

# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CAMPO PROMISSOR EM PESQUISA 3

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR  
LENIZE BATISTA CALVÃO  
(ORGANIZADORES)



# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CAMPO PROMISSOR EM PESQUISA 3

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR  
LENIZE BATISTA CALVÃO  
(ORGANIZADORES)



2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

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

**Diagramação:** Geraldo Alves

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

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**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

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

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

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

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Graeli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Cândido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

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 Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

##### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Gílrene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª 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. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª 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. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edvaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof<sup>a</sup> Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

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

C569 Ciências biológicas [recurso eletrônico] : campo promissor em pesquisa 3 / Organizadores José Max Barbosa de Oliveira Junior, Lenize Batista Calvão. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. – (Ciências Biológicas. Campo Promissor em Pesquisa; v. 3)

Formato: PDF  
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
Modo de acesso: World Wide Web  
Inclui bibliografia  
ISBN 978-85-7247-925-7  
DOI 10.22533/at.ed.257201601

1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Júnior, José Max Barbosa de. II. Calvão, Lenize Batista. III. Série.

CDD 570

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

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

O E-book “**Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 3**” é composto por 32 capítulos. Nesse volume, são abordados distintos tópicos nas áreas de biotecnologia, citologia, genética, saúde humana, educação, importância de condições ambientais que as espécies estão inseridas, bem como, potenciais espécies invasoras que podem ser nocivas ao meio ambiente. No cenário atual de mudanças ambientais correntes e avanços tecnológicos é extremamente importante o uso adequado de técnicas em cada área. Interações entre espécies são difíceis de serem mensuradas na natureza. Mutualismo é um tipo de relação simbiótica essencial, em que ambos os organismos se beneficiam na relação. Estudos que abordam essa temática são muito relevantes para compreensão da relação de dependência ou não que os organismos estabelecem para se manterem em um determinado ambiente.

O E-book também traz capítulos que abordam estratégicas didáticas para alunos da educação básica e da graduação. O ensino de ciências precisa ser cada vez mais divulgado e exige interatividade e criatividade para seu sucesso em sala de aula, o uso de modelos confeccionados ou a própria produção de material manual pode auxiliar no aprendizado dos jovens.

O tema sobre saúde humana se encontra em pauta trazendo o uso de células tronco para recuperação do tecido lesionado por queimadura, esse é um avanço que pode ser continuadamente avaliado. Outro fator essencial associado a saúde humana é a manipulação de produtos altamente comercializáveis, como açaí na região amazônica, o qual sugere a pasteurização como tratamento térmico pelas indústrias produtoras.

As aplicações de técnicas adequadas de biotecnologia que envolvem transgenia, genética com a busca de marcadores e melhoramento genético e parasitologia são extremamente importantes para uso de produtos eficazes em diversas áreas. Adicionalmente, análises citogenéticas, histoquímicas e toxicológicas fornecem informações que são relevantes e inovadoras para contemporaneidade.

Convidamos os leitores a lerem os capítulos desse livro com muita atenção, e desejamos que cada conteúdo abordado aqui seja útil na vida acadêmica. A linguagem acessível e no idioma português facilita o acesso tanto para grupos de pesquisas como para jovens pesquisadores da área científica.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
Lenize Batista Calvão

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
A OCORRÊNCIA DE <i>Eichhornia crassipes</i> , ESPÉCIE PERIGOSA E INVASORA EM UM LAGO OXBOW DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL	
João Lucas Correa de Souza	
Jocilene Braga dos Santos	
Erlei Cassiano Keppler	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2572016011</b>	
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>12</b>
A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NA TERAPIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS: CÉLULAS ADULTAS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSO E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	
Leandro Dobrachinski	
Sílvio Terra Stefanello	
Caren Rigon Misdal	
Darlaine Alves da Silva	
Vitória Silva Ferreira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2572016012</b>	
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>19</b>
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE POLPAS DE AÇAÍ COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BARRA DO BUGRES-MT	
Juliane Pereira de Oliveira	
Carine Schmitt Gregolin Caloi	
Carla Andressa Lacerda de Oliveira	
Rosimeire Oenning da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2572016013</b>	
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>27</b>
ANÁLISE INSILICO DO GENOMA DA MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) PARA O EXTREMO SUL DA BAHIA: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E GENES CANDIDATOS PARA ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA	
Tamy Alves de Matos Rodrigues	
Lívia Santos Lima Lemos	
Breno Meirelles Costa Brito Passos	
Jeilly Vivianne Ribeiro da Silva Berbert de Carvalho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2572016014</b>	
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>37</b>
AÇÃO DE EXTRATOS E BIOCOMPOSTOS DE <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS CULTIVADAS DE MELANOMA MURINO B16-F10	
Lucimar Pereira de França	
Silvana Gaiba	
Elias Jorge Muniz Seif	
Flávia Costa Santos	
Ana Carolina Moraes Fernandes	
Luiz Alberto Mattos Silva	
Jerônimo Pereira de França	
Lydia Masako Ferreira	

**CAPÍTULO 6 .....** **49**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE COMPOSTOS FTALIMÍDICOS**

João Richardis Saturnino de Oliveira  
Vera Cristina Oliveira de Carvalho  
Vera Lúcia de Menezes Lima

**DOI 10.22533/at.ed.2572016016**

**CAPÍTULO 7 .....** **59**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS NO DIAGNÓSTICO DE PARASITOLOGIA**

Elizandra Landolpho Costa Pedrosa  
Ana Luiza do Rosário Palma  
Simone Aparecida Biazzi de Lapena  
Ana Gabriela Rodrigues  
Andrezza Vaz Miao  
Angelica Kimiko Kawasaka  
Bruna Patrícia Menezes da Silva  
Michele de Oliveira Maciel de Holanda

**DOI 10.22533/at.ed.2572016017**

**CAPÍTULO 8 .....** **67**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DA LUEHEA DIVARICATA**

Jadiel de Abreu Pimenta Lins  
Antonio Carlos Romão Borges  
Aruanã Joaquim M. Costa R. Pinheiro  
Lídio Gonçalves Lima Neto  
Marilene Oliveira da Rocha Borges

**DOI 10.22533/at.ed.2572016018**

**CAPÍTULO 9 .....** **100**

**CHEMICAL MANAGEMENT OF *Bidens pilosa* (L.) and *Euphorbia heterophylla* (L.) AND SEED GERMINATION IN GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN**

André Luiz de Souza Lacerda  
Edgar Gomes Ferreira de Beauclair  
Daniel Andrade de Siqueira Franco  
Luis D. Honma  
Marcus Barifouse Matallo

**DOI 10.22533/at.ed.2572016019**

**CAPÍTULO 10 .....** **114**

**CITOQUÍMICA E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (Malvaceae)**

Uéliton Alves de Oliveira  
Alex Souza Rodrigues  
Elisa dos Santos Cardoso  
Eliane Cristina Moreno de Pedri  
Juliana de Freitas Encinas Dardengo  
Patrícia Ana de Souza Fagundes

Rosimeire Barboza Bispo  
Ana Aparecida Bandini Rossi

**DOI 10.22533/at.ed.25720160110**

**CAPÍTULO 11 ..... 124**

COMO ISOLAR PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS: UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA  
DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Ivina Barbosa de Oliveira  
Carlos Priminho Pirovani  
Karina Peres Gramacho  
Juliano Oliveira Santana

**DOI 10.22533/at.ed.25720160111**

**CAPÍTULO 12 ..... 145**

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS DE *Theobroma speciosum* Willd. ex  
*Spreng* (*Malvaceae*) EM PARQUE URBANO FLORESTAL

