant activity**. Innovative food science & emerging technologies, v. 12, n. 3, p. 282-287, 2011.

SUN, H.; MU, T.; XI, L.; ZHANG, M.; CHEN, J.: **Sweet potato (Ipomoea batatas L.) leaves as nutritional and functional foods**. Food Chemistry, n. 156, p. 380-389, 2014.

UDEM, S. C.; ASOGWA, O. **Effects on hematological and biochemical parameters in albino mice fed Ipomoea batatas leaf aqueous extract**. Comparative Clinical Pathology, v. 20, n. 5, p. 475-479, 2011.

VIZZOTTO, M; PEREIRA, E.S; CASTRO, LAS; RAPHAELLI, CH; KROLOW, A.C. **Composição**

mineral em genótipos de batata-doce de polpas coloridas e adequação de consumo para grupos de risco. Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 21, e2016175, 2018.

XU, W.; LIU, L.; HU, B.; SUN, Y.; YE, H.; MA, D.; ZENG, X. **TPC in the leaves of 116 sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties and Pushu 53 leaf extracts.** Journal of food composition and analysis, v. 23, n. 6, p. 599-604, 2010

FITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CO-EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E ARSÊNIO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE CRESPA (*L. sativa var. crispa*)

Flávio Manoel Rodrigues Da Silva Júnior

Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
Grande - RS

Eduarda De Moura Garcia

Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
Grande - RS

Rodrigo De Lima Brum

Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
Grande - RS

Silvana Manske Nunes

Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
Grande – RS

Mariana Vieira Coronas

Universidade Federal de Santa Maria, Cachoeira
do Sul - RS

Juliane Ventura Lima

Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
Grande - RS

vez no ambiente, outro problema potencial é a interação com outros contaminantes ambientais. Vista a carência de estudo de toxicidade das N-TiO₂ em co-exposição com o Arsênio, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fitotoxicidade destes elementos isoladamente e em co-exposição com arsênio em alface crespa (*Lactuca Sativa var. crispa*). Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados em triplicata, com controles de H₂O-Milli-Q; duas concentrações NTiO₂ (10 e 100 mg.L⁻¹); três concentrações de As (1, 10, e 100 µg.L⁻¹); e ainda a co-exposição de N-TiO₂ na sua concentração não tóxica (10 mg.L⁻¹) somado a três concentrações de As (1, 10, 100 µg.L⁻¹). O resultados apontam para baixa fitotoxicidade do NTiO₂ isoladamente (impactou apenas um parâmetro na maior concentração testada), mas este potencializa a toxicidade do arsênio em co-exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas; dióxido de titânio; arsênio; co-exposição; fitotoxicidade.

ABSTRACT: The use of nanoparticles of titanium dioxide (N-TiO₂) has increased in recent years, being included in formulations of sunscreen, chewing gum component and also as a pigment for the bleaching of paints. However, there is great concern regarding its safety and toxicity. From the ecotoxicological point of view, the risk of nanomaterials in the ecosystem depends both on their inherent

RESUMO: O uso de nanopartículas de dióxido de titânio (N-TiO₂) tem aumentado nos últimos anos, sendo incluídas em formulações de protetor solar, componente de goma de mascar e também como pigmento para o clareamento de tintas. No entanto, há uma grande preocupação em relação à sua segurança e toxicidade. Do ponto de vista ecotoxicológico, o risco dos nanomateriais no ecossistema depende tanto da sua toxicidade inerente, quanto da sua probabilidade de chegar ao ambiente. Uma

toxicity and on their likelihood of reaching the environment. Once in the environment, another potential problem is interaction with other environmental contaminants. The objective of this study was to evaluate the phytotoxicity of these elements alone and in co-exposure to arsenic in crisp lettuce (*Lactuca sativa var. crispa*). Phytotoxicity assays were performed in triplicate, using H₂O-Milli-Q controls; NTiO₂ concentrations (10 and 100 mg.L⁻¹); As concentrations (1, 10, and 100 µg.L⁻¹); and the co-exposure of N-TiO₂ in its non-toxic concentration (10 mg.L⁻¹) was added to three concentrations of As (1, 10, 100 µg.L⁻¹). The results point to the low phytotoxicity of NTiO₂ alone (it only affected one parameter at the highest concentration tested), but this potentiates the toxicity of arsenic in co-exposure.

KEYWORDS: Nanoparticles; titanium dioxide; arsenic; co-exposure; phytotoxicity.

1 | INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas de dióxido de titânio (N-TiO₂) tem aumentado nos últimos anos em diversas aplicações tecnológicas, sendo incluídas em formulações de protetor solar, componente de goma de mascar e também como pigmento para o clareamento de tintas. No entanto, há uma grande preocupação quanto a sua segurança em relação à toxicidade (Kägi et al., 2008; Rui et al., 2013). De um ponto de vista ecotoxicológico, o risco dos nanomateriais no ecossistema depende tanto da toxicidade inerente deste tipo de composto, quanto da probabilidade para chegar ao ambiente. A detecção de nanomateriais no ambiente tem sido considerado um desafio analítico (Handy et al., 2008).

A toxicidade dos nanomateriais ainda é discutível. Tomando como exemplo o nanomaterial de fulereno de carbono, autores como Henry et al. (2011) consideram que a sua toxicidade através da indução de estresse oxidativo é quase insignificante em suspensão aquosa, embora levantada a possibilidade de efeitos deletérios do fulereno, induzidos em virtude da sua capacidade de adsorver outros contaminantes e, desta forma, afetando o destino, o transporte e a biodisponibilidade do co-contaminante. Para esta situação, Limbach et al. (2007) cunhou o termo efeito de ‘Cavalo de Tróia’. No caso dos nanomateriais de carbono como o fulereno, o estudo de Costa et al. (2012) mostrou que a coexposição deste nanomaterial com Arsênio (As) favoreceu o acúmulo do metaloide em Zebrafish (*Danio rerio*). No caso específico de N-TiO₂, Sun et al. (2009) relataram que este nanomaterial aumentava a incorporação de Arsênio nas brânquias, vísceras e tecido muscular de peixes da espécie *Cyprinus carpio*.

É de conhecimento comum que fatores abióticos, como por exemplo força iônica, favorecem os nanomateriais em sua aglomeração e eventualmente em sua deposição. Autores como Baun et. al. (2008) e Navarro et al. (2008) consideram que em alguns cenários ambientais a associação de nanomateriais com matéria orgânica favorecem a sua deposição e, em seguida, tornam-se disponíveis para o meio ambiente.

Investigações sobre a ecotoxicologia das nanopartículas também já foram

realizados com o objetivo de avaliar os seus efeitos nocivos para o ecossistema (Zhu et al., 2006; Blaise et al., 2008). Trabalhos anteriores mostraram que NTiO₂ possui efeito tóxico e inibi o crescimento de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) (Aruoja et al., 2009), crustáceos (*Daphnia magna*), e bactérias (*Vibrio fischeri*) (Heinlaan et al., 2008).

Tendo em vista a carência de estudos de toxicidade das N-TiO₂ em coexposição com Arsênio, o objetivo deste trabalho foi avaliar sua fitotoxicidade em alface crespa (*Lactuca sativa var. crispa*).

2 | METODOLOGIA

As nanopartículas de dióxido de titânio (99,9% de pureza, estrutura de cristal rutilo) foram adquiridas da Sigma-Aldrich. A solução estoque de N-TiO₂ foi preparada e caracterizada na concentração de 10 g/L em um volume de 50 mL conforme o estudo de Cordeiro et al. (2015).

Para avaliação da fitotoxicidade foi conduzido o bioensaio de germinação e crescimento inicial de plântulas utilizando a alface crespa (*Lactuca sativa var. crispa*) (ABNT, 2014). Foram executados 3 experimentos e cada experimento foi realizado em triplicata: Experimento 1 – Toxicidade do N-TiO₂, Experimento 2 – Toxicidade do Arsênio e Experimento 3 – Toxicidade da co-exposição N-TiO₂ e Arsênio.

Os bioensaios foram executados em placas de Petri contendo papel filtro Whatman Nº1 e 20 sementes de alface crespa (*Lactuca sativa var. crispa*). Em cada placa foi adicionado 4 mL de solução nas seguintes concentrações: Controles apenas com H₂O-Milli-Q; N-TiO₂ (10 e 100 mg/L); As (1, 10 e 100 µg/L); e co-exposição da concentração não tóxica de N-TiO₂ (10 mg/L) somado a três diferentes concentrações de As (1, 10 e 100 µg/L).

O experimento foi realizado no escuro em uma câmara de BOD na temperatura de 20°C. Após 120 horas (5 dias) de incubação foram determinados os seguintes parâmetros: germinação das sementes e alongamento da plântula.

As médias de taxa de germinação e elongamento da plântula nos diferentes tratamentos foram comparadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguida de teste *a posteriori* de Tukey, considerando um p crítico de 5%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do teste de fitotoxicidade para avaliação da toxicidade do nanomaterial, do arsênio e da co-exposição são mostrados, respectivamente, nas Tabelas 1, 2 e 3.

Concentração de N-TiO ₂ (mg/L)	Germinação (%)	Alongamento das plântulas (cm)
0	100	4,76 ^a
10	100	5,59 ^a
100	100	3,16 ^b

Tabela 1. Efeito da concentração de N-TiO₂ sobre a germinação e alongamento da plântula em alface crespa

Concentração de As (µg/L)	Germinação (%)	Alongamento das plântulas (cm)
0	100	4,76 ^a
1	100	2,20 ^b
10	90	0,80 ^c
100	0	0,00 ^d

Tabela 2. Efeito da concentração de arsênio sobre a germinação e alongamento da plântula em alface crespa

Concentração combinada	Germinação (%)	Alongamento das plântulas (cm)
N-TiO ₂ 10 mg/L + As 1,0 µg/L	0	-
N-TiO ₂ 10 mg/L + As 10 µg/L	0	-
N-TiO ₂ 10 mg/L + As 100 µg/L	0	-

Tabela 3. Efeito da co-exposição de N-TiO₂ (concentração não-tóxica) e arsênio sobre a germinação e alongamento da plântula em alface crespa

Foi observado que, ao ser exposta a concentrações definidas de N-TiO₂ (Tabela 1), a alface crespa apresentou um índice de germinação de 100% e apresentou redução do crescimento apenas na maior concentração testada, demonstrando baixa fitotoxicidade. No segundo experimento (Arsênio), mostrou redução dose dependente da germinação e do crescimento inicial das plântulas, sendo relatado, inclusive, um índice de germinação de 0% na maior concentração testada (100 µg/L).

O ensaio de co-exposição está mostrado na Tabela 3. Optou-se por realizar o ensaio com a maior concentração de N-TiO₂ que não exibiu toxicidade (Concentração de efeito não observado – CENO) (10 mg/L) somado a três diferentes concentrações de As (onde foram previamente testadas sem a co-exposição). Neste cenário foi observada uma potencialização da fitotoxicidade do As, uma vez que a alface crespa não apresentou germinação em nenhuma das concentrações avaliadas.

A nanotoxicologia é uma matéria recente (Donaldson et al, 2004), mas tem atraído a atenção dos pesquisadores na área, sendo o estudo da nano-ecotoxicologia um dos desafios mais interessantes desta ciência (Handy et al 2008). Neste sentido,

além do estudo da toxicidade das nanopartículas com potencial para ingressar no meio ambiente, os estudos devem prever o potencial de interação entre essas e os contaminantes ambientais, tais como os elementos-traço.

O efeito da exposição combinada entre N-TiO₂ e arsênio já foi investigado em raros estudos, tais como para o poliqueto *Laeonereis acuta* (Nunes et al 2017) e para as algas *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus obliquus* (Luo et al 2018) e os resultados apontam para alterações de padrões bioquímicos, de bioacumulação e de biotransformação das diferentes formas de arsênio.

Parece não haver registros de estudos que investigam a fitotoxicidade da exposição combinada de N-TiO₂ e arsênio, mas outros estudos apontam para o potencial de nanomateriais amplificar a fitotoxicidade do arsênio, provavelmente por alterações gênicas que afetam o padrão de biotransformação das diferentes formas inorgânicas e orgânicas de arsênio (Hu et al 2014). Este é um campo de pesquisa que deve ser olhado com atenção, uma vez que os prejuízos aos vegetais podem comprometer processos ambientais naturais e causar prejuízos na agricultura.

4 | CONCLUSÕES

Podemos concluir, neste estudo, que as nanopartículas de dióxido de titânio não foram tóxicas para a alface crespa até a concentração de 10 mg/L. Embora o arsênio seja um elemento fitotóxico, a co-exposição deste elemento com o nanomaterial potencializa sua toxicidade.

REFERÊNCIAS

ABNT. Qualidade do solo – Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre. Parte 2: Efeitos do solo contaminado na emergência e no crescimento inicial de vegetais superiores. NBR 11269:2014

Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., & Kahru, A. **Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*.** Science of the total environment, 407(4), 1461-1468, 2009.

Baun, A., Hartmann, N. B., Grieger, K., & Kusk, K. O. **Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing.** Ecotoxicology, 17(5), 387-395, 2008.

Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J. F., & Eullaffroy, P. **Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms.** Environmental Toxicology: An International Journal, 23(5), 591-598, 2008.

Costa, C. L. A., Chaves, I. S., Ventura-Lima, J., Ferreira, J. L. R., Ferraz, L., De Carvalho, L. M., & Monserrat, J. M. **In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 155(2), 206-212, 2012.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. **Nanotoxicology.** 61: 727-728, 2004.

Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. **The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs.** Ecotoxicology, 17(5), 315-325, 2008.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., & Kahru, A. **Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*.** Chemosphere, 71(7), 1308-1316, 2008.

Henry, T. B., Petersen, E. J., & Compton, R. N. **Aqueous fullerene aggregates (nC₆₀) generate minimal reactive oxygen species and are of low toxicity in fish: a revision of previous reports.** Current opinion in biotechnology, 22(4), 533-537, 2011.

Hu, X., Kang, J., Lu, K., Zhou, R., Mu, L., & Zhou, Q. (2014). **Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat.** Scientific reports, 4, 6122.

Kägi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., & Boller, M. **Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment.** Environmental pollution, 156(2), 233-239, 2008.

Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., & Stark, W. J. **Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress.** Environmental science & technology, 41(11), 4158-4163, 2007.