Juliana de Freitas Encinas Dardengo  
Uéliton Alves de Oliveira  
Tatiane Lemos Varella  
Greiciele Farias da Silveira  
Maicon Douglas Arenas de Souza  
Kelli Évelin Muller Zortea  
Ana Aparecida Bandini Rossi

**DOI 10.22533/at.ed.25720160112**

**CAPÍTULO 13 ..... 157**

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E  
CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGO DA ANTRACNOSE – *Colletotrichum acutatum*

Gabriela Gonçalves Nunes  
Guilherme Feitosa do Nascimento  
Lélia Cristina Tenório Leoi Romeiro

**DOI 10.22533/at.ed.25720160113**

**CAPÍTULO 14 ..... 169**

ESTRUTURA GENÉTICA DE MANDIOCAS CULTIVADAS NA AMAZÔNIA NORTE  
MATO-GROSSENSE

Auana Vicente Tiago  
Ana Aparecida Bandini Rossi  
Eliane Cristina Moreno de Pedri  
Fernando Saragosa Rossi  
Vinicius Delgado da Rocha  
Joameson Antunes Lima  
Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide  
Larissa Lemes dos Santos  
Elisa dos Santos Cardoso  
Sérgio Alessandro Machado Souza

**DOI 10.22533/at.ed.25720160114**

**CAPÍTULO 15 ..... 180**

ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DE *Adiantum latifolium* Lam. (PTERIDACEAE, PTERIDOPHYTA) OCORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC – ILHÉUS – BA

Matheus Bomfim da Cruz  
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves  
Aline Oliveira da Conceição  
Letícia de Almeida Oliveira  
Juliana Silva Villela  
Jerônimo Pereira de França  
Lucimar Pereira de França

**DOI 10.22533/at.ed.25720160115**

**CAPÍTULO 16 ..... 191**

ESTUDO DE MORFOLOGIA E HISTOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Microgramma vaccinifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel, *Polypodiaceae - pteridófita* - CORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ(UESC)

Juliana Silva Villela  
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves  
Letícia de Almeida Oliveira  
Matheus Bomfim da Cruz  
Aline Oliveira da Conceição  
Jerônimo Pereira de França  
Lucimar Pereira de França

**DOI 10.22533/at.ed.25720160116**

**CAPÍTULO 17 ..... 202**

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE SUSPENSÕES CELULARES DE DENDEZEIRO *Elaeis guineensis* Jacq.

Marlúcia Souza Pádua Vilela  
Raissa Silveira Santos  
Jéssica de Castro e Andrade  
Vanessa Cristina Stein  
Luciano Vilela Paiva

**DOI 10.22533/at.ed.25720160117**

**CAPÍTULO 18 ..... 218**

HISTOQUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E MELANOGÊNICA DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 EXPOSTA À RADIAÇÃO UVA E UVC

Elias Jorge Muniz Seif  
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves  
Silvana Gaiba  
Bruna Bomfim dos Santos  
Ana Carolina Moraes Fernandes  
Luiz Alberto Mattos Silva  
Lydia Masako Ferreira  
Jerônimo Pereira de França  
Lucimar Pereira de França

**DOI 10.22533/at.ed.25720160118**

**CAPÍTULO 19 .....** **231**

IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO *Artemia salina*: DETERMINAÇÃO DA LC<sub>50</sub> DO PINHÃO E DA GOIABA SERRANA

Gabriele da Silva Santos

Marcel Piovezan

**DOI 10.22533/at.ed.25720160119**

**CAPÍTULO 20 .....** **241**

INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA DIABETES MELLITUS NO BRASIL

Isabela Santos Lima

Beatriz Júlia Pimenta

Nathália Muricy Costa

Viviane Francisco dos Santos

Bruna Cristina Campos Pereira

Jéssica dos Santos Fernandes

Maristela Lúcia Soares Campos

Eloisa Araújo de Souza

Ketlin Lorraine Barbosa Silva

Izabel Mendes de Souza

Iara Macário Silverio

Marianne Lucena da silva

**DOI 10.22533/at.ed.25720160120**

**CAPÍTULO 21 .....** **250**

MORFOLOGIA DA TRAQUEIA E RAMIFICAÇÃO BRONQUICA DE *Megaceryle torquata* (LINNAEUS, 1766) (ORDEM CORACIFORME, FAMÍLIA *Alcedinidae*), MARTIM-PESCADOR-GRANDE

Thaysa Costa Hurtado

Gerlane de Medeiros Costa

Áurea Regina Alves Ignácio

Manoel dos Santos Filho

**DOI 10.22533/at.ed.25720160121**

**CAPÍTULO 22 .....** **258**

MUTUALISMO ENTRE A MACROALGA *Chara vulgaris* Linnaeus 1753 e a MACRÓFITA AQUÁTICA *Lemna cf. valdiviana* Phil, NA ÉPOCA DA ENCHENTE, MÂNCIO LIMA, ACRE

Jocilene Braga dos Santos

João Lucas Correa de Souza

Erlei Cassiano Keppler

**DOI 10.22533/at.ed.25720160122**

**CAPÍTULO 23 .....** **266**

PRODUTOS NATURAIS APLICADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Beatriz Santana Rocha

Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Ricardo Yara

**DOI 10.22533/at.ed.25720160123**

**CAPÍTULO 24 .....** 279**O USO DE MODELOS NO PROCESSO ENSINO/APRENDIZAGEM APLICADOS À PARASITOLOGIA E ENTOMOLOGIA**

Sílvia Maria Santos Carvalho  
Kaique Santos Reis  
Raquel dos Santos Damasceno  
Juliana Almeida da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.25720160124**

**CAPÍTULO 25 .....** 285**PRODUÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO HISTOLÓGICO PARA OS CURSOS DE GRADUAÇÃO DA ÁREA DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

Krisnayne Santos Ribeiro  
Hudson Sá Sodré  
Rhuan Victor Pereira Morais  
Ana Luísa Silva Costa  
Iuri Prates Souza  
Aparecida do Carmo Zerbo Tremacoldi  
Tania Barth

**DOI 10.22533/at.ed.25720160125**

**CAPÍTULO 26 .....** 292**SINDROMES HIPERTENSIVAS NA GRAVIDEZ**

Ana Patrícia Fonseca Coelho Galvão  
Benedita Célia Leão Gomes  
Joelma de Jesus Oliveira  
Keile de Kassia de Oliveira Mendes

**DOI 10.22533/at.ed.25720160126**

**CAPÍTULO 27 .....** 299**TOXICOLOGIA ORAL AGUDA DE *Bacillus thuringiensis* EM RATOS WISTAR**

Shana Letícia Felice Wiest  
Harry Luiz Pilz Júnior  
Natascha Horn  
Diouneia Lisiâne Berlitz  
Lidia Mariana Fiúza

**DOI 10.22533/at.ed.25720160127**

**CAPÍTULO 28 .....** 312**UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA PRÁTICA DE ENSINO DE BIOQUÍMICA: UMA EXPERIÊNCIA NO ENSINO SUPERIOR**

Lázaro de Sousa Fideles  
Maria Lucianny Lima Barbosa  
João Vitor da Silva Alves  
Maria de Fátima Faustino Araújo  
Amanda Alves Feitosa  
Luciene Ferreira de Lima  
Cleidivan Afonso de Brito  
Claudio Silva Teixeira  
Gilberto Santos Cerqueira  
João Antônio Leal de Miranda

**DOI 10.22533/at.ed.25720160128**

**CAPÍTULO 29 .....** 323

A RELEVÂNCIA DA IMAGINOLOGIA TORÁCICA NA INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Vera Lúcia Teodoro dos Santos  
Rosângela Silqueira Hickson Rios  
Vinicius dos Reis Silva  
Larissa Cristine Lopes Soares

**DOI 10.22533/at.ed.25720160129**

**CAPÍTULO 30 .....** 334

EFEITOS GENOTÓXICOS EM TÉTRADES DE *Tradescantia pallida* INDUZIDOS POR POLUENTES ATMOSFÉRICOS NA CIDADE DE JOINVILLE, SANTA CATARINA, BRASIL

Bruna Tays Hartelt  
Valéria Cristina Rufo Votorazzi

**DOI 10.22533/at.ed.25720160130**

**CAPÍTULO 31 .....** 353

GENOTIPAGEM DO CYP2C9 PARA ENSAIOS FARMACOGENÉTICOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA: ESTUDO PILOTO

Bruna Bolani  
Gabriela de Moraes Oliveira  
Giovana Maria Weckwerth  
Lohayne Berlato Ferrari  
Núbia Vieira Alves  
Thiago José Dionísio  
Flávio Augusto Cardoso de Faria  
Carlos Ferreira dos Santos  
Adriana Maria Calvo

**DOI 10.22533/at.ed.25720160131**

**SOBRE OS ORGANIZADORES.....** 364**ÍNDICE REMISSIVO .....** 365

## A OCORRÊNCIA DE *Eichhornia crassipes*, ESPÉCIE PERIGOSA E INVASORA EM UM LAGO OXBOW DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL

Data de aceite: 12/12/2019

### **João Lucas Correa de Souza**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Licenciatura em Ciências Biológicas, Km 12,  
Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco,  
Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/6377633385084191>

### **Jocilene Braga dos Santos**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Km 12,  
Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco,  
Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4151500917422182>

### **Erlei Cassiano Keppeler**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Centro Multidisciplinar, Km 12, Gleba Formoso,  
Lote 245, Colônia São Francisco, Cruzeiro do Sul,  
Acre, Brasil

**RESUMO:** *Eichhornia crassipes* consta na lista da International Union for Conservation of Nature (IUCN) como uma das 100 piores espécies invasoras e é reconhecida como comum em invasões biológicas. Esta macrófita apresenta ampla ocorrência no lago oxbow ( $7^{\circ}38'60.0''S$  e  $72^{\circ}39'03.6''W$ ) existente na Variante em Cruzeiro do Sul, Acre. Este lago é comumente usado para pesca, sendo capturado os peixes tucunaré, surubim, mocinha, sardinha, cará e traíra. Todavia, a *Eichhornia* dispersa pelo

lago prejudica a pesca, atrapalhando a captura dos peixes quando realizada por tarrafas. A recolha de exemplares no lago é realizada pela comunidade do município, e ela é levada para ser colocada em caixas d'água com peixes para promover o sombreamento. Na vazante, a *Eichhornia* se anoriza e enraíza nos solos ricos em nutrientes da várzea, sendo uma estratégia de sobrevivência dela nesta época. Na vazante de 2019, realizou-se coleta de exemplares desta macrófita para medição de raiz, folhas e flores (pétais). Os resultados para a biologia da macrófita foram as seguintes médias e variações: Raízes 11,46 (6-15,4) cm; Folhas com largura 4,39 (2,1-6,4) cm e comprimento 3,19 (1,8-5,7) cm; Pétais com largura 1,53 (1-1,6) cm e comprimento 2,83 (2,3-3,2) cm. Coletou-se e averiguou-se também a qualidade da água durante 6 (seis) dias e obteve-se resultados com as seguintes médias e variações: Temperatura 28,66 (28-29)°C; pH 7,8 (7,2 – 8,3); nitrato 6,51 (5,1-8,4) mg.L<sup>-1</sup>; Demanda Bioquímica de Oxigênio 50,16 (45-54) mg.L<sup>-1</sup>O<sub>2</sub> e Demanda Química de Oxigênio 60 (55-63) mg.L<sup>-1</sup>O<sub>2</sub>. Em geral, as variáveis foram independentes, exceto temperatura e pH ( $r=0,87$ ,  $p<0,05$ ), o que corrobora com a literatura que relata pH como dependente da temperatura. A dispersão desta planta invasora é preocupante e uma ameaça, devido à sua elevada capacidade de propagação, o que implicará em prejuízos na

fotossíntese, com consequências para a fauna e flora local.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia; dispersão, macrófita

## THE OCCURRENCE OF *Eichhornia crassipes*, A DANGEROUS AND INVASIVE SPECIES, IN AN OXBOW LAKE OF SOUTH-WESTERN AMAZONIA

**ABSTRACT:** *Eichhornia crassipes* appears on the list of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as one of the 100 worst invasive species and is recognized as very common in biological invasions. This macrophyte has a wide occurrence in an oxbow lake ( $7^{\circ} 38' 60.0''$  S and  $72^{\circ} 39' 03.6''$  W) existing in Variante, Cruzeiro do Sul, Acre (Brazil). This lake is commonly used for fishing, in which the most commonly captured fishes are Tucunaré, Surubim, Mocinha, Sardines, Cará, and Traíra. However, *Eichhornia* dispersed across the lake turns fishing difficult, disrupting the catching when using hand nets. The collection of specimens in the lake is carried out by the community of the municipality, and the samples are placed in water boxes with fishes to promote shading. During the ebb, *Eichhornia* is anchored and rooted in the nutrient-rich soils of the floodplain, which is a survival strategy at this time. In the 2019 ebb, specimens of this macrophyte were collected for the measurement of root, leaves and flowers (petals). The results for this macrophyte biology were the following (averages and variations): roots 11.46 (6-15.4) cm; leaves with width 4.39 (2.1-6.4) cm and length 3.19 (1.8-5.7) cm; petals with width 1.53 (1-1.6) cm and length 2.83 (2.3-3.2) cm. Water quality was also collected for six (6) days and results were obtained with the following averages and variations: Temperature 28.66 (28-29) °C; pH 7.8 (7.2 – 8.3); Nitrate 6.51 (5.1-8.4) mg. L<sup>-1</sup>; biochemical oxygen demand 50.16 (45-54) mg. L<sup>-1</sup> of O<sub>2</sub>, and chemical oxygen demand 60 (55-63) mg. L<sup>-1</sup> of O<sub>2</sub>. In general, the variables were independent, except for temperature and pH ( $R = 0.87$ ,  $p < 0.05$ ), which corroborates the literature that reports pH as temperature dependent. The dispersion of this invasive plant is a concern and a threat due to its high propagation capacity, which will imply damage to photosynthesis, with consequences for the local fauna and flora

**KEYWORDS:** Biology; dispersion; macrophyte

## 1 | INTRODUÇÃO

Os lagos de meandro (oxbow lakes) ou ferradura ou ainda “sacados” como são popularmente conhecidos na região amazônica, ocorrem ao longo dos rios de canal meandrante, como os rios Madeira, Purus e Juruá e seus afluentes na Amazônia (CUNHA-SANTINO; BIANCHINI-JUNIOR, 2002) são formados a partir do isolamento de meandros por processos de erosão e sedimentação das margens.