Luo, Z., Wang, Z., Yan, Y., Li, J., Yan, C., & Xing, B. **Titanium dioxide nanoparticles enhance inorganic arsenic bioavailability and methylation in two freshwater algae species.** Environmental Pollution, 238, 631-637, 2018.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, PH & Sigg, L. **Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.** Ecotoxicology, 17(5), 372-386, 2008.

Nunes, S. M., Josende, M. E., Ruas, C. P., Gelesky, M. A., da Silva Júnior, F. M. R., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M. & Ventura-Lima, J. **Biochemical responses induced by co-exposition to arsenic and titanium dioxide nanoparticles in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta*.** Toxicology, 376, 51-58, 2017.

Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M., & Wang, D. **Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response.** Chemosphere, 93(10), 2289-2296, 2013.

Zhu, S., Oberdörster, E., & Haasch, M. L. **Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow.** Marine Environmental Research, 62, S5-S9, 2006.

FOTOBIORREATOR DE MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EMISSÕES GASOSAS UTILIZANDO MATERIAIS ALTERNATIVOS

Ana Beatriz Medeiros Dantas

Universidade Federal do Paraná
Curitiba – Paraná

Luana Valezi

Universidade Federal do Paraná
Curitiba – Paraná

Vitória Luciana de Souza

Universidade Federal do Paraná
Curitiba – Paraná

Roberto Shiniti Fujii

Centro Estadual de Educação Profissional de
Curitiba – CEEP de Curitiba
Curitiba – Paraná

em um equipamento para uso doméstico e de baixo custo. Os testes realizados para a comprovação da efetividade da metabolização de alguns gases pelas microalgas através da queima de carvão vegetal em uma churrasqueira doméstica mostraram-se satisfatórios, principalmente no que diz respeito à redução das emissões do gás de interesse, o dióxido de carbono.

PALAVRAS-CHAVE: Fixação de CO₂, Processos biológicos, Biomassa, Churrasqueira.

MICROALGAE PHOTOBIOREACTOR FOR THE TREATMENT OF GASEOUS EMISSIONS USING ALTERNATIVE MATERIALS

ABSTRACT: Currently, there is great concern about the emission of carbon dioxide (CO₂), one of the main gases that causes global warming and is reaching high concentrations in the atmosphere. Biological methods, such as photobioreactors, that use microalgae in the CO₂ fixation process, were considered among the several technologies that aim to reduce CO₂ emissions, being considered efficient for this use. Thus, a microalgae photobioreactor was constructed with PET bottles, replacing the glass pipes present in the conventional closed systems, with the purpose of treating gas emissions from a small domestic barbecue,

RESUMO: Atualmente, há uma grande preocupação com a emissão de dióxido de carbono (CO₂), um dos principais gases que provocam o aquecimento global e está atingindo altas concentrações na atmosfera. Entre as diversas tecnologias que visam à redução de emissões de CO₂, surgiram métodos biológicos, como fotobiorreatores, que utilizam microalgas no processo de fixação de CO₂, sendo considerado eficiente para este uso. Dessa forma, construiu-se um fotobiorreator de microalgas com garrafas PET, substituindo as tubulações de vidros presentes nos sistemas fechados convencionais, com objetivo de tratar emissões gasosas provenientes de uma churrasqueira doméstica pequena, resultando

resulting in an equipment for domestic and low cost. The tests performed to prove the effectiveness of the metabolism of some gases by the microalgae through the burning of charcoal in a domestic barbecue proved satisfactory, especially with regard to the reduction of the emissions of the gas of interest, carbon dioxide.

KEYWORDS: CO₂ fixation, Biological processes, Biomass, Barbecue.

1 | INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande preocupação com a emissão de dióxido de carbono (CO₂), um dos principais gases que provocam o aquecimento global, que está atingindo altas concentrações na atmosfera, causando consequências devastadoras no meio ambiente.

Este problema tem motivado o desenvolvimento de tecnologias limpas e renováveis visando à redução das emissões de CO₂. Segundo Rico (2014), entre as diversas propostas, surgiram os métodos biológicos, como os fotobiorreatores que utilizam microalgas autotróficas no processo de fixação de gás carbônico.

As microalgas são organismos unicelulares que apresentam grandes vantagens: com rápido crescimento, realizam fotossíntese, consumindo CO₂ e produzindo lipídios de forma mais eficiente. Além disso, possuem a capacidade de reduzir o dióxido de carbono na forma de carboidratos e lipídios, sendo possível produzir energia, produtos químicos e alimentos a partir dessa biomassa (MARIANO, 2011).

Há séculos, a coleta e o cultivo de microalgas para utilização na alimentação humana já são realizadas. Ao longo da década de 1980, alguns modelos de fotobiorreatores fechados ganharam destaque se comparados com os tradicionais tanques abertos utilizados em larga escala e concebidos desde a década de 1960 para o cultivo de *Chlorella sp.* no Japão. Pesquisas sobre as microalgas em fotobiorreatores fechados estão ganhando atenção, devido à grande eficiência nos tratamentos de efluentes, emissões gasosas e diversas aplicações comerciais (MENDES, 2008).

Dessa forma, construiu-se um fotobiorreator de microalgas (cultivo misto) de garrafas PET a fim de substituir as tubulações de vidros presentes nos sistemas fechados convencionais, utilizando esse processo biológico para tratar as emissões gasosas provenientes de uma churrasqueira doméstica pequena, com o objetivo de comparar a produção de gases no início do sistema e a fixação de carbono ao final do processo, bem como verificar a eficiência na eliminação de odores produzidos pela churrasqueira, resultando em um equipamento para uso doméstico e de baixo custo.

2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Existe um grande interesse no uso das microalgas, uma vez que são microrganismos unicelulares que apresentam rápido crescimento e alta taxa de reprodução; além

de realizarem fotossíntese, fornecem lipídios (óleos) que proporcionam grandes vantagens na produção de biodiesel, reduzindo o uso de combustíveis fósseis. Além disso, capturam e consomem CO₂ de fontes industriais, transformando este poluente em matéria-prima, apresentando grande diversidade e podendo ser encontradas em diversos ambientes aquáticos de águas doces ou salgadas (MARIANO, 2011).

As microalgas também oferecem um grande potencial comercial, já que podem ser utilizadas para a alimentação, suplementos alimentares, saúde humana e animal, fabricação de rações e adubos, assim como são importantes para produção de biocombustíveis, sequestro de carbono e tratamento de efluentes (DERNER *et.al.*, 2006).

Segundo Angelo; Andrade e Colozzi Filho (2014), as microalgas possuem diferentes formas de metabolismo energético, dentre eles o fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. O conhecimento destes favorece na aplicação de estratégias e formas de cultivo que visam aumentar a produção de microalgas e seus derivados. A forma fotoautotrófica é comumente utilizada e consiste na exposição do organismo à luz (solar ou artificial), gerando energia e carbono de forma inorgânica, através da fotossíntese. Já no metabolismo heterotrófico, não há necessidade de exposição à luz para a obtenção de energia e carbono, estes são resultados de algum tipo de fonte orgânica externa. A forma mixotrófica se baseia na fotossíntese e na oxidação de compostos orgânicos ocorrendo simultaneamente. Por fim, a forma fotoheterotrófica se refere à luz como fonte de energia e aos compostos orgânicos como fonte de carbono.

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos, utilizados desde a década de 1960 no Japão, podendo ser em tanques, grandes piscinas ou lagoas artificiais, com uma constante agitação. Entretanto, este método requer grandes espaços e as dificuldades de controlar as condições de cultivo, a evaporação do meio, a redução da intensidade de luz e os altos riscos de contaminação diminuem a produtividade do cultivo (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Mariano (2011) relata que, em 1944, os pesquisadores Maters & Clark desenvolveram os primeiros protótipos de fotobiorreatores fechados, inicialmente, contendo muitas peças em aço que acabavam impedindo a entrada da luz; todavia, atualmente, já se sabe da importância de tubos transparentes, que permitem a passagem de luz. O exemplo de fotobiorreator mais utilizado nos dias atuais é o formato tubular, com tubos dispostos de forma horizontal ou vertical em forma serpentina ou espiral. Pode ser instalado ao ar livre recebendo energia solar ou, em ambientes fechados, com iluminação artificial.

Há mais de 20 anos, desenvolvem-se diversificados fotobiorreatores planos, com função apropriada, aumentando a utilização da energia solar devido ao ajuste do ângulo permitido nos painéis presentes nos mesmos (MARIANO, 2011).

No Brasil, pesquisas passaram a desenvolver novas tecnologias utilizando as microalgas. Dentre os projetos, a parceria entre o Instituto de Tecnologia do Paraná

(Tecpar), a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e a Churrascaria Devons Grill de Curitiba teve destaque por desenvolver um sistema de tratamento atmosférico com fotobiorreatores a partir das microalgas utilizadas na metabolização da fumaça. O projeto é de grande relevância ambiental, porém, necessita de um alto investimento, estimado entre R\$ 650 mil e R\$ 700 mil, o que dificulta a implantação desse projeto em pequenos estabelecimentos (RICO, 2014).

3 | METODOLOGIA

O projeto foi dividido em duas frentes de execução: cultivo das microalgas, devido à necessidade de um cuidado e de uma manutenção semanal a fim de que houvesse uma rápida proliferação e, posteriormente, serem utilizadas no processo de filtração; e a construção do sistema de fotobiorreatores, visto que o objetivo do projeto foi criar um sistema funcional com materiais caseiros.

3.1 Cultivo de microalgas

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de isolar e cultivar as microalgas em laboratório, para, posteriormente, serem transferidas para o fotobiorreator.

A água doce contendo as microalgas foi coletada em diferentes pontos do lago do Passeio Público, no centro de Curitiba, na camada superficial, a 25 centímetros de profundidade da superfície do espelho d'água, até obter-se a quantidade de 16 litros de água, depositadas em garrafas PET de 2,5 L e transportadas às instalações do Laboratório de Gestão de Recursos Naturais do Curso de Meio Ambiente do CEEP Curitiba (Laboratório 42). Durante as análises, observou-se que todas as amostras coletadas tratavam-se de um meio de cultura misto, onde não foi possível a identificação de todas as espécies, somente das mais numerosas, como *Chlorella sp.*, *Pediastrum sp.*, *Spirullina sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Desmodesmus sp* (FIGURA 1).



Figura 1: Identificação das microalgas no Microscópio.

Fonte: As autoras (2016).

A água coletada passou por um processo de filtração e concentração das algas com papel filtro, depois estocada em frascos de vidro para bureta de 2 L, tampados com rolhas de silicone com duas aberturas, a fim de permitir as trocas gasosas e evitar a deposição de ovos por mosquitos (FIGURA 2).



Figura 2: Culturas de microalgas cultivadas no CEEP Curitiba.

Fonte: As autoras (2016).

A luminosidade foi controlada em uma capela com lâmpadas fluorescentes de 30 W (FIGURA 3), por um período de 12 horas diárias, possibilitando o crescimento e a reprodução das microalgas.



Figura 3: Capela de exaustão revestida com papel alumínio e iluminação artificial.

Fonte: As autoras (2016).

A nutrição das algas foi realizada com a adição do Bold's Basal Medium (BBM), que funciona como um adubo químico. As culturas de microalgas foram divididas semanalmente, acrescentando-se 250 ml de água deionizada e 100 ml de BBM a cada repicagem. Devido ao metabolismo do material orgânico pelas microalgas no interior dos frascos, ocorre um aumento de biomassa que pode impedir a entrada de luz no interior destes, sendo necessária a realização de repicagem. Nesse sentido, o excedente foi transportado para novos frascos, como descrito anteriormente, mantendo-se aeração e iluminação constantes.

Como uma alternativa para substituir o meio sintético BBM, utilizou-se o esterco não curtido de codorna (*Codorniz-comum*). Assim, foram utilizados sete tubos de ensaio, com quantidades iguais de microalgas (10 ml), com concentrações que variaram de 0,08 ml a 5 ml, sendo uma amostra controle, sem qualquer quantidade de esterco.

A água coletada do Passeio Público continha inúmeros microrganismos que impediam o crescimento das microalgas, tais como Pulga D'água (*Daphnia magna*), protozoários (*Paramecium caudatum*) e Copépodes (*Cyclops sp.*), devido a isso, com o objetivo de reduzir a contaminação das amostras, foram realizados testes com cloreto de sódio (sal de cozinha), baseando-se no princípio da osmose, no qual a água passa de um ambiente com menor concentração de sal para um com maior concentração, dessa forma, retirando a água dos organismos. O objetivo do teste foi a eliminação dos protozoários e crustáceos que consumiam as algas. A realização do processo se deu utilizando 4 tubos de ensaio com 10 ml da água coletada em cada tubo. Para cada tubo, adicionaram-se diferentes quantidades de sal, com quantidades variando de 1 g a 0,125 g, a fim de avaliar o efeito da concentração de soluto sobre os organismos.

3.2 Sistema de fotobiorreatores

O fotobiorreator foi confeccionado com 1 palete de madeira com dimensões individuais de 1,20 m x 1,00 m; 12 garrafas PET de 2,5 litros; mangueiras transparentes; pregos; 12 madeiras de dimensões 7 cm x 7 cm; 1 churrasqueira de latão cilíndrica, cujas dimensões são $d=0,58\text{ m}$, $h=0,43\text{ m}$ obtendo o volume interno de $0,113\text{ m}^3$; 1 tubo flexível de alumínio de 1,0 m; 1 cano de PVC de 1 m com diâmetro interno de 100 mm; 2 lâmpadas fluorescentes tubulares de 30 W. Nos paletes, foram fixados 12 blocos de madeiras com 7 cm x 7 cm entre as garrafas, a fim de proporcionar uma sustentação para as mesmas. O tubo flexível de alumínio foi conectado à saída de fumaça da churrasqueira e ao exaustor. Conectou-se ao exaustor um cano de PVC de 100 mm, que distribuiria a fumaça pelas mangueiras até as garrafas PET (FIGURA 4).



Figura 4: Protótipo do fotobiorreator de garrafa PET.

Fonte: As autoras (2017).

Para o funcionamento do fotobiorreator, um tubo flexível de alumínio de 1,0 m foi conectado à churrasqueira para transportar a fumaça produzida ao exaustor que, a partir de um motor, cria pressão positiva dos gases da churrasqueira para o interior das garrafas preenchidas até a metade com o meio de microalgas, onde ocorrerá a metabolização dos poluentes.

Os gases foram injetados nas garrafas a partir de mangueiras transparentes imersas nas culturas, formando bolhas. Uma parte dos gases borbulhados foram dissolvidos no líquido e metabolizados pelas microalgas, enquanto a parte restante da fumaça excedente passou para a outra garrafa através de outra mangueira acoplada na parte superior direita da primeira garrafa, sem contato com o líquido e inserida na parte superior esquerda da próxima garrafa para mergulhar no líquido desta, assim se repetindo, até chegar ao fim do ciclo, na última garrafa, que possuía pouca ou nenhuma fumaça. Para que as microalgas realizassem a fotossíntese e metabolizassem a fumaça, construiu-se uma luminária com lâmpadas fluorescentes em casos onde a iluminação natural é pouca ou ausente.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao cultivo de microalgas, por falta de materiais, o espaço de armazenamento foi restrinido apenas a uma capela de exaustão com duas lâmpadas fluorescentes, sendo que o ideal para o cultivo seria uma estante com diversas lâmpadas, controle de temperatura e um sistema de aeração. Devido à falta da estante para armazenagem das microalgas, e com o uso da capela de exaustão para suprir esta ausência, alguns frascos permaneceram dentro da capela enquanto outros tiveram de ficar do lado externo. Com isso, tais frascos apresentaram menor crescimento devido à baixa luminosidade, o que dificultou a realização do processo de fotossíntese.

Durante o estudo, analisou-se o desempenho de dois testes, com objetivo de reduzir a contaminação das amostras e acelerar o processo de crescimento das microalgas. Os testes para avaliar a eficiência osmótica do sal na purificação das microalgas apresentaram bom desempenho. Os frascos que continham uma maior concentração de sal não apresentaram protozoários e Copépodos vivos. Entretanto, nos frascos com menor quantidade, notou-se a presença dos mesmos, que vieram a morrer com o passar do tempo.

A fim de testar a veracidade da hipótese a respeito da nutrição das microalgas através do teste com esterco de codorna, analisando as amostras visualmente (FIGURA 5), constatou-se que o mesmo influenciou positivamente no crescimento das microalgas, em que, nos frascos com maior concentração, houve um maior crescimento de microalgas, e este crescimento foi declinando de acordo com a diminuição da quantidade de esterco ao longo dos tubos. Porém, por falta de equipamento, não foi possível realizar a contagem para verificar a efetividade em números da nutrição das microalgas.

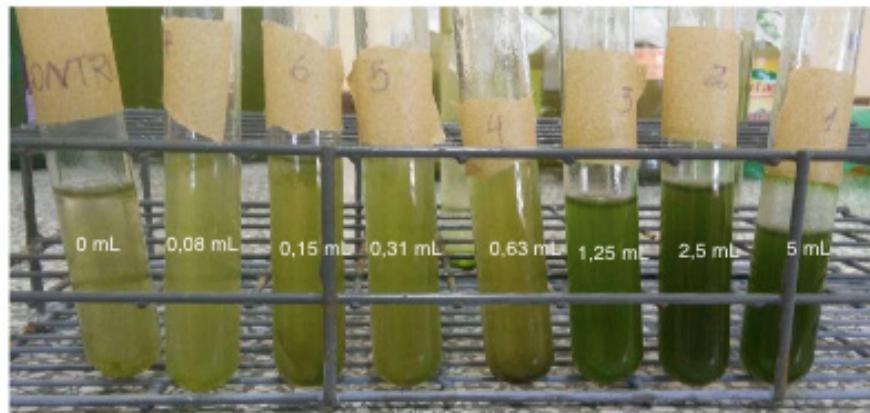


Figura 5: Teste com esterco não curtido de codorna.

Fonte: As autoras (2016).

Referindo-se à operacionalização do segundo protótipo, foi possível chegar ao funcionamento com o compressor de geladeira impulsionando para 12 garrafas de 2,5 L, apesar de o mesmo não poder permanecer ligado por um longo período de tempo. Conclui-se que a falta de vedação foi o principal agravante, uma vez que a fumaça que era impulsionada vazava por todos os espaços vagos. Porém, após a devida vedação de tais espaços, a operacionalização do protótipo foi possível.

Para a realização dos testes com o fotobiorreator de garrafa PET afim de verificar a eficiência das microalgas na metabolização dos gases presentes na fumaça de uma churrasqueira, foram realizadas três medições em um analisador de gases, sendo o carvão vegetal o combustível utilizado para a queima. A TABELA 01 mostra a relação dos dados entre as concentrações de gases das diferentes saídas.

Desse modo, a primeira medição foi realizada na saída da churrasqueira, com as concentrações de gases da saída desta para calibração do sistema, obtendo-se O₂ 21,08 %, CO 6 ppm, CO₂ 0,04 %, NO_x 1,8 ppm, NO 0 ppm, NO₂ 1,8 ppm e SO₂ 0 ppm, com temperatura da amostra em 17,7 °C e temperatura ambiente em 19,7 °C. A segunda medição foi realizada na saída da mangueira transparente da passagem do exaustor para o motor compressor de geladeira, com combustão constante do sistema estabilizado, obtendo-se O₂ 11,93 %, CO 7000 ppm, CO₂ 7,51 %, NO_x 16,5 ppm, NO 17 ppm, NO₂ 0 ppm e SO₂ 147 ppm, com temperatura da amostra em 19,2 °C e temperatura ambiente em 19,9 °C. A última medição foi realizada na mangueira transparente da saída do fotobiorreator, após a passagem da fumaça pela metabolização das microalgas, obtendo-se O₂ 10,63 %, CO mais que 7000 ppm, CO₂ 6,85 %, NO_x 13 ppm, NO 13 ppm, NO₂ 0 ppm e SO₂ 101 ppm, com temperatura da amostra em 19,4 °C e temperatura ambiente em 20 °C.

O aparelho que realizou as análises estava programado para não ultrapassar 7000 ppm com relação ao CO e, como observado nos resultados das análises, houve um aumento significativo no valor deste, que indica que há uma combustão incompleta e a mesma deve ser melhorada. Isso ocorre ou pela falta de ar ou falta de combustível,

portanto, sempre pode acontecer, pois é um problema exclusivo da combustão e os seus valores dependem da mesma. Assim, como já mencionado, o gás de interesse, o CO₂, é o gás que se deve reduzir, pois ele realiza uma combustão perfeita, dependendo apenas da metabolização pelas microalgas para o resultado.

Gases	Saída da Churrasqueira	Saída da mangueira transparente	Saída do Fotobiorreator
O ₂	21,08 %	11,93 %	10,63 %
CO	6 ppm	7000 ppm	7000 ppm
CO ₂	0,04 %	7,51 %	6,85 %
NO _x	1,8 ppm	16,5 ppm	13 ppm
NO	0 ppm	17 ppm	13 ppm
NO ₂	1,8 ppm	0 ppm	0 ppm
SO ₂	0 ppm	147 ppm	101 ppm

Tabela 01: Concentrações de gases do início e do fim do processo.

Fonte: As autoras (2017).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando toda a metodologia apresentada, bem como todos os fatores envolvidos no cultivo das microalgas e na construção do protótipo do fotobiorreator, o cultivo apresentou bons resultados em seu crescimento e nutrição apesar das inúmeras adversidades encontradas, como também a falta de recursos que levaram à criação de métodos mais simplificados, com maior facilidade e que fossem economicamente viáveis.

Na junção das duas metodologias aplicadas, cultivo das microalgas e construção do protótipo, constatou-se que estes processos podem ser realizados de maneira mais acessível e economicamente viável, considerando que a construção do protótipo se dá justamente com base nestes critérios, principalmente por se encontrar em condições onde não se podem encontrar todos os recursos para a realização dos diversos métodos encontrados em inúmeras metodologias.

A partir deste estudo, foi possível concluir que o cultivo misto de microalgas cultivadas em um fotobiorreator com garrafas PET cumpriu com o esperado, porém, devido a alguns incidentes ocorridos no decorrer da análise dos dados, o processo não foi realizado da forma adequada, em que o ideal seria a utilização do exaustor com função de direcionar a fumaça da churrasqueira ao compressor para que este impulsionasse a fumaça para as mangueiras, que a levariam até as garrafas, porém, no processo nos utilizamos apenas do compressor de geladeira, assim a quantidade de fumaça que chegaria até as garrafas seria menor do que se houvesse a utilização dos dois motores de forma a se complementarem. Além disso, como já mencionado,

a incapacidade do compressor de geladeira de permanecer ligado por muito tempo restringiu a realização dos testes em pequenos intervalos de tempo. Portanto, todas as amostras coletadas foram realizadas em períodos iguais de um minuto, para as três medições.

Dessa forma, apesar dos incidentes ocorridos e de o processo das análises ser realizado com algumas adaptações, a partir da obtenção dos dados, pode-se constatar que o cultivo misto de microalgas foi eficiente em alguns dos principais objetivos propostos, que seriam a comparação dos gases no início e ao final do processo para a efetividade da metabolização dos componentes derivados do carbono, sendo o gás de interesse o CO₂ reduzido em quase 1 %. Resultados positivos também foram encontrados com relação à construção do protótipo e à substituição das tubulações de vidro presentes nos demais fotobiorreatores, resultando em um equipamento viável e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Cultivo não -fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 35, n. 2, p. 125-136, jul./dez. 2014. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/viewFile/8131/16244>>. Acesso em 12 de agosto de 2016.
- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. **O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis.** R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, out./dez. 2011. Disponível em:<<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1797>>. Acesso em 25 de setembro de 2016.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. **Microalgas, produtos e aplicações.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, nov-dez. 2006. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n6/a50v36n6.pdf>>. Acesso em 18 de agosto de 2016.
- MARIANO, V. L. B. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores.** 2011. Disponível em:<<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/33308>>. Acesso em 27 de agosto de 2017.
- MENDES, L.B.B. **Cultivo de microalgas e perspectivas em fotobiorreatores fechados.** XII Congresso Brasileiro de Ficologia. 2008.
- RICO, A. O. **Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria.** 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

HIDRÓLISE ENANTIOSSELETIVA DE α - E β -BUTIRILOXIFOSFONATOS MEDIADAS POR LIPASE DE CANDIDA RUGOSA

Lucídio Cristovão Fardelone

Instituto de Química da Unicamp
Campinas – São Paulo

José Augusto Rosário Rodrigues

Instituto de Química da Unicamp
Campinas – São Paulo

Paulo José Samenho Moran

Instituto de Química da Unicamp
Campinas – São Paulo

respectively, in good yields, greater than 46.8%, and excellent enantiomeric excesses, 96.4 to >99% and demonstrates the importance of the developed methodology to obtain chiral α - and β -hydroxyphosphonates.

KEYWORDS: *Candida rugosa, enzimatic hydrolysis, asymmetric synthesis, α -hidroxy phosphonates, β -hidroxy phosphonates.*

1 | INTRODUÇÃO

Os compostos α - e β -hidroxifosfonatos são de extrema importância devido ao potencial de atividade biológica, como inibidores de renina, 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase - EPSP sintase, HIV protease, além de serem intermediários quirais em síntese de produtos de química fina, farmacêutica e agroquímica (ZOU *et al.*, 2015; SOBHANI e TASHRIFI, 2010).

Na literatura estão descritas biotransformações de compostos organofosforados, as quais utilizam células íntegras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium* sp., *Geotrichum candidum* e *Rodotorula glutinis*, bem como o uso de resolução enzimática com lipases de *Candida antartica*, *Candida rugosa*, *Mucor michei*, entre outras, para a obtenção de α -, β - e γ -hidroxifosfonatos ópticamente ativos

RESUMO: As hidrólises enantiosseletivas dos α -butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b** mediadas por lipase de *Candida rugosa* forneceram α - e β -hidroxifosfonatos (*R*)-(+) -**2a-c** e (*R*)-(+) -**5a-b**, respectivamente, com rendimentos químicos superiores a 46,8% e excessos enantioméricos de 96,4 a >99%, demonstrando a importância da metodologia desenvolvida para a obtenção de α - e β -hydroxyphosphonatos quirais.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida rugosa*, hidrólise enzimática, síntese assimétrica, α -hidroxifosfonatos, β -hidroxifosfonatos.

ABSTRACT: Enantioselective hydrolysis of α -butyryloxy phosphonates (\pm)-**6a-c** and β -butyryloxy phosphonates (\pm)-**7a-c** by *Candida rugosa* lipase furnishing a α - and β -hydroxy phosphonates (*R*)-(+) -**2a-c** and (*R*)-(+) -**5a-b**,

(ŻYMAŃCZYK-DUDA *et al.*, 2011; YAMAGISHI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2001).

No entanto, a redução enantiosseletiva de cetofosfonatos, bem como a resolução de α- e β-hidroxifosfonatos (BRZEZIŃSKA-RODAK *et al.*, 2011; KAFARSKI e LEJCZAK, 2004) por células íntegras e enzimas apresentam dificuldades de síntese, pois a seletividade depende da natureza dos grupos substituintes e da posição do grupo carbonila ou hidroxila, além de certos compostos cetofosfonatos serem degradados em meio aquoso, diminuindo o rendimento e o excesso enantiomérico (ee).

Neste trabalho relatamos importantes resultados obtidos na síntese de α- e β-hidroxifosfonatos mediadas pela enzima lipase de *Candida rugosa*, com rendimentos químicos, superiores a 78%, quando considerado 30% de conversão e rendimento máximo de 50% para a obtenção dos α- e β-hidroxifosfonatos com ee 96,4 a >99%.

2 | METODOLOGIA

Os compostos benzaldeído, 3-clorobenzaldeído, cinamaldeído, cloroacetona, 2-cloro-1-feniletanona, anidrido butírico, dimetilaminopiridina (DMAP) e ácido oxálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co e a lipase de *Candida rugosa* foi cedida pela Amano Enzyme Inc. - Japão. Os demais solventes e reagentes são comerciais.

2.1 Processos de obtenção dos substratos

Processo para a obtenção dos α-hidroxifosfonatos (\pm)-2a-c

Os α-hidroxifosfonatos (\pm)-2a-c foram sintetizados, com pequenas mudanças para otimização, segundo a metodologia de Vahdat *et al.* (2008) a partir de benzaldeído 1a, 3-clorobenzaldeído 1b, e cinamaldeído 1c reagindo com 1,1 equivalente de trimetilfosfito, na ausência de solvente e à temperatura de 60 °C, sob agitação magnética por uma hora, fornecendo os α-hidroxifosfonatos (\pm)-2a-c, Figura 1.