Estes lagos apresentam como característica principal a grande variação no nível da água (JUNK, 1997). Nas épocas de cheia estes lagos enchem-se, transbordam-se e se intercomunicam entre si e com os rios formando muitas vezes um único sistema (JUNK, 1980). Apresentam grande produção fitoplanctônica e macrofítica,

impulsionada pela riqueza nutritiva de suas bacias e, por conseguinte de suas altas águas (AMORIM et al. 2005)

Entre as diversas plantas aquáticas, destaca-se a espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, popularmente chamado como aguapé, que atrai considerável interesse pela sua habilidade de crescer em águas poluídas e ser capaz de tolerar e acumular íons de metais pesados (LU et al., 2004). Essa é estratégia é conhecida como hiperacumulação (BROOKS et al., 1977).

O aguapé consta na lista da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) como uma das 100 piores espécies invasoras e também no Top 20 do grupo espanhol de especialistas em invasões biológicas (GEIB) (TELLEZ et al., 2008). Em países como os Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Reino Unido, Marrocos e Portugal, foi desenvolvida legislação específica para a prevenção da comercialização e distribuição do aguapé (EPPO, 2008). Na Europa, foi criado um protocolo de análise de risco de invasão de pestes (Pest Risk Analysis – PRA) pela Convenção Internacional de Proteção a Plantas, tendo o aguapé como uma das espécies mais problemáticas (BRUNEL et al., 2009).

Atualmente, o aguapé está presente em todos os continentes, exceto a Antártida, tendo invadido todos os países tropicais e subtropicais (PARSONS; CUTHBERTSON, 2001). Não há um consenso sobre como e quando essa espécie foi introduzida em ambientes fora do seu habitat natural, porém o seu uso para fins de ornamentação em lagos e jardins, bem como para o controle de nutrientes e blooms algais em ambientes eutrofizados, certamente contribuiu para o seu espalhamento (KRITICOS et al., 2016).

Aguapé é uma monocotiledônea pertencente à família Pontederiaceae, uma pequena família de ampla distribuição pantropical, incluindo cerca de 10 gêneros e cerca de 30 espécies. No Brasil, ocorrem 5 gêneros e cerca de 20 espécies, sendo um grupo bem representado no Pantanal Matogrossense (SOUZA; LORENZI, 2005). Esta família apresenta características como: folhas pecioladas, com bainha larga que envolve o caule na base, formato sagitado ou ovalado e em certos casos com pecíolo inflado; inflorescência em geral em um racemo simples, espiciforme, protegida na base por uma bainha foliar espatácea; apresentam flores azuis, roxas ou brancas, vistosas, radiais ou zigomorfas, hermafroditas e perianto composto por seis elementos, todos corolinos; androceu composto de 6 estames (também 3 ou 1), epipétalos, freqüentemente de tamanhos diferentes; ovário súpero, tricarpelar, trilocular ou unilocular, óvulos numerosos ou apenas um, fruto seco, capsular, semente com abundante endosperma (SOUZA; LORENZI, 2005).

Essa espécie se caracteriza por possuir um caule curto e inflado, com um tufo de raízes finas de até 60 cm de comprimento (LORENZI, 2000). É uma planta perene que se reproduz vegetativamente por estolões e por sementes, que podem ficar

viáveis por até 15 anos nos sedimentos dos corpos de água (POTT; POTT, 2000). Só raramente apresenta condições especiais de reprodução sexuada. Apresenta uma bela floração de cachos azuis e lilases e folhagem em forma de rosetas, ramificando-se com facilidade, gerando novas plantas flutuantes (ROMITELLI, 1983).

A hipótese deste trabalho consiste em afirmar que o Lago da Variante apresenta condições de qualidade de água para o estabelecimento da espécie invasora *Eichhornia crassipes*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O lago Oxbow estudado fica localizado na área do município de Cruzeiro do Sul ( $7^{\circ}38'60.0''S$  e  $72^{\circ}39'03.6''W$ ) amostrado nas Figuras 1a e 1b. O lago de meandro abandonado, é de água branca, com conectividade com o Rio Juruá por vertedouro tipo canal, sendo considerada uma área não antropizada, onde a única atividade exercida neste lugar é a pesca de subsistência no período da vazante.



Figura 1a. Lago da Variante localizado no município de Cruzeiro do Sul, Acre. Fonte: Google Earth



Figura 1b. Lago da Variante localizado no município de Cruzeiro do Sul, Acre

Durante o período de 27 de maio a 01 de junho de 2019 foi analisado “*in locu*” com termômetro de mercúrio, a temperatura da água. Adicionalmente, foram coletadas para análise 01 (Uma) amostra de água, diariamente durante 6 (seis) dias. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos estéreis, e marcadas com a localização. Foram transportadas imediatamente para o laboratório num tempo máximo de 1 (Uma) hora.

As técnicas adotadas para as análises de qualidade de água, pH, nitrato, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) seguiram as especificações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, publicação da American Public Health Association (APHA, 1998) e foram adotadas variáveis especificadas na CONAMA n.º 357/2005.

O nitrato foi determinado através da análise espectrofotométrica. A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>) foi mensurada por um teste padrão, realizado a uma temperatura constante e durante um período de incubação, também fixo de 5 dias. Foi medida pela diferença do OD antes e depois do período de incubação, aferida pelo método Winkler. Demanda química de Oxigênio (DQO) é um parâmetro que também se mediou a quantidade de matéria orgânica, através do oxigênio dissolvido, suscetível de ser oxidada por meios químicos que existam em uma amostra líquida. Todas as análises foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em APHA (1998).

Para correlacionar as variáveis foi usado o coeficiente de correlação de Pearson (ZAR, 2010) que é representado pela letra r e assume valores de -1 a 1 (r = 1).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos resultados da análise da morfologia dos exemplares da *Eichhornia crassipes* (Figuras 2 e 3) foram apresentadas seguintes médias e variações: Raízes 11,46 (6-15,4) cm; Caule 7,65 (3,5-10,3) cm; Folhas com largura 4,39 (2,1-6,4) cm e comprimento 3,19 (1,8-5,7) cm; Pétalas com largura 1,53 (1-1,6) cm e comprimento 2,83 (2,3-3,2) cm.



Figura 2. *Eichhornia crassipes* no Lago da Variante



Figura 3. *Eichhornia crassipes* no Lago da Variante, Cruzeiro do Sul, Acre

As figuras de 4a a 4f apresentam os resultados das variáveis limnológicas.