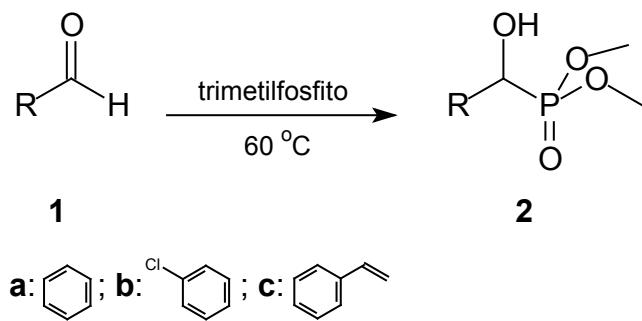


Figura 1 - Síntese de α-hidroxifosfonatos (\pm)-2a-c.

(\pm)-(hidroxy(fenil)metil)fosfonato de dimetila (\pm)-2a: quando 2,5 g (23,56 mmol) de benzaldeído 1a reagiu com trimetilfosfito utilizando o método de obtenção de

α -hidroxifosfonatos, forneceu 4,9 g de (\pm)-**2a**, 96,1% de rendimento, de um sólido cristalino com ponto de fusão de 92,6-93,5 °C (p.f. 92,6-93,9 °C, lit. 21). ^1H NMR (400,18 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,66 (d, $J = 10,5$ Hz, 3H), 3,68 (d, $J = 10,5$ Hz, 3 H), 5,02 (dd, $J = 5,8$ e 10,5 Hz, OH), 5,42 (dd, $J = 5,8$ e 10,5 Hz, 1 H), 7,30-7,41 (m, 5 H). HPLC, com coluna quiral OJ-H, utilizando como fase móvel hexano/2-propanol 95:05, com fluxo de 0,8 mL/minuto, com tempo de retenção de 27,1 (*R*) e 33,5 (*S*) minutos.

(\pm)-(3-clorofenil(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (\pm)-**2b**: quando 2,5 g (17,78 mmol) de 3-clorobenzaldeído **1b** reagiu com trimetilfosfito utilizando o método de obtenção de α -hidroxifosfonatos, forneceu 4,19 g de (\pm)-**2b**, 94% de rendimento, de um sólido cristalino, com ponto de fusão de 133,4-134,8 °C. ^1H NMR (499,87 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,67 (d, $J = 10,5$ Hz), 3,80 (d, $J = 10,5$ Hz), 4,31 (sI, OH), 5,59-5,61 (m, 1 H), 7,24-7,28 (m, 1H), 7,33-7,38 (m, 2H), 7,74-7,76 (m, 1H). HPLC, com coluna quiral OJ-H, utilizando como fase móvel hexano/2-propanol 97:03, com fluxo de 0,5 mL/minuto, com tempo de retenção de 46,7 (*R*) e 52,4 (*S*) minutos.

(\pm)-Dimetil (1-hidroxi-3-fenil-2-propenil)fosfonato (\pm)-**2c**: quando 3 mL g (3,15g, 23,83 mmol) de cinamaldeído **1c** reagiu com trimetilfosfito utilizando o método de obtenção de α -hidroxifosfonatos, forneceu 5,4 g (\pm)-**2c**, 93,5% de rendimento, de um óleo amarelo claro, sendo que o produto se cristaliza após 2 dias à temperatura ambiente, p.f. 98,6-101,6 °C. RMN ^1H (499,87 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,80 (d, $J = 10,4$ Hz, 3H); 3,82 (d, $J = 10,4$ Hz, 3H); 4,72 (m 1 H); 4,8 (s, OH); 6,34 (ddd, $J = 16,6$ e 6,15 Hz, $J = 5,4$ H, 1H); 6,78 (ddd, $J = 16,6$ e 1,5 Hz, $J = 5,4$ Hz, 1 H); 7,22-7,28 (m, 3H); 7,30-7,40 (m, 2 H). HPLC, com coluna quiral IA, utilizando como fase móvel hexano/2-propanol 99,7:0,3, com fluxo de 0,3 mL/minuto, com tempo de retenção de 19,1 (*R*) e 22,3 (*S*) minutos.

Processo para a obtenção dos β -hidroxifosfonatos (\pm)-**5a-b**

Os compostos β -hidroxifosfonatos (\pm)-**5a-b** foram sintetizados a partir de cloroacetona **3a** e 2-cloro-1-feniletanona **3b**, respectivamente, em reação com iodeto de potássio em acetonitrila e trimetilfosfito, à temperatura ambiente, conforme descrito por Pietruszka e Wittinstitut (2006), Figura 2, seguido de redução com borihidreto de sódio (NaBH_4), fornecendo rendimentos isolados superiores a 98,8% após purificação em sistema de cromatografia Biotage, utilizando acetona como eluente.

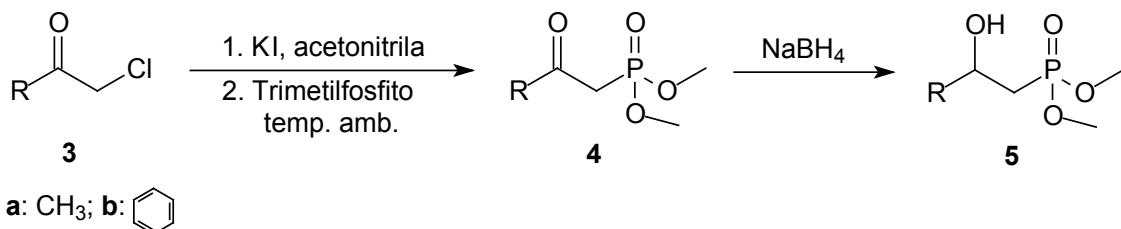


Figura 2 - Síntese de β -hidroxifosfonatos (\pm)-**5a-b**.

(\pm)-(2-oxopropil)fosfonato de dimetila (\pm)-**4a**: quando 2,0 g (21,74 mmol) de cloroacetona **3a** 5,8 g de KI, em 100 mL de diclorometano, e em seguida, foi adicionado 2,8 mL (22,58 mmol) de trimetilfosfito. Após 2 horas de agitação o produto foi filtrado e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio e agua. Após rotaevaporação e purificação do produto através do sistema Biotage, foi obtido 2,8 g de (\pm)-**4a**, 95,4% de rendimento. RMN de ^1H (400,18 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2,33 (s, 3 H), 3,12 (d, J = 22,8 Hz, 2 H), 3,39 (d, J = 11,2 Hz), 3,81 (d, J = 11,2 Hz, 6H).

(\pm)-(2-oxo-2-feniletil)fosfonato de dimetila (\pm)-**4b**: quando 2,0 g (12,98 mmol) de α -cloroacetofenona **3b** 3,7 g de KI, em 100 mL de diclorometano, e em seguida, foi adicionado 1,6 mL (13,1 mmol) de trimetilfosfito. Após 2 horas de reação o produto foi filtrado e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio e agua. Após rotaevaporação e purificação do produto através do sistema Biotage, foi obtido 2,7 g de (\pm)-**4b**, 91,1% de rendimento. RMN ^1H (400,18 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,65 (d, J = 22,6 Hz, 2H), 3,78 (d, J = 11,2 Hz, 6H), 7,47-7,51 (m, 2H), 7,58-7,62 (m, 1H), 7,99-8,01 (m, 2 H).

Os α -hidroxifosfonatos (\pm)-**5a** e (\pm)-**5b** foram sintetizados por redução dos β -cetofosfonatos (\pm)-**4a** e (\pm)-**4b** com NaBH_4 , em metanol, onde a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 30 minutos. O produto bruto foi extraído com éter-etílico e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio e água, seco com sulfato de sódio anidro, rotaevaporado e purificado através de sistema de cromatografia Isolera One da Biotage utilizando gradiente de solvente éter-etílico/acetona.

(2-hidroxipropil)fosfonato de dimetila (\pm)-**5a**: quando 0,5 g (3,01 mmol) de **4b** foi reduzido com NaBH_4 forneceu (\pm)-**5a** com rendimento de 0,50 g, 98,8%. RMN ^1H (400,18 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,98-2,20 (m, 2H); 3,50 (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 4,57 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5,01 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 7,10-7,30 (m, 5H). HPLC, com coluna quiral OJ-H, utilizando como fase móvel hexano/2-propanol 95:05, com fluxo de 0,5 mL/minuto, com tempo de retenção de 8,7 (*R*) e 9,8 (*S*) minutos.

(2-hidroxi-2-feniletil)fosfonato de dimetila (\pm)-**5b**: quando 0,5 g (2,19 mmol) de **4b** foi reduzido com NaBH_4 forneceu (\pm)-**5b** com rendimento de 0,45 g, 99,1%, como um óleo amarelo claro. RMN ^1H (400,18 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2,20-2,30 (m, 2H), 3,70 (d, J = 11,0 Hz, 3H), 3,80 (d, J = 11,0 Hz, 3H), 5,10-5,16 (m, 1H), 7,30-7,40 (m, 5H). HPLC, com coluna quiral OJ-H, utilizando como fase móvel hexano/2-propanol 95:05, com fluxo de 0,5 mL/minuto, com tempo de retenção de 11,7 (*R*) e 14,8 (*S*) minutos.

Processo para a obtenção dos α -butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b**

Os α -hidroxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -hidroxifosfonatos (\pm)-**7a-b** foram esterificados

utilizando anidrido butírico e 0,5 mol% de dimetilaminopiridina - DMAP, como catalisador, em diclorometano à temperatura ambiente, fornecendo os compostos (\pm)-**6a-c** e (\pm)-**7a-b** com rendimentos superiores a 85% após purificação em sistema de cromatografia Biotage, utilizando gradiente acetona/metanol, Figura 3.

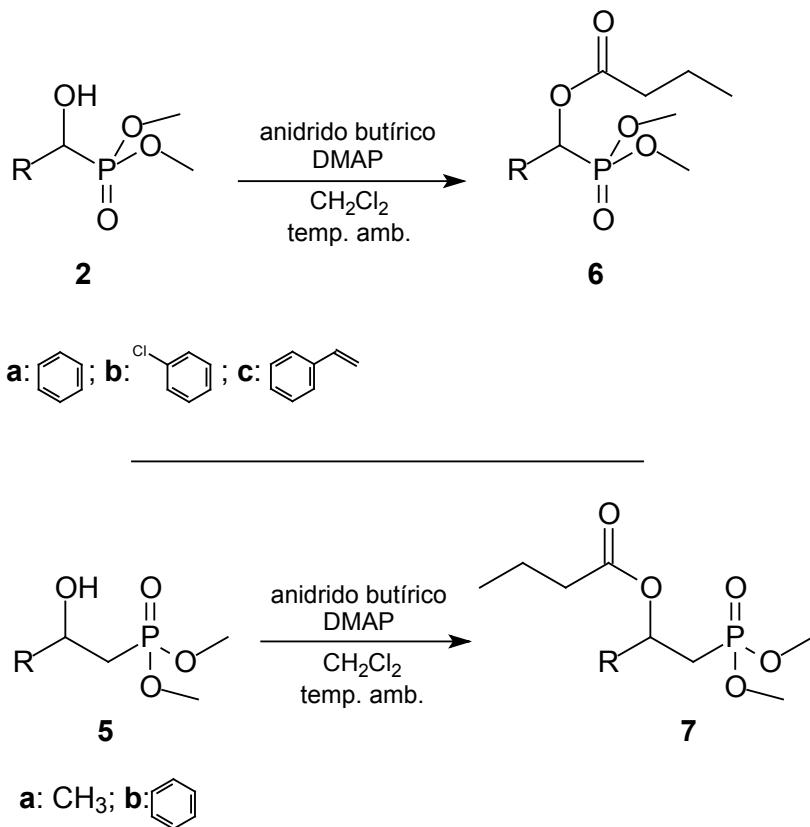


Figura 3 - Síntese de de α -butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b**.

(dimetoxifosforil)fenil metil butirato (\pm)-**6a**: quando 0,50 g (2,31 mmol) de **2a** reagiu com 0,47 g (2,97 mmol) anidrido butírico e 0,5 mol% de DMAP, em 30 mL de diclorometano à temperatura ambiente, forneceu o composto (\pm)-**6a** com rendimento de 0,593, 89,5%. Sendo caracterizado por Infravermelho - IV (filme), ν_{max} : 3039, 3007, 2957, 2850, 1730, 1490, 1352, 1254, 1207, 1193, 1085, 1053, 1027, 861, 790, 776, 700, 653, 553, 518, cm⁻¹

(3-clorofenil)(dimetoxifosforil)metil butirato (\pm)-**6b**: quando 0,50 g (1,99 mmol) de **2b** reagiu com 0,47 g (2,97 mmol) anidrido butírico e 0,5 mol% de DMAP, em 30 mL de diclorometano à temperatura ambiente, forneceu o composto (\pm)-**6b** com rendimento de 0,55 g, 86%. Sendo caracterizado por Infravermelho - IV (filme), ν_{max} : 3065, 3020, 2968, 1735, 1465, 1442, 1210, 1188, 1074, 859, 842, 789, 778, 756, , 623, 573, 537 cm⁻¹.

(\pm)-1-Dimetoxifosforil-3-fenilalil butirato (\pm)-**6c**: quando 0,50 g (2,06 mmol) de **2c** reagiu com 0,47 g (2,97 mmol) anidrido butírico e 0,5 mol% de DMAP, em 30 mL de diclorometano à temperatura ambiente, fornecendo o composto (\pm)-**6c** com rendimento de 0,55 g, 85,7%. Sendo caracterizado por Infravermelho - IV (filme), ν_{max} :

3084, 3059, 3026, 2981, 2926, 2982, 2910, 2866, 1736, 1480, 1447, 1294, 1229, 1191, 1156, 1053, 1020, 971, 795, 732, 699, 566, 528 cm⁻¹

1-(dimetoxifosforil)propano-2-il butirato (\pm)-**7a**: quando 0,50 g (2.97 mmol) de **5a** reagiu com 0,47 g (2,97 mmol) anidrido butírico e 0,5 mol% de DMAP, em 30 mL de diclorometano à temperatura ambiente, forneceu o composto (\pm)-**7a** com rendimento de 0,60 g, 85%. Sendo caracterizado por Infravermelho - IV (filme), ν_{max} : 2982, 1735, 1460, 1382, 1254, 1184, 1054, 1025, 963 cm⁻¹.