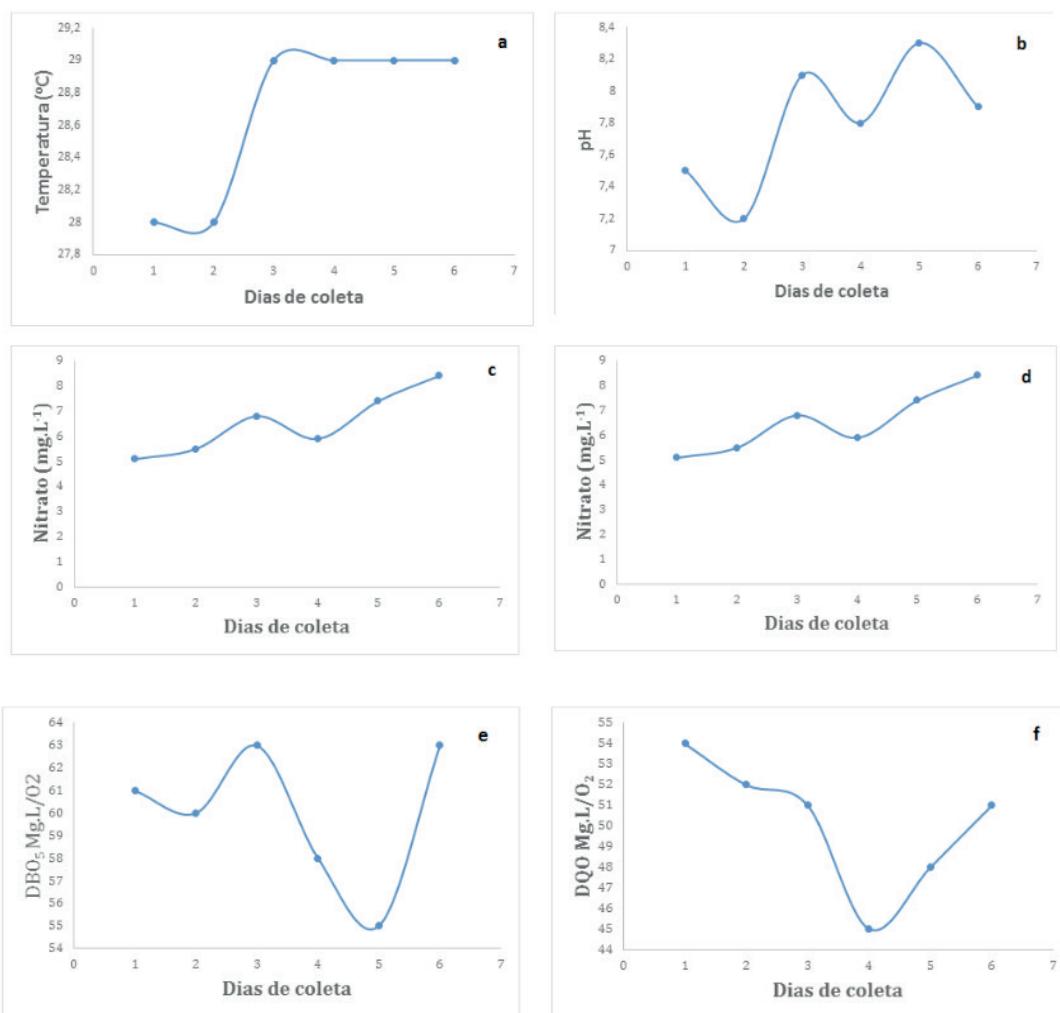


FIGURA 4: a. Temperatura; b. pH; c. Nitrato; d. Demanda Bioquímica de Oxigênio ( $DBO_5$ ); e. Demanda Química de oxigênio (DQO).

Em geral, as variáveis foram independentes, exceto temperatura e pH ( $r=0,87$ ,  $p<0,05$ ), o que corrobora com a literatura que relata pH como dependente da temperatura.

*Eichhornia crassipes* Mart. (Solms), 1883 é uma espécie de planta aquática da família Pontederiaceae (GUIMARÃES et al., 2017), que pertence à Ordem Commelinales. Agerminação de sementes de *Eichhornia crassipes* em locais distantes dos focos de infestação pode ser um meio de dispersão dessa planta invasora. No entanto, nenhum estudo moderno examinou a influência de componentes isolados na germinação, embora a influência da temperatura, oxigênio e potencial redox já tenha sido examinada (PÉREZ et al., 2011).

Espécies invasoras se beneficiam de características vantajosas ou de plasticidade fenotípicas nos traços, quando realizam invasão, em resposta às mudanças ambientais, no entanto, poucos estudos exploraram esse mecanismo em macrófitas invasivas (WANG et al., 2017).

A disponibilidade de oxigênio acelera a decomposição 1,25 vezes em

comparação com as condições anóxicas, enquanto um aumento de temperatura de 10°C acelera em 1,35 vezes, concluindo que essas variáveis ambientais atuam sinergicamente na regulação da decomposição, influenciando nesta taxa de decomposição (PASSERINI et al., 2016).

Os resultados mostraram que a entrada externa de nutrientes influencia a germinação (PÉREZ et al., 2011), como por exemplo, os lagos, durante o período de enchente. Segundo ainda Pérez et al. (2011), as sementes de *E. crassipes* encontrariam condições muito boas para a germinação em água classificada como hipereutrófica, o que pode desempenhar um papel decisivo na expansão desta planta.

A temperatura é uma variável abiótica que influencia diretamente na produção primária das macrófitas aquáticas, determina a distribuição geográfica das espécies e afeta a estrutura das comunidades (CANCIN et al., 2009). Segundo ainda estes mesmos autores, observando experimento em laboratório, crescimento à temperatura de 25 °C ocorre a maior produção de brotos, por exemplo de *Pistia stratiotes*, planta da mesma Ordem (Commelinaceae) que a *Eichhornia*, onde para os tratamentos com temperatura de 15 °C e 30 °C, essa produção foi muito reduzida. Concluiu-se que, a temperatura influencia no crescimento de *Pistia stratiotes* e que esta espécie apresentou maior crescimento quando submetida à temperatura de 25 °C.

A Resolução CONAMA nº 369 de 28 de março de 2006, que em seu artigo 2º, inciso II alínea “a”, considera de interesse social a erradicação de espécies invasoras para assegurar a proteção da integridade da vegetação nativa.

Dos métodos que são usados na remoção de *E. crassipes*, podem ser citados:

- Remoção manual, praticada por pescadores para facilitar a inclusão de tarrafa no lago; Em Portugal, segundo Moreira et al. (1999), a limpeza mecânica, eventualmente completada pela colheita manual, se caracteriza como o melhor processo de combate às infestações, embora com desvantagens econômicas.

- Remoção através da pulverização com herbicidas, que é desaconselhado, pois poderá causar efeitos nocivos ao homem. Embora Moreira et al. (1999), considere que a luta química, pode ser complementada com herbicidas, que apresenta efeitos mais inócuos para o ambiente aquático, embora com desvantagens econômicas.

- Introdução de espécies peixes que se alimentam das raízes destes aguapés: sendo atualmente a melhor solução para o problema, porém com o aumento na população destas espécies desequilíbrios no ecossistema podem tornar-se consequências comuns. De acordo com Moreira et al. (1999), a introdução da carpa herbívora mereceria melhor comprovação experimental, para avaliação da sua eficácia e impactos sobre a vida de outros peixes. Segundo ainda estes autores, a luta biológica com os insetos *Neochetina* spp., provavelmente precedida da limpeza mecânica, seria uma solução aparentemente vantajosa, havendo que prosseguir os

estudos para conhecer da capacidade de sobrevivência no Inverno e da possibilidade dos seus efeitos serem facilitados por ação de outros agentes biológicos.

- O aguapé pode ser usado na fitorremediação, que é uma técnica que utiliza vegetais e sua microbiota a fim de degradar, isolar ou remover contaminantes do ambiente, sendo vantajosa devido ao baixo investimento, permitindo que vários compostos possam ser fitorremediados em um mesmo local (ESTEVES, 1998)

Foi observado por Pompêo (2005) que o sistema radicular de *E. crassipes* funciona como um filtro mecânico que adsorve o material particulado (orgânico e mineral) existente na água e cria um ambiente rico em atividades de fungos e bactérias, passando a ser um agente de despoluição, reduzindo, por exemplo, a DBO. Os dados deste estudo colaboraram esta afirmativa, visto terem tido resultados para ambiente despoluído.

A *Eichhornia crassipes* pode ser usada no tratamento das águas, pois apresenta um sistema denso de raízes que tem o potencial de tratamento e/ou mitigação de poluentes, e isso foi observado pelos baixos valores de DBO e DQO encontrados, logo a presença da macrófita minimiza a poluição do ambiente. Sugere-se que esta espécie pode ser usada como jardins ecológicos.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. A.; MOREIRA -TURQ, P. F.; CARLOS, L. C. S.; TURQ, B.; CORDEIRO, R. C. **Caracterização granulométrica e mineralógica dos sedimentos na várzea do lago Grande de Curuai, para: compreensão da dinâmica sedimentar.** 2005. Disponível em <http://www.abequa2005.geologia.ufrj.br/>. Acesso em: 18 jul. 2019.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wasterwater.** American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20<sup>th</sup> ed. Washington, 1998.
- BORNETTE, G.; PUIJALON, S. Macrophytes: ecology of aquatic plants. In: **Encyclopedia of Life Sciences** (ELS). Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p. 1-9.
- BROOKS, R.R., LEE, J., REEVES, R.D., JAFFRE, T. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. **Journal Geochemical Exploration**, v.7, p. 49-57. 1977.
- BRUNEL, S., PETER, F., FERNANDEZ-GALIANO, E., SMITH, I. Approach of the European and Mediterrean Plant Protection Organization to the evaluation and management of risks presented by invasive alien plants. **Management of invasive weeds.** Springer. p. 319–343. 2009.
- CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI-JUNIOR, I. Humic substance mineralization in a tropical oxbow lake (São Paulo, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 468, pp. 33-43. 2002.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization *Eichhornia crassipes*. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.** v. 38, p. 441–449, 2008.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Interciencia, 2011, 826 p.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia.** 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 1998, 602 p. 1998.

GOPAL, B. **Water Hyacinth**. Elsevier, Amsterdam, 1987.

GUILHERME, L.R.G., MARCHI, G. Os metais pesados no solo. **DBO Agrotecnologia**. 2004. Disponível em: <http://www.anda.org.br/portug/artigos/MetaisPesados.pdf>. Acesso em 10 jul. 2019.

GUIMARAES, M. G. Q.; MOREIRA, A. D. R.; BOVE, C. P. Flora do Rio de Janeiro: Pontederiaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 103-108, março de 2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768118>>. Acesso em 15 de julho de 2019.

GUIMARAES, M. G. Q.; MOREIRA, A. D. R.; BOVE, C. P. Flora do Rio de Janeiro: Pontederiaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 103-108, março de 2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768118>>. Acesso em 15 jul. 2019.

HOVEKA, L.N.; BEZENG, B.S.; YESSOUFOU, J.S., van der Bank M. Effects of climate change on the future distributions of the top five freshwater invasive plants in South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 33-38, 2016.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Brasil em síntese**. 2006.

IRGANG, B. E.; GASTAL JR., C. V. S. **Plantas aquáticas da planície costeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. dos autores, 1996.

JUNK, W.J. Áreas Inundáveis - Um desafio para Limnologia. **Acta Amazonica**, v. 10, p. 775-795. 1980.

JUNK, W.J. **The central Amazon floodplain: ecology of a pulsing system**. Springer, 1997.

KRITICOS, D.J.; BRUNEL, S. Assessing and Managing the Current and Future Pest Risk from Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), an Invasive Aquatic Plant Threatening the Environment and Water Security. **Plos One**, v. 11, n. 8. 2016.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3<sup>a</sup> edição. Instituto Plantarum: Nova Odessa – SP, 2000.

LU, X.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; HOMYOK, K. Removal of cadmium and Zinc by Water Hyacinth *Eichhornia crassipes*. **Science Asia**. v. 30, p. 93-103. 2004.

MEERHOFF, M.; JEPPESEN, E. Shallow lakes and ponds; p.343-353. In: LIKENS, G.E. **Lake ecosystem ecology**. Amsterdam: Elsevier. 2010.

MOREIRA, I.; MONTEIRO, A.; FERREIRA, T.; CATARINO, L.; FRANCO, J. C.; REBELO, T. Estudos sobre biologia e combate do jacinto-aquático (*Eichhornia crassipes*, (Mart.) Solms-Laub.) em Portugal. **Garcia de Orta, Sér. Bot.**, Lisboa, v. 14, n. 2, p. 191-198. 1999.

NEUMANN, D.; LICHTENBERGUER, O.; GUNTER, D.; TSCHIERSCH, K., NOVER, L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. **Planta**. v. 194, p. 360-367.

PALMA-SILVA, C., ALBERTONI, E.F. e ESTEVES, F.A. Charophytes as a nutrient and energy reservoir in a tropical coastal lagoon impacted by humans (RJ, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v.64, n.3a, p.479-487. 2004.

Parsons W.T.; CUTHBERTSON, E. G. 2001. **Noxious Weeds of Australia**. Collingwood: CSIRO Publishing.

PASSERINI, M.D.; CUNHA-SANTINO, M.B.; BIANCHINI, JR. I. Oxygen availability and temperature as driving forces for decomposition of aquatic macrophytes. **Aquatic Botany**, v. 130, p. 1-11. 2016.

PÉREZ, A. E.; RUIZ TÉLLEZ, T.; SÁNCHEZ GUZMÁN, J. M. Influence of physico-chemical parameters of the aquatic medium on germination of *Eichhornia crassipes* seeds. **Plant Biology**, v. 13, n. 4. 2011.

POMPÉO, M. L. M. **Hidropôntica e as macrófitas aquáticas**. 2005. Disponível em: <http://vivimarc.sites.uol.com.br/hidroponia.htm>. Acesso em 17 jul. 2019.

POMPÉO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas, **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 406-424. 2008.

POTT, V. J., POTT, A. **Plantas Aquáticas do Pantanal**. Embrapa: Brasília – DF, 2000.

ROMITELLI, M. S. Remoção de fósforo em efluentes secundários com emprego de macrófitas aquáticas do gênero *Eichhornia*. **Revista DAE**, n.º 133, p. 66-88.

SETTI, A. A.; LIMA, J. E. F. W.; CHAVES, A. G. M.; PEREIRA, I. C. **Introdução ao Gerenciamento de Recursos Hídricos**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, 2001. 328p

SOLTAN, M.E.; RASHED, M.N. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. **Advances in Environmental Research**. v. 7, p. 321-334. 2003.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Ed. Instituto Plantarum, 2005. 639p.

TÉLLEZ, T.R.; LÓPEZ, E., GRANADO, G.L.; PÉREZ, E.A.; LÓPEZ, R.M.; GUZMÁN, J.M.S. The Water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). **Aquatic Invasions** 3: 42–53. 2008.

WANG, T.; HU, J.; LIU, C.; YU, D. Soil type can determine invasion sucess of *Eichhornia crassipes*. **Hydrobiologia**, v. 788, n. 1, p. 281-291. 2017.

WETZEL, R.G. **Limnologia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1129p, 1993.