2-(dimetoxifosforil)1-feniletil butirato (\pm)-**7b**: quando 0,50 g (2,17 mmol) de **5b** reagiu com 0,47 g (2,97 mmol) anidrido butírico e 0,5 mol% de DMAP, em 30 mL de diclorometano à temperatura ambiente, forneceu o composto (\pm)-**7b** com rendimento de 0,567, 87%. Sendo caracterizado por Infravermelho - IV (filme), ν_{max} : 3030, 3009, 2972, 1730, 1490, 1380, 1252, 1054, 860, 1025, 963 cm⁻¹.

*Processo de resolução dos α -(\pm)-**6a-c** e β -(\pm)-**7a-b** butiriloxifosfonatos*

As hidrólises enantioseletivas dos (\pm)- α -**6a-c** e (\pm)- β -**7a-c** utilizando lipase de *Candida rugosa* foram realizadas utilizando-se 1 mmol de substrato, mantido sob agitação magnética em sistema bifásico, com 2 mL de éter diisopropílico e 2 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7 contendo 1,2 M de MgCl₂ (240 mg), \diamond temperatura de 40 °C, por 4-24 h, com excelentes rendimentos químicos de 78-92%, considerando a conversão obtida de 30% nas reações de hidrólise e o rendimento isolado (%) foi calculado em relação a 50% de resolução enzimática. Após purificação em sistema de cromatografia Isolera One da Biotage, utilizando gradiente de hexano-acetona como fase móvel.

As configurações absolutas foram determinadas através da comparação das medidas de rotação óptica ([α]_D²⁵) dos compostos obtidos (*R*)-**2a-c** e (*R*)-**5a-b** com as descritas na literatura (SUN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2003 e 2002; ROWE e SPILLING, 2001).

(*R*)-(+)-(hidroxy(fenil)metil)fosfonato de dimetila (*R*)-(+)-**2a**: quando 0,286 g (1 mmol) de (\pm)- α -**6a** foi submetido ao processo de hidrólise enantioseletiva mediada por lipase de *Candida rugosa*, forneceu o (*R*)-(+)-**2a** com rendimento de 17,1 mg (52.8%), de um sólido branco com ponto de fusão de 92,6-93,5 °C, [α]_D²⁰ = +44°, c 1, CHCl₃ (α]_D²⁵ = -44,3° (c 1, CHCl₃) para o isômero (*S*)). O espectro de RMN de ¹H é similar ao do composto racêmico (\pm)-**2a**.

(*R*)-(+)-(3-clorofenil(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (*R*)-(+)-**2b**: quando 0,321 g (1 mmol) de (\pm)- α -**6b** foi submetido ao processo de hidrólise enantioseletiva mediada por lipase de *Candida rugosa*, forneceu o (*R*)-(+)-**2b** com rendimento de 20 mg (50,4%), de um sólido branco com ponto de fusão de 133,4-134,8 °C, [α]_D²⁰ = +28°, c 1, CHCl₃ (α]_D²⁵ = +21,5° (c 2, CDCl₃) para o isômero (*R*)). O espectro de RMN de ¹H é similar ao do composto racêmico (\pm)-**2b**.

(R)-*(+)*-Dimetil (1-hidroxi-3-fenil-2-propenil)fosfonato (*R*)-*(+)*-**2c**: quando 0,312 g (1 mmol) de (\pm) -**6c** foi submetido ao processo de hidrólise enantiosseletiva mediada por lipase de *Candida rugosa*, forneceu o (*R*)-*(+)*-**2c** com rendimento de 18,6 mg (51,2%), de um sólido branco com ponto de fusão de 98,6-101,6 °C, $[\alpha]_D^{20} = +38,3^\circ$, c 1, CHCl_3 ($[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$, c 2, CDCl_3 , para o isômero (*R*)). O espectro de RMN de ^1H é similar ao do composto racêmico (\pm) -**2c**.

(R)-*(-)*-(2-hidroxipropil)fosfonato de dimetila (*R*)-*(-)*-**5a**: quando 0,238 g (1 mmol) de (\pm) -**7a** foi submetido ao processo de hidrólise enantiosseletiva mediada por lipase de *Candida rugosa*, forneceu o (*R*)-*(+)*-**5a** com rendimento de 11,8 mg (46,8%), de um líquido incolor, $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$, c 1, CHCl_3 ($[\alpha]_D^{20} = -1,4^\circ$, c 0,46, acetona, para o isômero (*R*)-**5a**). O espectro de RMN de ^1H é similar ao do composto racêmico (\pm) -**5a**.

(R)-*(-)*-(2-hidroxi-2-feniletil)fosfonato de dimetila (*R*)-*(-)*-**5b**: quando 0,300 g (1 mmol) de (\pm) -**7b** foi submetido ao processo de hidrólise enantiosseletiva mediada por lipase de *Candida rugosa*, forneceu o (*R*)-*(-)*-**5b** com rendimento de 17,40 mg (50,4%), de um sólido cristalino. $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$, c 1, CHCl_3 ($[\alpha]_D^{20} = -10$, c 0,5, CDCl_3 , para o isômero (*R*)-**5b**). O espectro de RMN de ^1H é similar ao do composto racêmico (\pm) -**5b**.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As hidrólises enantiosseletivas de α -butiriloxifosfonatos (\pm) -**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm) -**7a-b** mediadas por lipase de *Candida rugosa* forneceram os α -hidroxifosfonatos (*R*)-*(+)*-**6a-c** e β -hidroxifosfonatos (*R*)-*(+)*-**7a-b** e estão representados na Figura 4.

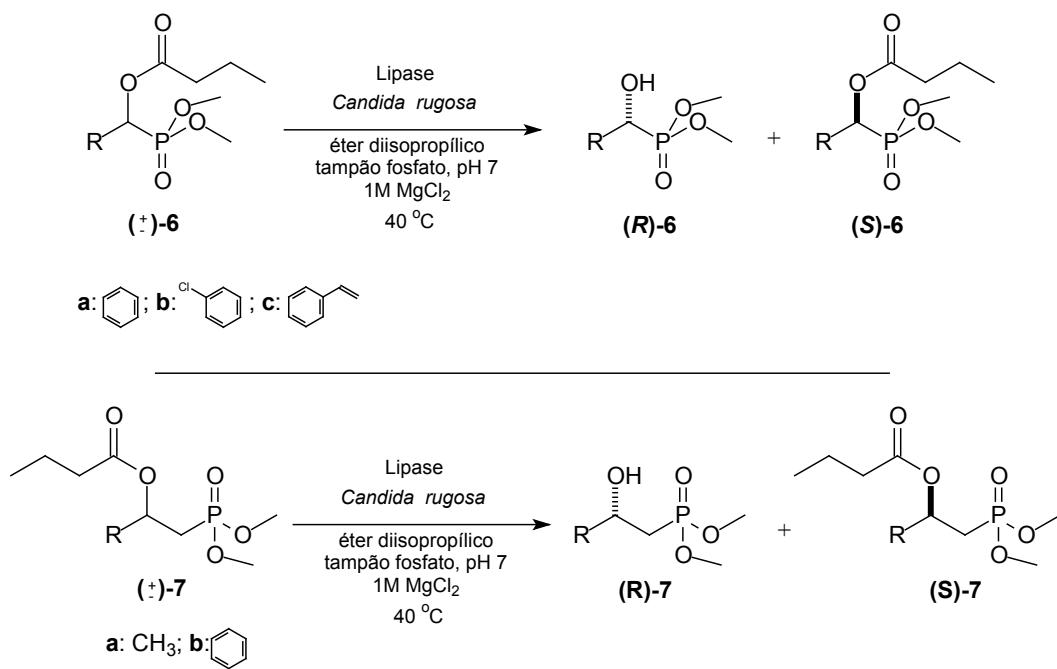


Figura 4 - Hidrólise enantiosseletiva de α -butiriloxifosfonatos (\pm) -**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm) -**7a-b**.

Na Tabela 1, estão reportados os rendimentos químicos, isolados, e os excessos enantioméricos dos compostos α -hidroxifosfonatos (*R*)-**2a-c** β -hidroxifosfonatos (*R*)-**5a-b** obtidos das reações de hidrólise enantiosseletiva de α -butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b**, respectivamente, mediadas por lipase de *Candida rugosa*.

Substrato	Produto	Tempo (h)	Rendimento isolado (%)	$[\alpha]_D^{25}$	ee (%)	E (%)
6a	(<i>R</i>)- 2a	24	52,8	+39,1	>99	>200
6b	(<i>R</i>)- 2b	24	51,2	+28,8	96,4	81
6c	(<i>R</i>)- 2c	4	55,2	+38,3	>99	>200
7a	(<i>R</i>)- 5a	24	46,8	+14	97,8	135
7b	(<i>R</i>)- 5b	12	50,4	+28	98,5	>200

Tabela 1 - Hidrólise enantiosseletiva de α -butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β -butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b** mediada por lipase de *Candida rugosa*.^a

^a 1 mmol de substrato foi dissolvido em 2 mL de éter diisopropílico e adicionados a uma suspensão de 80 mg de lipase de *Candida rugosa* em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7, e 240 mg de MgCl₂, mantendo a mistura reacional sob agitação magnética e à temperatura de 40 °C. As reações foram monitoradas por CGMS até conversão de 30%.^b Rendimento isolado (%) calculado em relação a 50% de resolução enzimática.

As reações de hidrólise enantiosseletivas foram conduzidas em sistema bifásico utilizando éter diisopropílico e tampão fosfato 0,1 M, pH 7, com adição de 1,2 M de MgCl₂, que tem a função de diminuir a agregação da enzima no sistema bifásico, proporcionando uma melhor performance do processo biocatalítico (ZHANG et al., 2003; OKAMOTO, 2000; KVITTINGEN et al., 1992).

Desta maneira, as reações de hidrólise enantiosseletiva forneceram rendimentos químicos, isolados, superiores a 46,8%, ee 96,4 a >99% e valores de Enantiosseletividade (E) superiores a 81%, o que demonstra que o processo é uma excelente metodologia de síntese para a produção de α - e β -hidroxifosfonatos opticamente ativos.

As configurações absolutas foram determinadas através da comparação das medidas de rotação óptica ($[\alpha]_D^{25}$) com as descritas na literatura (SUN et al., 2013; ZHANG et al., 2003), e os valores E (%) foram calculados de acordo com Yuan et al. (2003) e Rowe e Spilling (2001).

Estudos complementares para maior compreensão do processo biocatalítico serão realizados para otimização do processo de obtenção dos α - e β -hidroxifosfonatos opticamente ativos, bem como aumento do número de compostos com diferentes substituintes e serão reportados futuramente.

É importante ressaltar que estes compostos α- e β-hidroxifosfonatos opticamente ativos podem ser utilizados em rotas sintéticas para a produção de intermediários para as indústrias de química fina, agroquímica e farmacêutica.

4 | CONCLUSÕES

Os resultados obtidos das reações de hidrólise enantioseletivas de α-butiriloxifosfonatos (\pm)-**6a-c** e β-butiriloxifosfonatos (\pm)-**7a-b** mediadas por lipase de *Candida rugosa* demonstraram que a metodologia empregada para obtenção de (*R*)-(+) -**2a-c** e (*R*)-(+) -**5a-b** é de extrema importância, pois forneceram rendimentos químicos superiores a 46,8% e ee 96,4 a \geq 99%.

5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a cessão da lipase *Candida rugosa* pela empresa Amano Enzyme Inc. e aos suportes financeiros da CAPES-PNPD, CNPq e FAPESP (2016/12074-7).

REFERÊNCIAS

- BRZEZIŃSKA-RODAK, M.; KLIMEK-OCHAB, M.; ŻYMAŃCZYK-DUDA, E.; KAFARSKI, P. Biocatalytic resolution of enantiomeric mixtures of 1-aminoethanephosphonic acid. *Mol.*, v. 16, p. 5896-5904, 2011.
- KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B. Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxy phosphonates. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 29, p. 99-104, 2004.
- KVITTINGEN, L.; SJURSNES, B.; ANTHONSEN, T.; HAILING, P. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron* v. 48, p. 2793-2802, 1992.
- OKAMOTO, T.; UEJI, S. A new method for improving the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ions. *Biotechnol. Lett.*, v. 22, p. 1169-1171, 2000.
- PIETRUSZKA, J.; WITTINSTITUT, A. Synthesis of the Bestmann-Ohira reagent. *Synthesis*, v. 24, p. 4266-4268, 2006.
- ROWE, B. J.; SPILLING, C. D. The synthesis of 1-hydroxy phosphonates of high enantiomeric excess using sequential asymmetric reactions: titanium alkoxide-catalyzed P-C bond formation and kinetic resolution. *Tetrahedron Asymmetry* v. 12, p. 1701-1708, 2001.
- SOBHANI, S.; TASHRIFI, Z. Synthesis of α-functionalized phosphonates from α-hydroxy phosphonates. *Tetrahedron* v. 66, p. 1429-1439, 2010.
- SUN, L.; GUO, Q.-P.; LI, X.; ZHANG, L.; LI, Y.-Y.; DA, C.-S. C₂-Symmetric homobimetallic zinc complexes as chiral catalysts for the highly Enantioselective hydrophosphonylation of aldehydes. *Asian J. Org. Chem.*, v. 2, p. 1031-1035, 2013.

VAHIDAT, S. M.; BAHARFAR, R.; TAJBAKHSH, M.; HEYDARI, A.; BAGBANIAN, S. M.; KHAKSAR, S. Organocatalytic synthesis of α -hydroxy and α -aminophosphonates. *Tetrahedron Lett.*, v. 49, p. 6501-6504, 2008.

YAMAGISHI, T.; MIYAME, T.; YOKOMATSU, T.; SHIBUYA, S. Lipase-catalyzed kinetic resolution of α -hydroxy-H-phosphinates. *Tetrahedron Lett.*, v. 45, p. 6713-6716, 2004.

YUAN, C.-Y.; WANG, K.; LI, Z.-Y. Enantioselective reduction of 2-keto-3-haloalkane phosphonates by baker's yeast. *Heteroatom Chem.*, v. 12, p. 551-556, 2001.

ZHANG, Y.-H.; XU, C.-F.; LI, J.-F.; YUAN, C.-Y. *Candida rugosa* lipase-catalyzed kinetic resolution of hydroxyalkanephosphonates. *Chin. J. Chem.*, v. 21, p. 883-892, 2003.

ZHANG, Y.; YUAN, C.; LI, Z. Kinetic resolution of hydroxyalkanephosphonates catalyzed by *Candida antartica* lipase B in organic media. *Tetrahedron*, v. 58, p. 2973-2978, 2002.

ZOU, J.; LI, D.; LIU, K.; ZHOU, S. Preparation method of beta-hydroxyphosphonate derivatives. Soochow University - Chine, patent CN104370960, 2015.

ŻYMAŃCZYK-DUDA, E.; BRZEZIŃSKA-RODAK, M.; KLIMEK-OCHAB, M.; LEJCZAK, B. Application of the *Beauveria bassiana* strain for the enantioselective oxidation of the diethyl 1-hydroxy-1-phenylmethanephosphonate. *Curr. Microbiol.*, v. 62, p. 1168-1172, 2011.

IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS DAS CASCAS E AMÊndoAS DO TUCUMÃ POR MEIO DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO POR BIOFILMES COM *C. ALBICANS*

Luis Fhernando Mendonça da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Amazonas - IFAM
Manaus – Amazonas

Ana Cláudia Rodrigues de Melo

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Amazonas - IFAM
Manaus – Amazonas

inibida por extratos do Tucumã em comparação com o controle negativo.

PALAVRAS-CHAVE: Tucumã. Prospecção fitoquímica. Biofilme.

ABSTRACT: The use of recycling of vegetable waste has become increasingly prominent, recurring to the effects of environmental degradation from industrial and urban activities that are reaching increasingly worrying levels, as well as being low cost raw materials, which "popularizes" their use. The tucumã is a typical fruit of the north region with great economic factor, among them food and cosmetics. The objective of this study was to identify constituents by means of phytochemical prospection and to evaluate the inhibition of fungus biofilms with extracts of the tucumã shells and almonds. For this, it was carried out hot and cold extraction in the fruit peels and almonds. From the obtained extract, it was carried out phytochemical prospection and inhibition test in the formation of biofilm. An important composition of secondary metabolites was verified and biofilm formation by *C. albicans* was significantly inhibited by extracts of Tucuman compared to the negative control.

KEYWORDS: Tucumã. Phytochemical prospecting. Biofilm.

RESUMO: A utilização da reciclagem de resíduos vegetais vem ganhando destaque cada vez maior, recorrente aos efeitos da degradação ambiental realizadas de atividades industriais e urbanas que estão atingindo níveis cada vez mais preocupantes, além de serem matérias primas de baixo custo, o que "populariza" a sua utilização. O tucumã é um fruto típico da região norte com grande fator econômico, entre eles alimentício e de cosméticos. O estudo realizado tem como objetivo de identificar constituintes por meio de prospecção fitoquímica e avaliar a inibição de biofilmes de fungo com os extratos das cascas e amêndoas do tucumã. Para isso, foi realizada extração à quente e a frio nas cascas e amêndoas do fruto. Do extrato obtido, foi realizado prospecção fitoquímica e ensaio de inibição na formação de biofilme. Foi verificada uma composição importante de metabólitos secundários e a formação de biofilme por *C. albicans* foi significativamente

1 | INTRODUÇÃO

1.1 Tucumã

As palmeiras (Arecaceae) apresentam distribuição pantropical, com representantes distribuídos em todo o mundo em, aproximadamente, 200 gêneros e 1500 espécies. Nas Américas os representantes da família Arecaceae estão distribuídos em 67 gêneros e 550 espécies, sendo os mais representativos *Chamaedorea*, *Bactris* e *Geonoma*. Na Amazônia, a maioria das espécies é do gênero *Bactris*, *Geonoma* e *Astrocaryum* (HENDERSON et al., 1995).

O gênero *Astrocaryum* apresenta diversas variações de espécimes, tais como: *Astrocaryum vulgare* Mart., *A. aculeatum* Meyer., *A. segregatum* Dr., *A. princeps* Bard., *A. giganteum* Bar., *A. tucumã* Mart., *A. acaule* Mart., *A. cantensis*, *A. chonta* Mart., *A. leisphota* Bard., *A. undata* Mart. No entanto, nos Estados do Pará e Amapá, a espécie comumente encontrada é o *A. vulgare* Mart (VILLACHICA et al., 1996).

O Tucumã (*Astrocaryum sp*) é um fruto típico da região norte do Brasil, pertencente à família da Arecaceae. Segundo o Ferreira (2009), a palmeira pode atingir 15 m de altura, e cresce próximo a rios e em áreas não cobertas por água, em terra firme; podendo florescer e frutificar quase um ano. Produz, em média, de três a quatro cachos por ano, com uma quantidade em torno de 240 frutos por cacho, tendo como produtividade da palmeira em torno de 12 kg/ano (SHANLEY; MEDINA, 2005).

A atividade de exploração do tucumã gira em torno da comercialização da polpa do fruto, a qual é utilizada para o consumo *in natura* ou na fabricação de licores, doces, sorvetes, sucos e para o popular sanduíche de tucumã. Além disso, da polpa e da semente do fruto, são extraídos ainda diferentes óleos comestíveis (MENDONÇA, 1996).

O tucumã tem peso variando entre 20 e 100 gramas, com coloração da casca em tons de verde ou amarelo. O comprimento do fruto gira em torno de 4,5 a 6,0 cm e o diâmetro de 3,5 a 4,5 cm. A polpa, de consistência firme, possui coloração que vai do amarelo ao alaranjado, contendo 9% de proteínas, 55% de óleo e representando 22% do peso do fruto (SHANLEY; MEDINA, 2005).

Foram identificadas na polpa do tucumã as seguintes substâncias: carotenoides, sendo 21 formas diferentes, com predominância de 75% do beta-caroteno todo trans; flavonoides como catequina e queracetina, além de ácido ascórbico (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; GONÇALVES, 2008). Barbosa et al. (2009), através de análises cromatográficas, identificaram um excelente potencial na produção de biocombustível a partir do óleo extraído das amêndoas do tucumã. O endocarpo (amêndoas) constituiu 45% do fruto, o que revela a possibilidade de produção de óleo obtido para a indústria e como combustível alternativo ao diesel, pois se extraí entre 40-50% de óleo, cujos ácidos graxos são 90% (FERREIRA, 2009). Com relação à casca, pouco se tem conhecimento. Os índios Apurinã afirmam que a casca do tucumã, quando preta,

apresenta propriedades energéticas e é um protetor espiritual (SHANLEY; MEDINA, 2005).

O mesocarpo (polpa) do tucumã é uma fonte altamente calórica, devido de ter em média, 46% de umidade, 5% de proteínas, 30% de lipídios, 9% de fibras e 3% em minerais (YUYAMA, 2008; FERREIRA, 2009).

Segundo Rego et al. (2007), pelo processo de extração de lipídios do fruto de tucumã por hidrólise alcalina, se mostrou com rendimento de 19,88% na amêndoas, 38,7% casca e polpa 52,9%. O mesocarpo, epicarpo e o óleo de tucumã mostraram altos teores de β-caroteno, podendo ter grandes possibilidades de ser aplicado como ingredientes visando à suplementação de pró-vitamina A em produtos alimentícios (FERREIRA, 2009).

Segundo Melo et al. (2016), o endocarpo possui atividade de inibição na formação de biofilme da *C. albicans*. Além do mais, o estudo fitoquímico revela uma composição principal de terpenos e fenóis.

1.2 Biofilme

O biofilme é uma comunidade estruturada de células de microrganismos, embebida em uma matriz extracelular polimérica e aderente a uma superfície inerte ou viva formando uma estrutura tridimensional. Essas células inicialmente se aderem à superfície, podendo ser a mucosa ou um dispositivo médico e, depois começam a produzir a matriz extracelular polimérica. Com o amadurecimento do biofilme, sua estrutura possui uma arquitetura característica que possibilita uma propriedade fenotípica distinta da sua forma planctônica, principalmente a resistência a antimicrobianos. As maiores vantagens dos microrganismos se organizarem em comunidades consistem na maior facilidade de captação de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e uma maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos. A resistência a antifúngicos é adquirida no início da formação do biofilme, e aparentemente é regida por diferentes mecanismos em biofilme novo e maduro. Sendo assim, novas terapias são necessárias para eliminar o biofilme (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; JETT et al., 1997; MUKHERKJEE et al., 2005 apud SUZUKY, 2014).

O biofilme formado pela *C. albicans* possui uma comprovada resistência a antifúngicos e sua patogenicidade está fortemente relacionada a infecções hospitalares. Em sua maioria, estas infecções evoluem para um quadro de disseminação na corrente sanguínea, podendo ocasionar a morte do paciente. Alguns estudos descrevem a difícil penetração e difusão de fármacos no biofilme, com redução de concentração de até 80%, relatando ser este um dos fatores de resistência. A busca de novas modalidades terapêuticas é imperativa, e dentre estas novas propostas encontra-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana para redução de *C. albicans* organizada em biofilme (PRATES et al., 2008; CHANDRA et al., 2001; KUHN et al., 2002; DE BEER;

SRINIVASAN; P.S., 1994; DAVIES, 2003 apud SUZUKY, 2014).

Cândida Albicans é um fungo normalmente encontrado no corpo humano, sem, contudo, ocasionar um processo patológico em indivíduos saudáveis. Este microrganismo pode ser facilmente recuperado da mucosa oral, trato gastrointestinal, vagina, pele. Entretanto, sob certas circunstâncias, este microrganismo pode causar uma infecção conhecida como condílose, que acomete principalmente pacientes imunodeficientes, podendo evoluir para infecção sistêmica. O principal agente das candidíases é a *C. albicans*, onde maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, ela é considerada uma micose oportunista (SUZUKY, 2014; BARBEDO; SGARBI, 2010).

A capacidade de levedura em aderir, infectar e causar doença em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados. Principalmente a formação, em uma superfície, de comunidades microbianas denominadas de biofilme (SUZUKY, 2014).

Em meio às centenas de espécies descritas, as leveduras do gênero *Cândida* são os maiores responsáveis pelas infecções hospitalares, e se tornaram um desafio de sobrevida de pacientes com doenças graves e em período pós-operatório. Em hospitais norte-americanos com o sistema de vigilância, classificaram o *Cândida* como 6º patógeno nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais (LEVY, 2004).

O lixo é um dos problemas mais graves que é enfrentado por todos os países, várias são as reuniões para minimizar o impacto que é gerado pelo descarte de forma incorreta. Vários projetos de reciclagem têm sido bem sucedidos no Brasil e dentre eles, destacam-se, o aproveitamento de papel, plásticos, metais, sementes de plantas e entre outros. Dentro disso, os frutos amazônicos têm se destacado por seus excelentes potenciais terapêuticos em diversos ensaios experimentais. O tucumã é um fruto que carece de informações relacionadas aos seus constituintes químicos (GARCIA, 2012). Portanto, esse artigo buscou pesquisar e identificar constituintes químicos presentes nos metabólitos secundários por meio de prospecção fitoquímica e avaliar a inibição de biofilmes do fungo *C. albicans* usando extratos das cascas e amêndoas do tucumã (*Astrocaryum sp*), que são partes normalmente descartadas como lixo.

2 | METODOLOGIA

O trabalho teve início com a utilização de amêndoas de cascas e caroços do tucumã (*Astrocaryum sp*) coletadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa (localizado no Centro da Cidade de Manaus/AM). Em seguida, os caroços e as cascas foram

selecionados, lavados e colocados ao sol para secar. Após esse período, as cascas e os caroços foram triturados com auxílio de um liquidificador. Em seguida, essa biomassa foi pesada e feito a extração à quente utilizando o sistema do extrator Soxhlet e a frio por maceração.

Para as amostras das cascas do tucumã (*Astrocaryum sp*) foi usado 148 g de material vegetal e os solventes usados no extrator Soxhlet foram hexano PA e etanol PA, que depois de secos essas amostras foram guardadas em refrigeração.

Para a extração das amostras das amêndoas do tucumã foi usado 359 g em sistema Soxhlet e o processo foi semelhante ao descrito anteriormente. Enquanto que na extração por maceração, foi utilizado 38 g do material vegetal concentrados em rotaevaporador nos mesmos solventes já descritos e após secagem foram guardados em refrigeração. Os testes de prospecção fitoquímica foram baseados na metodologia descrita por Matos (2009).

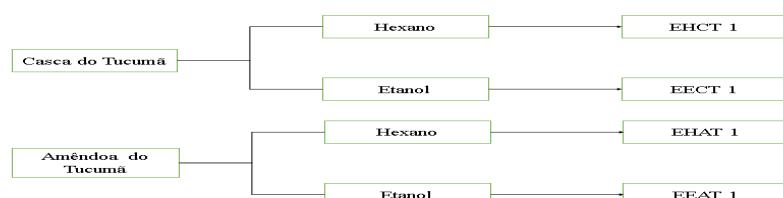
Para realização do ensaio de inibição da *Cândida albicans*, foi utilizado 10 mg de cada extrato, sendo feito por meio do Teste T-screening com uso de microplacas de 96 poços, *Cândida albicans* como patógeno e o meio de cultura foi TSB (caldo trutona de soja), para controle positivo (C+) o antifúngico usado foi fluconazol e para controle negativo (C-) foi utilizado apenas água e caldo. Para diluição dos extratos foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%.

O inóculo foi ativado em 5 mL de caldo BHI estéril, com 100 a 200mL da cepa padrão, incubado em estufa de crescimento a 37 °C por 24 horas. Calculado a concentração do inóculo pela contagem em câmara de Neubauer.

A leitura das microplacas foi realizada em triplicata em espectrofotômetro Elisa com faixa de 630nm, onde a primeira leitura foi realizada logo após a inoculação do patógeno (T_0), a segunda após o período de incubação (T_{24}) e a terceira após a coloração e ressuspensão do biofilme (Tb).

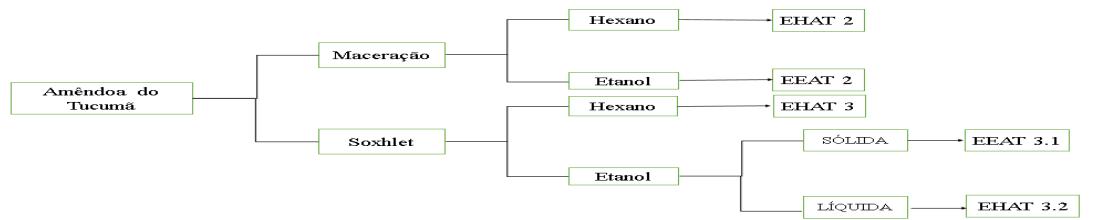
3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fluxogramas 1 e 2 mostram os extratos obtidos segundo o método utilizado e seu devido código de identificação.