## A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NA TERAPIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS: CÉLULAS ADULTAS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSO E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Data de aceite: 12/12/2019

### **Leandro Dobrachinski**

Centro Universitário São Francisco de Barreiras -  
UNIFASB - Curso de Biomedicina  
Barreiras – Bahia

### **Sílvio Terra Stefanello**

Centro Universitário São Francisco de Barreiras -  
UNIFASB - Curso de Biomedicina  
Barreiras – Bahia

### **Caren Rigon Misdal**

Centro Universitário São Francisco de Barreiras -  
UNIFASB - Curso de Biomedicina  
Barreiras – Bahia

### **Darlaine Alves da Silva**

Centro Universitário São Francisco de Barreiras -  
UNIFASB - Curso de Biomedicina  
Barreiras – Bahia

### **Vitória Silva Ferreira**

Centro Universitário São Francisco de Barreiras -  
UNIFASB - Curso de Biomedicina  
Barreiras – Bahia

**RESUMO:** O tecido epitelial realiza a proteção constante do organismo de agressões causadas por agentes externos. Após o dano tecidual, inicia-se uma coordenada cascata de eventos celulares e moleculares por mediações bioquímicas, necessárias para que ocorra a reconstituição do tecido com o

objetivo de preservar a homeostasia tecidual. O desenvolvimento de novas terapias na tentativa de recuperar pacientes acometidos por queimaduras graves, desperta o interesse de muitos pesquisadores. Alguns estudos têm evidenciado a utilização de células-tronco provenientes do tecido adiposo, como terapia promissora, uma vez que são capazes de proliferar e consequentemente possibilitar a regeneração de tecidos, devido a sua ampla potencialidade de diferenciação celular, adaptando-se a quaisquer tecidos, otimizando assim a reconfiguração funcional da pele. O objetivo deste trabalho foi evidenciar estudos clínicos com a finalidade de cicatrização tecidual em queimaduras e a utilização de células-tronco oriundas do tecido adiposo. Para tanto, realizou-se uma revisão da literatura, de caráter narrativo e investigativo. Os resultados evidenciam diferenciação no processo de cicatrização, com a injeção e células do tecido adiposo, observando melhora significativa. Alguns dos estudos afirmam que as células do tecido adiposo podem estar envolvidas na renovação natural dos tecidos. Conclui-se que o uso de células adiposas propõe vantagens em relação a outros métodos existentes. A utilização de células adiposas é um avanço que deve ser continuamente estudado e que por ser transplante autólogo possui baixo risco de rejeição e transmissão de doenças em

comparação a outras possíveis fontes de células-tronco exógenas, tornando-se assim extremamente promissor na terapêutica moderna.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células-tronco. Cicatrização. Queimaduras. Tecido Adiposo

## THE USE OF STEM CELLS IN BURN TISSUE REPAIR THERAPY: ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS AND PLATELET-RICH PLASMA

**ABSTRACT:** Epithelial tissue protects the body against aggression caused by external agents. After tissue damage, a coordinated cascade of cellular and molecular events is initiated by the biochemical process, which is necessary for tissue reconstitution and homeostasis. The development of new therapies in an attempt to recover patients with severe burns stimulates the interest of many researchers. Some studies have shown that the use of adipose stem cells is a promising therapy for burns since they can proliferate and consequently enable tissue regeneration, due to their high potential for cell differentiation, adapting to any tissue, thus optimizing the functional reconfiguration of the skin. This study aimed to highlight the recent clinical research in which tissue healing in burns was evidenced through the use of adipose-tissue derived stem cells. We perform a narrative and investigative literature review. The studies we selected showed that there is a significant improvement in the healing process after the injection of adipose-tissue derived stem cells. Some of the studies state that adipose-tissue cells may be involved in natural tissue renewal. Finally, the use of adipose-derived stem cells offers advantages over other existing methods, mainly because these cells can be obtained by autologous transplantation, which promotes a low risk of rejection and disease transmission if compared to other possible sources of exogenous stem cells, making it extremely promising in modern therapy.

**KEYWORDS:** Stem cells. Healing. Burns. Adipose tissue

## 1 | INTRODUÇÃO

As células-tronco podem ser consideradas como células indistintas, por serem aptas de se renovarem, além de se diferenciarem em amplos tipos celulares e da restauração de tecidos. Podendo ser divididas em dois grupos essenciais, sendo elas embrionárias e adultas (SOUZA *et al.*, 2010). Uma recente demarcação ressalta três características cruciais do funcionamento das células-tronco como o poder de diferenciação (ou seja, as células podem se especificar em uma célula definida e desempenhar uma função especial), de autorrenovação e a aptidão de propagação ampla. As células-tronco adultas (CTA), expõem uma idoneidade restrinida de regeneração após lesões, sendo observadas na medula óssea, no intestino e na pele, assim como em diversos órgãos e tecidos humanos. De acordo Lysy e colaboradores (2008), as fundamentais CTA aspirantes ao reparo tecidual são as mesenquimais e hematopoiéticas. Sendo importante salientar que as células-tronco

adultas têm poder de se distinguir, corriqueiramente em células que constituem sua nativa localização (MARTINS *et al.*, 2009).

Atuais avanços no ramo da engenharia tecidual viabilizaram a amplificação e o aperfeiçoamento de materiais biológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Uma perspectiva proeminente no tecido danificado equivalente a um acréscimo momentâneo da celularidade, que aponta e pereniza o tecido de granulação e repõem células lesionadas. Essas células de granulação se aglomeram a partir de amostras celulares transitórios, que englobam os leucócitos circulantes e células epiteliais basais, a datar de células mesenquimais residentes (LODER *et al.*, 2017). Do mesmo modo, as células-tronco ocupam ferimentos, se diferenciando em massas endoteliais e de fibroblastos. As células que sofreram diferenciação terminalmente não cooperam na restauração ou até mesmo renovação (ROWAN *et al.*, 2017).

A expressão plasma rico em plaquetas é usada genericamente para descrever uma suspensão de plasma obtida a partir do sangue total, preparada de forma a conter concentrações de plaquetas superiores às encontradas normalmente no sangue circulante (MONTEIRO, 2013).

A utilização do PRP em medicina se baseia no fato de as plaquetas conterem diversos fatores de crescimento em seus alfa-grânulos. Esses fatores têm papel conhecido nos processos de reparação tecidual. Desse modo, a concentração dessas substâncias em tecidos lesados poderia ser benéfica para atribuir mais agilidade aos processos de regeneração (NIE, *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho de revisão literária é realizar analogias comparativas às informações obtidas a respeito dos avanços de estudos em CTA e tecnologias utilizadas para o desenvolvimento de terapias de reparo tecidual com a utilização dessas, sendo elas derivadas do tecido adiposo e da associação da células-tronco com plasma rico em plaquetas e matriz de regeneração e serão comparadas as suas utilizações no reparo tecidual em queimaduras, analisando seus procedimentos, características e resultados no reparo do organismo de indivíduos afetados.

## 2 | METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura em que foram utilizados artigos nas cujas temáticas abordasse sobre queimaduras, mecanismos cicatriciais e a utilização de células-tronco provenientes do tecido adiposo. Utilizou-se as referências publicadas entre o período de 2008 até 2018 nas plataformas Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), PubMed e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e Mendeley. A partir da conjugação dos seguintes descritores: células-tronco, reparo, cicatrização, tecido adiposo e plasma, foram encontrados 97 artigos, sendo a coleta de dados realizada entre janeiro e abril de 2019. Foram utilizados 18 artigos para composição do estudo,

levando em consideração os propósitos estabelecidos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Por meio de pesquisas foram constatadas a utilização de inovações tecnológicas em terapias teciduais em queimaduras, com o uso de células-tronco adultas provenientes do tecido adiposo e plasma rico em plaquetas. De acordo com Franck *et al.* (2017) o procedimento de cicatrização da queimadura se discerne de outros danos devido a lesão tecidual essencial que afeta a organização dos acontecimentos sucessivos, para que ocorra a restauração do tecido.

Sendo assim, as queimaduras podem desvitalizar os tecidos subjacentes, envolvendo o fornecimento de sangue, com extravio de plasma, além de intensas inflamações, deficiência imunológica, facilita a ocorrência de sepse, como também a ausência de tecido conessor para a efetivação de enxertia (BANYARD *et al.*, 2015).