Fluxograma 1 - Extração por Soxhlet das amostras das cascas e amêndoas do Tucumã (*Astrocaryum sp*), usando como solventes hexano PA e Etanol PA.

EHCT: Extrato Hexânico da Casca do Tucumã; EECT: Extrato Etanólico da Casca do Tucumã.



Fluxograma 2 - Extrações por maceração e Soxhlet das amostras das amêndoas do tucumã (*Astrocaryum sp*), usando como solventes hexano PA e Etanol PA.

EHAT: Extrato Hexânico da Amêndoas do Tucumã; EEAT: Extrato Etanólico da Amêndoas do Tucumã.

O fluxograma 1 representa a primeira extração realizada por meio do extrator Soxhlet, enquanto que o fluxograma 2 representa as extrações (maceração e Soxhlet) das amêndoas do tucumã. Todas as amostras extraídas se apresentaram sólidas lembrando a aparência de manteiga. Apenas a amostra EEAT 3 apresentou duas fases uma sólida (EEAT 3.1) e outra líquida (EEAT 3.2).

Após a extração foi calculado o rendimento de cada extrato que variou entre 4,6% (EECT 1) a 59,2% (EEAT 2), segundo a Tabela 1.

EXTRATO	RENDIMENTO (%)
EHCT 1	10, 8 %
EECT 1	4, 6 %
EHAT 1	7, 5 %
EEAT 1	10, 8 %
EHAT 2	25, 3 %
EEAT 2	59, 2 %
EHAT 3	7, 7 %
EEAT 3.1	12, 6 %
EEAT 3.2	23, 9%

Tabela 1 – Rendimentos obtidos das amostras dos extratos hexânico e etanólico do tucumã (*Astrocaryum sp*).

Na tabela 2, são mostrados os resultados da prospecção química realizada das amostras das cascas e amêndoas do Tucumã, sendo o sinal positivo (+) indicando a presença do constituinte e, o sinal negativo (-), indicando que o teste deu negativo para determinado constituinte.

Constituentes Detectados	EHCT 1	EECT 1	EHAT 1	EEAT 1	EHAT 2	EEAT 2	EHAT 3	EEAT 3.1	EEEAT 3.2
Fenóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Alcalóides	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Esteróides	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Triterpenos	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Cumarinas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonois	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavanonas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavanonois	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Xantonas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica das amostras das cascas e amêndoas do Tucumã (*Astrocaryum sp*)

Os testes de prospecção fitoquímica segundo a metodologia usada por Matos (2009), revelaram para taninos, a formação de precipitado azul ou verde indicando a presença do mesmo nos extratos EECT 1 e EEAT 3.2. Segundo Pansera et al. (2003 apud GARCIA, 2012) os taninos aparecem em maiores concentrações nas cascas e folhas de vegetais quando comparados à polpa dos frutos, uma vez que o tucumã apresenta quatro vezes mais taninos na casca em relação à polpa. Os taninos apresentam atividade antioxidante, antiinflamatória, cicatrizante e são responsáveis pela adstringência de alguns frutos, como no caso do tucumã (MONTEIRO et al., 2005).

No teste para detectar alcalóides, a formação de precipitado insolúvel e floculoso indicou a sua presença nos extratos EHCT 1, EECT 1, EHAT 1, EEAT 1, EEAT 2, EEAT 3.2. Para Sagrillo (2014) e Garcia (2012), o extrato etanólico da casca do tucumã possui uma alta concentração de alcaloides quando comparado a polpa do fruto. E quando comparado a outras frutas, o tucumã possui uma concentração considerada baixa.

Os triterpenos foram detectados quando a coloração variou de parda a vermelha e obteve-se resultado positivo para os extratos EHAT 1, EEAT 1, EHAT 2, EHAT 3. A formação de espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença das saponinas, sendo positivo nos extratos EHAT 1, EEAT 1, EHAT 2, EHAT 3. As saponinas podem formar complexos com proteínas e fosfolipídios da membrana celular, determinando suas ações biológicas, essa propriedade pode alterar a permeabilidade das membranas, podendo ajudar na absorção de substâncias ou pode destruí-la, indicando uma característica tóxica (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDEM, 2007).

As cumarinas foram detectadas no extrato EECT 1, pois apresentou um azul escuro fluorescente na prospecção fitoquímica realizada.

A detecção de flavonóis, flavanonas, flavanonois, xantonas, foi observada apenas no extrato EECT 1.

Esses resultados corroboram com os trabalhos de Sagrillo (2014) e Garcia (2012), mostrando que taninos, alcaloides, flavonoides são metabolitos secundários já detectados em trabalhos do gênero *Astrocaryum*.

Para o ensaio de inibição da formação de biofilmes de *C. albicans*, Jin et al. (2004) descreveram que a adesão de culturas de *C. albicans* tratadas com glicose era

maior que as cultivadas com galactose. Por isso utilizou-se nesse experimento um caldo TSB enriquecido com dextrose (1%).

No primeiro ensaio do estudo de inibição, o patógeno e os extratos foram inoculados em T0 (1^a leitura), incubados por 24h (2^a leitura T₂₄) e foi aplicado corante para leitura do biofilme (3^a leitura TB). Obtendo os seguintes resultados (tabela 3).

Extratos	Média	DP	TC%	Média	DP	TB%
EHCT 1	0,402	0,3	129,6	0,146	0,1	48,03
EECT 1	0,285	0,0	91,9	0,154	0,1	50,66
EHAT 1	0,246	0,1	79,4	0,124	0,0	40,68
EEAT 1	0,236	0,0	76,1	0,120	0,1	39,36
EHAT 2	0,411	0,1	132,5	0,208	0,2	68,53
EEAT 2	0,388	0,2	125,2	0,070	0,1	23,14
EHAT 3	0,306	0,0	98,6	0,063	0,0	20,72
EEAT 3.1	0,246	0,0	79,2	0,171	0,1	56,14
EEAT 3.2	0,261	0,0	84,1	0,179	0,1	58,88
DMSO	0,268	0,1	86,3	0,376	0	123,68
C+	0,031	0,0	10,1	-0,180	0	-59,21
C-	0,310	0,1	-	0,304	0,2	-

Tabela 3. Taxa de crescimento e Taxa de formação de biofilme por *Candida albicans* após 24h de incubação com extratos das amostras das cascas e amêndoas do Tucumã de *Astrocaryum sp.*

DP: Desvio padrão; TC%: Percentual da Taxa de crescimento da *C. albicans*; TB%: Percentual da Taxa de inibição de biofilme; C+: Controle positivo; C-: Controle negativo.

Os extratos do tucumã demonstraram a capacidade de evitar a adesão de *C. albicans* em alguma extensão. A inibição do biofilme (TB%) foi significativamente mais forte nos extratos das amêndoas do que nos extratos cascas. O EHAT 3 induziu o menor percentual de adesão a *C. albicans* (20,72%) e como segundo menor percentual foi o EEAT (23,14%), enquanto o menor valor dos extratos das cascas foi EHCT 1 (48,03%), o que colabora com afirmação feita por Melo et al. (2016), em que o extrato hexânico da amêndoa possui a capacidade de inibir a formação de biofilme da *C. albicans*.

No segundo ensaio, o patógeno foi inoculado em T₀ (1^a leitura), incubado por 24h (2^a leitura T₂₄), recebeu a inoculação dos extratos (3^a leitura T_{24e}), foi incubado por mais 24h (4^a leitura T_{48e}) e recebeu aplicação de corante para leitura do biofilme (5^a leitura T_{48B}). Neste ensaio, o patógeno teve 24h para crescer e formar biofilme antes do contato com os extratos (tabela 4).

	Crescimento após 24h de incubação		Crescimento após 24h de incubação e logo após inoculação dos extratos		Crescimento após 48h de incubação pós-inoculação dos extratos		Biofilme persistente 48h	
Extratos	Média e DP	TC%	Média e DP	TC%	Média e DP	TC%	Média e DP	TB%

EHCT 1	0,421 ± 0,0	115,6	0,468 ± 0,1	178,5	0,531 ± 0,1	126,4	0,257 ± 0,0	98,0
EECT 1	0,406 ± 0,1	111,5	0,364 ± 0,1	138,9	0,689 ± 0,2	164,1	0,346 ± 0,0	131,9
EHAT 1	0,375 ± 0,1	103,0	0,287 ± 0,0	109,4	0,455 ± 0,0	108,3	0,240 ± 0,0	91,6
EEAT 1	0,391 ± 0,1	107,4	0,287 ± 0,0	109,7	0,523 ± 0,1	124,4	0,369 ± 0,2	140,7
EHAT 2	0,334 ± 0,1	91,8	0,320 ± 0,1	122,0	0,565 ± 0,0	134,6	0,343 ± 0,1	131,0
EEAT 2	0,356 ± 0,1	97,8	0,314 ± 0,1	119,8	0,529 ± 0,0	126,0	0,398 ± 0,2	152,0
EHAT 3	0,308 ± 0,0	84,5	0,162 ± 0,1	61,7	0,420 ± 0,0	99,9	0,405 ± 0,3	154,5
EEAT 3.1	0,302 ± 0,0	83,0	0,221 ± 0,1	84,5	0,493 ± 0,01	117,5	0,256 ± 0,0	97,7
EEAT 3.2	0,454 ± 0,0	124,8	0,247 ± 0,0	94,1	0,343 ± 0,0	81,7	0,530 ± 0,0	202,4
DMSO	-0,004 ± 0,0	-1,2	-0,001 ± 0,0	-0,5	-0,014 ± 0,0	-3,3	-0,021 ± 0,0	-8,1
C(+)	0,304 ± 0,0	83,6	0,284 ± 0,1	108,3	0,033 ± 0,0	7,8	-0,054 ± 0,0	98,0
C(-)	0,364 ± 0,0	-	0,262 ± 0,1	-	0,420 ± 0,1	-	0,262 ± 0,1	-

Tabela 4. Erradicação do biofilme de *Cândida albicans* (TB%) em resposta a extratos de *Astrocaryum sp.*

DP: Desvio padrão; TC%: Percentual da Taxa de crescimento da *C. albicans*; TB%: Percentual da Taxa de inibição de biofilme; C+: Controle positivo; C-: Controle negativo.

Os valores do TB% foram superiores a TC% nos extratos o Tucumã, isso se deve por conta do amadurecimento do biofilme, pois sua estrutura possui uma arquitetura característica que possibilita uma propriedade fenotípica distinta de sua forma planctônica, principalmente a resistência a antimicrobianos (SUZUKI, 2009). Ambos os extratos do tucumã mostraram melhores resultados na inibição da formação de biofilmes do que na erradicação, o que corrobora com Melo et al. (2016), que afirma que o extrato hexânico e extrato etanólico é mais efetivo que o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para inibição do biofilme formado pela *C. albicans*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tucumã é um fruto bastante utilizado em vários ramos da indústria e do comércio, entre eles alimentício e de cosméticos, com isso foi realizado o estudo com o fruto que tem forte importância para a região Norte do país. O artigo teve como objetivo identificar constituintes por meio de prospecção fitoquímica e avaliar a inibição de biofilmes do fungo *C. Albicans* com os extratos das cascas e amêndoas do tucumã, que são partes normalmente descartadas do fruto.

A prospecção fitoquímica revelou uma composição importante de metabolitos secundários, indicando a necessidade de testes mais aprofundados e isolamento dos compostos bioativos. A formação de biofilme por *C. albicans* foi significativamente inibida por extratos do Tucumã em comparação com o controle negativo, principalmente o extrato hexânico da amêndoa do tucumã. A partir dos resultados obtidos será feito um estudo mais aprofundamento para saber sua composição química por meio da cromatografia e mais a respeito dessa inibição.

REFERÊNCIAS

- BARBEDO, L.S; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F.; BARRETO, A. C.; SILVA, J. D.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M.. Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel. **Acta Amazônia**, v.39, p. 371-6, 2009.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p.5062-5072, 2007.
- FERREIRA, E. de S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. da S.. Caracterização físicoquímica do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare Mart*). **Alim. Nutr.**, v.19, n.4, p. 427433, 2009.
- GARCIA, L. F. M.. **Caracterização, avaliação antioxidante e citotóxica da polpa e da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)**, 2012. 91p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS.
- GONÇALVES, A. E. S. S.. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. São Paulo: USP, 2008. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 2008.
- HENDERSON, A.; GALEANO-GARCES, G.; BERNAL, R.. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton University Press, 1997.
- JIN Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch. Oral Biol.** 49:789-798. 2004.
- LEVY, C. E.. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Sanitária v.1, p.12-20, 64, São Paulo: Agência Nacional de Vigilância, 2004.
- MATOS, F. J. de A.. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MELO, A. C. R.; SANTOS, A. L. M. dos; VELOZO, R. O.; ARAÚJO, F. A. M.; LUCENA, J. M. V. M. de. **Antibiofilm effect of Tucumã (*Astrocaryum sp.*) endosperm against *Candida albicans***. African Journal of Microbiology Research, 2016.
- MENDONÇA, M. S. **Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae-Palmae) da Amazônia**. 1996. 68f. PhD Thesis. Tese (Professor Titular) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1996.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.
- REGO, J. M.; FIGUEIREDO, C. L. da S.; PEREIRA, M. C. S.; REGO, V. M.; GOULART, G. **Estudo de comparação de diferentes métodos de extração de óleos em tucumã (*Astrocaryum vulgare mart.*)**. 63^a Reunião Anual da SBPC, 2007.
- SAGRILLO, M. R. **Efeito in vitro do tucumã (*Astrocaryum aculeatum, meyer*) na citoproteção ao estresse oxidativo e na modulação da leucemia promielocítica aguda**, 2014. 93p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDEM, L. Saponinas. In: SIMÕES, M. O. et al.

Farmacognosia da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica.** Belém: CIFOR, 2005.

SUZUKI, L. C.. **Candida albicans biofilm development in vitro for photodynamic therapy study.** São Paulo: IPEN, 2009. Dissertação, Instituto de Pesquisas Enérgéticas Nucleares, 2009.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DÍAZ, S. C. & ALMANZA, M. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonía. Pp. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT,44), FAO, Lima, Peru. Versão eletrônica.

YUYAMA, L. K. O. et al. **Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado.** Ciênc. Tecnol. Alim., v. 28, n. 2, p. 408-412, 2008.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE TANASE POR FUNGO ISOLADO DE CACAU NO SUL DA BAHIA

Priscilla Macedo Lima Andrade

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA

Porto Seguro - BA

Julyana Stoffel Britto

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Ilhéus - BA

Camila Oliveira Bezerra

Universidade Estadual de Santo Cruz – UESC

Ilhéus - BA

Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Ilhéus - BA

Andrea Miura da Costa

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Ilhéus - BA

estudo apresentou potencial biotecnológico, sendo capaz de produzir em tempos iniciais de fermentação, grandes quantidades de tanase utilizando apenas o ácido tântico ou ácido gálico como substrato.

PALAVRAS-CHAVE: tanase, fermentação, fungo filamentoso, cacau.

ABSTRACT: The production of tannase by filamentous fungus isolated from cocoa and the influence of different sources of carbon and nitrogen were evaluated in this study. The best tanase production was verified with 48 hours of cultivation. Among the carbon sources tested, gallic acid and tannic acid promoted the highest tannase activities ($p<0.05$), while the use of methyl gallate and glucose as inducers resulted in lower enzymatic production. There was no difference ($P>0.05$) in the enzymatic activity among the nitrogen sources analyzed. The fungus in study showed biotechnological potential, being able to produce in initial fermentation times, large amounts of tannase using only tannic acid or gallic acid as substrate.

KEYWORDS: tannase, fermentation, filamentous fungus, cocoa

1 | INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas de importância industrial e com potencial de produção no Brasil,

RESUMO: A produção de tanase por fungo filamentoso isolado de cacau e a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas nesse estudo. A melhor produção de tanase foi verificada com 48 horas de cultivo. Dentre as fontes de carbono testadas, ácido gálico e ácido tântico promoveram as mais altas atividades tanásicas ($p<0,05$), enquanto que a utilização de metil galato e glicose como indutores resultaram em menor produção enzimática. Não houve diferença ($P>0,05$) na atividade enzimática entre as fontes de nitrogênio analisadas. O fungo em

encontram-se a tanino acil hidrolase, conhecida como tanase. A tanase (EC 3.1.1.20) catalisa a hidrólise de ligações ésteres e depsídicas em taninos hidrolisáveis liberando glicose e ácido gálico (BEENA et al., 2011).

Tanase é utilizada em diversas aplicações industriais, incluindo fabricação de chá instantâneo, clarificação industrial de bebidas e na produção de ácido gálico. Uma das principais aplicações comerciais de tanase é a hidrólise de ácido tânico ao ácido gálico, um precursor intermediário necessário para a síntese do antibiótico trimetoprim, e usado para produção de propil galato, utilizado principalmente como um antioxidante em gorduras, óleos e bebidas (SHARMA et al., 2015).

A região do sul da Bahia ainda é pouco explorada em relação aos estudos da microbiota existente, especialmente sobre fungos com potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico e industrial.

Nesse sentido, o presente estudo investigou um fungo isolado de cacau da região sul da Bahia quanto à produção de tanase e a influência de fontes de carbono e nitrogênio na atividade da enzima.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O fungo filamentoso utilizado nesse estudo foi isolado de cacau do sul da Bahia e pertence a Coleção de Culturas de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Agroindústria. O cultivo foi realizado inoculando-se 6 plugs de micélio do fungo em 25 mL de meio mínimo de sais Czapeck com adição de 1% de ácido tânico, e posterior incubação à 30°C por 120 horas, sob agitação a 150 rpm. Para a definição do melhor tempo de fermentação, a atividade de tanase foi avaliada por espectrofotometria a cada 24 horas, de acordo com a metodologia de Sharma et al. (2000).

Ao meio de fermentação foram adicionadas diferentes fontes de carbono à 1% (ácido tânico, ácido gálico, metil galato e glicose) para verificar a influência dessas na síntese da enzima. Para avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tanase pelo fungo, após a seleção da fonte de carbono, novas fermentações foram feitas acrescentando-se separadamente ureia, fosfato de amônio, sulfato de amônio e nitrato de sódio, nas concentrações de 1 %.

Para as análises de fonte de carbono e nitrogênio, o experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos fatores comparadas utilizando-se o teste F e de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior atividade enzimática ($9,97 \text{ U.mL}^{-1}$) foi obtida durante 48 horas de cultivo (Figura 1). Tal resultado indica que o isolado de cacau apresenta um bom potencial

para produção da enzima, uma vez que, obteve maior atividade de tanase em períodos iniciais de fermentação, em condições não otimizadas.

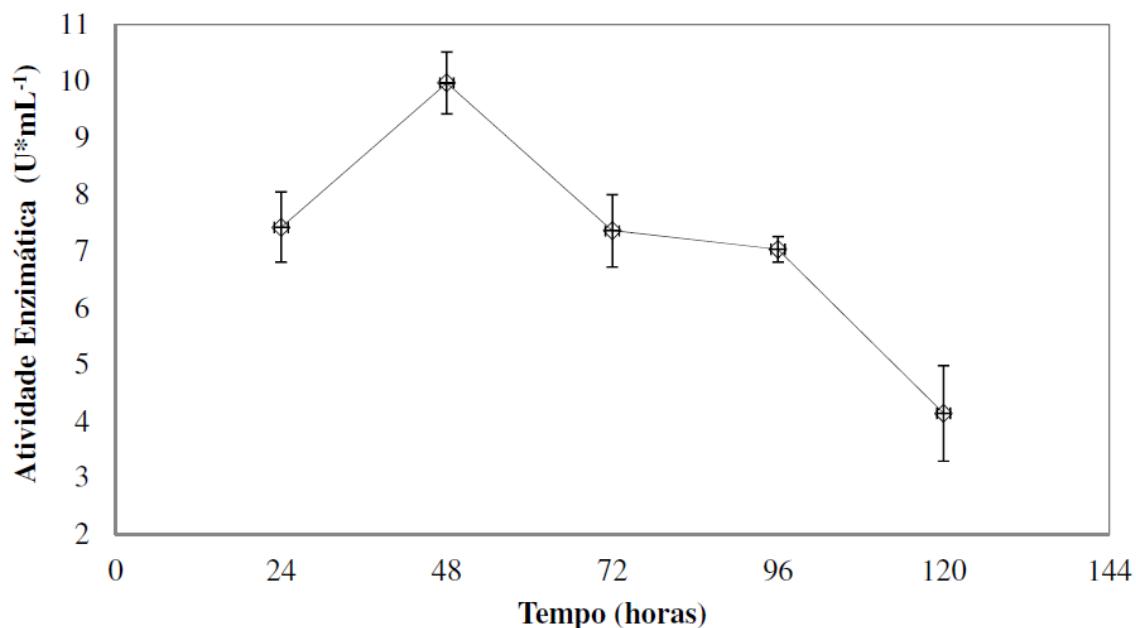


Figura 1. Atividade de tanase por fungo isolado de cacau em meio Czapeck com 1% de ácido à 30°C, 150 rpm por até 120 horas.

Como a maior produção da enzima foi obtida em 48 horas de cultivo, determinou-se esse tempo para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na atividade de tanase pelo fungo. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) na atividade enzimática quando utilizados ácido tântico e ácido gálico como fontes de carbono. As mesmas promoveram as maiores produção de tanase ($P<0,05$), com valores de 9,43 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10,40 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, quando comparadas a metil galato e glicose (Figura 2).

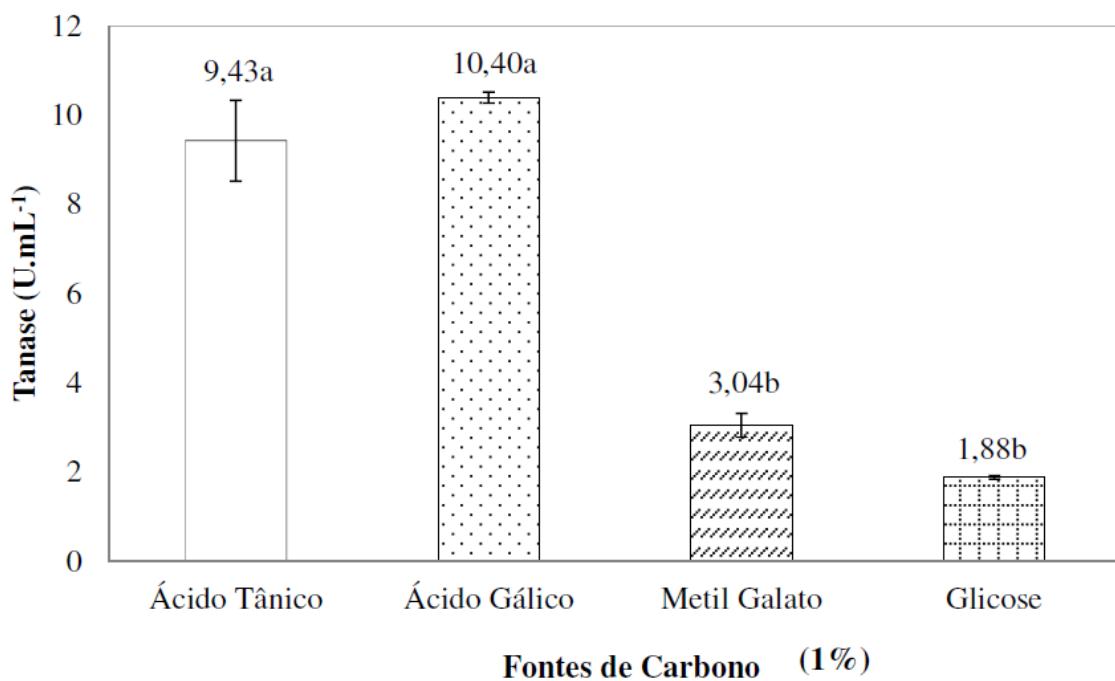


Figura 2. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanase durante 48 hs de fermentação. a-b médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem ($P>0,01$) entre si pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram reportados por Costa et al. (2008) em estudos realizados com *Aspergillus tamarii* em fermentação submersa, onde obtiveram atividades tanásicas de $13,1 \text{ U.mL}^{-1}$, quando o organismo foi crescido em ácido gálico e de $9,3 \text{ U.mL}^{-1}$ com a utilização de ácido tântico, sendo que entre as fontes de carbono testadas as mais elevadas atividades de tanase foram observados com ácido gálico, metil galato e ácido tântico.

Adicionalmente, o fato do fungo avaliado nesse estudo apresentar uma elevada atividade de tanase quando cultivado apenas com ácido gálico sugere que a produção da enzima pode continuar mesmo com um aumento na concentração do produto no meio. De Melo et al. (2014) analisando a produção de tanase em fermentação submersa, também verificaram que *Aspergillus* sp. GM4 produziu tanase usando ácido gálico como única fonte de carbono no meio. Nesse mesmo estudo foi observado que ácido tântico 2%, metil galato 1% e ácido gálico 1% promoveram as maiores atividade da enzima, respectivamente.

Corroborando com os resultados apresentados no presente trabalho, Gonçalvez et al. (2012) também observaram níveis basais de produção de tanase por *Aspergillus ochraceus*, quando o fungo foi cultivado apenas na presença de glicose.

A partir desses resultados, o ácido tântico foi utilizado como fonte de carbono para testar o efeito da suplementação de fontes de nitrogênio na atividade da enzima. Não houve diferença ($P>0,05$) na atividade enzimática entre as fontes de nitrogênio estudadas (Tabela 1). Em contradição, diversos trabalhos relatam que o tipo de fonte de nitrogênio influencia de forma significativa na produção de tanase (ABOUBAKR et al. 2013; SHARMA et al., 2015).

Fonte de Nitrogênio	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)*
Sulfato de Amônio	10.06 ± 2.18 ^a
Fosfato de Amônio	9.99 ± 0.15 ^a
Nitrito de Sódio	9.32 ± 1.26 ^a
Ureia	7.01 ± 1.98 ^a

Tabela 1. Comparação entre diferentes fontes de nitrogênio na atividade de tanase.

*média ± desvio padrão. a-b médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem ($P>0,01$) entre si pelo teste F.

4 | CONCLUSÕES

O fungo utilizado para o estudo foi capaz de produzir grandes quantidades de tanase apenas com o ácido tântico ou ácido gálico como substrato em tempos iniciais de cultivo e as fontes de nitrogênio na concentração testada parecem não influenciar na produção de tanase.

Entretanto, estudos mais aprofundados são de grande importância, devido à potencialidade da estirpe e da utilização dessa enzima em diferentes setores industriais.

REFERENCIA

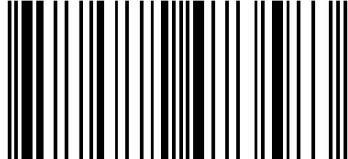
- ABOUBAKR, H. A.; EL-SAHN, M. A.; EL-BANNA, A. A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44 (2), p.559-567, 2013.
- BEENA, P. S.; BASHEER, S. M.; BHAT, S. G.; BAHKALI, A. H; CHANDRASEKARAN, M. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164 (5), p.612-28, 2011.
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.399–404, 2008.
- DE MELO, A. G.; PEDROSO, R. C. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; ALVES, J. G. L. F.; DIAS, E. S.; RESENDE, M. L. V.; CARDOSO, P. G. The optimization of *Aspergillus* sp. GM4 tannase production under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v.4, p.143-150, 2014.
- GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIM , A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, p.1-12, 2012.
- SHARMA, P.; CHATURVEDI, A.; SHARMA, L. Parametric optimization for extracellular tannase production in submerged fermentation by isolated *Aspergillus* species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v.4 (4), p.232-239, 2015.
- SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v.279, p.85–89, 2000.

SOBRE O ORGANIZADOR

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR é graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPa) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). É professor Adjunto I da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), lotado no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Orientador nos programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ-UFOPA); Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND-UFOPA); Biodiversidade (PPGBEES-UFOPA) e Ecologia (PPGECO-UFPa/EMBRAPA). Membro de corpo editorial dos periódicos Encyclopédia Biosfera e Vivências. Tem vasta experiência em ecologia e conservação de ecossistemas aquáticos continentais, integridade ambiental, ecologia geral, avaliação de impactos ambientais (ênfase em insetos aquáticos). Áreas de interesse: ecologia, conservação ambiental, agricultura, pecuária, desmatamento, avaliação de impacto ambiental, insetos aquáticos, bioindicadores, ecossistemas aquáticos continentais, padrões de distribuição.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-7247-358-3



9 788572 473583