A utilização de células-tronco proveniente do tecido adiposo, segundo Lysy *et al.* (2008), podendo ser transferidas para o local onde foi ocorrido o dano por meio da corrente sanguínea. Assim, ao entrar em contato com o corpo, é necessário que elas se desviem do sistema imunológico.

Com isso, é necessário evitar que o organismo recuse essas células, habitualmente utiliza- se medicamentos imunossupressores, assegurando assim, que as células-tronco alcancem o local de atuação (LYSY *et al.*, 2008).

De acordo com Garcia *et al.* (2016) aponta que a aplicação de células-tronco derivadas do tecido adiposo, relacionadas a gel fibrina ou gel de plasma em agrupamento com membranas, que destinam- se na promoção do desenvolvimento celular em sobreposição, sendo um método propício que possa consultar as utilidades das células-tronco. Nestas condições, conserva- se a homeostase dos tecidos ao restituir células que foram perdidas no processo de maturação, lesões ou envelhecimento, permitindo o desenvolvimento celular apropriado com finalidade de apresentar o mais seguramente admissível o suporte e atividades extraviadas do tegumento primordial (CONDÉ *et al.*, 2016).

Segundo Yokomizo et al (2011), quando se analisa de forma precisa, levando em consideração os aspectos genéticos e fisiológicos das células, sendo ratificada a sua capacidade de regenerar as células adiposas, evidenciando sua atuação sobre a secreção e regulação de colágeno, sendo eles do tipo I e III, sua ação estimulante a respeito da migração de células fibroblásticas dérmicas humana. A terapia celular realizada com a utilização de células adiposas apresenta melhores benefícios, quando comparada com outros procedimentos na reparação tecidual, ocasionando em uma renovação de boa qualidade sem geração de cicatrizes ou fibrose.

Dessa forma, as células-tronco provenientes do tecido adiposo, por sua capacidade de diferenciação celular, mecanismo autodirrecional, efeito de imunomodulação, ação anti-inflamatória e pela liberação de substâncias que excitam a restauração tecidual em queimaduras, são eficazes quando relacionadas a um abrangente procedimento de reestabelecimento da homeostase e da vida (YRAK & OKAMOTO, 2010).

A demora em completar o processo cicatricial das queimaduras é considerado um impasse decorrente e as propriedades de autorrenovação, distinção em várias linhagens de células com diminuição imunogenicidade, Ademais a secreção de substâncias parácrinas sinalizadoras podem ser apropriadas para o favorecimento evidente do procedimento em cada uma das etapas de cicatrização pela intercessão na estimulação celular, na angiogênese e na reestruturação tecidual, repondo a fibrose tecidual (FRANCK *et al.*, 2017).

Além disso, também são realizados procedimentos na terapia tecidual em queimaduras com o uso de plasma rico em plaquetas (PRP), este sendo uma tecnologia utilizada no interior do organismo que vem promovendo a curiosidade da medicina regenerativa em atividade do seu potencial de induzir o aceleração de cicatrização (CHICHARRO-ALCÁNTARA *et al.*, 2018).

Para Neffa e Pizani (2015), o procedimento utilizando plasma rico em plaquetas surgiu como um veículo que possibilitou a aplicação de alta quantidade de fatores relacionados ao crescimento que irão estimular a síntese de colágeno e matriz extracelular, por meio de uma baixa qualidade de plasma.

Segundo Pallua; Wolter; Markowicz (2010) o PRP tem como característica estimular a angiogênese ocasionando o crescimento vascular e a propagação de fibroblastos. Ademais, tem como atividade hemostática, ocorrendo assim a formação do coágulo de fibrina.

A cicatrização pode ser aumentada com a aplicação de PRP em tecidos moles. Na terapia de queimaduras, a regeneração cutânea torna-se maior com a presença de PRP, como também a absorção após o enxerto de pele apresenta aceleração no processo de reconstituição do tecido (PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010).

Os complexos processos envolvidos na cura de queimaduras são motivos de estudo para se obter melhorias em relação ao tempo e à qualidade da cicatriz. A terapia com células-tronco é o desafio da ciência a ser desvendado e as pesquisas se mostram promissoras em relação às cicatrizações, e especialmente em queimaduras podem promover benefícios de qualidade, tempo e diminuição da intensidade da inflamação (GHIEH *et al.*, 2015).

## 4 | CONCLUSÃO

Diante o exposto, foi compreendida a utilização dessas novas descobertas de reparação decidual, como as células-tronco e o plasma rico em plaquetas, tem um marco importante na medicina, uma vez que ambas obtiveram resultados positivos na reparação tecidual de queimaduras, onde cada método apresenta determinadas diferenças no mecanismo de ação, o que pode auxiliar a escolha medica para o tratamento do paciente. Foi observada diferenciação na utilização de células-tronco no reparo de tecidos lesionados por queimaduras e as formas de atuação na reparação dos tecidos. Foi possível compreender que dentre as atuações dos decorrentes procedimentos, a utilização de células-tronco do tecido adiposo por ser um sistema in vivo e podendo se utilizar as células do próprio indivíduo lesado, sua manipulação é considerada menos complexa, comparada ao PRP, visto que seu custo benefício é mais viável, porém limita-se a uma região lesionada em que esse procedimento seja realizado. Por sua vez, o PRP é um sistema in vitro, intravenoso, apresentando maior potencial na aceleração da cicatrização, sendo este mais complexo e por serem utilizados plasmas e plaquetas sanguíneos, são submetidos a um maior número de etapas em seu procedimento e apresenta um maior custo benefício. Faz-se necessário uma análise clínica do quadro do paciente, a fim de discernir qual dos procedimentos apresentará maior relevância. É importante ressaltar a escassez de bibliografias disponíveis, sendo assim, faz-se necessário a realização de novos estudos relacionados ao tema.

## REFERÊNCIAS

- Banyard, DA, Salibian AA, Widgerow AD, Evans GR. **Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery.** J Cell Mol Med. 2015;19(1):21-30.
- CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. *et al.* **Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management.** Journal of Functional Biomaterials, v. 9, n. 1, p. 10, 2018.
- Condé-Green A, Marano AA, Lee ES, Reisler T, Price LA, Milner SM, et al. **Fat Grafting and Adipose-Derived Regenerative Cells in Burn Wound Healing and Scarring: A Systematic Review of the Literature.** Plast Reconstr Surg. 2016;137(1):302-12.
- FRANCK, C. L. *et al.* **A complexidade cicatricial em queimaduras e as possibilidades da terapia com células-tronco derivadas do tecido adiposo: revisão.** Revista Bras Queimaduras, v. 16, n. 2, 2017.
- GARCIA, C. S. C. *et al.* **Enxerto autólogo de células-tronco derivadas do tecido adiposo: uma nova visão de sua aplicação no tratamento de queimados e na cirurgia plástica reparadora.** Revista Bras. Cir. Plást, v. 31, n. 3, 2016.
- Ghieh F, Jurjus R, Ibrahim A, Geagea AG, Daouk H, El Baba B, et al. **The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review.** Biomed Res Int. 2015;2015:684084.

Loder S, Peterson JR, Agarwal S, Eboda O, Brownley C, DeLaRosa S, et al. **Wound healing after thermal injury is improved by fat and adipose-derived stem cell isografts.** J Burn Care Res. 2015;36(1):70-6.

LYSY, P. A. et al. **Stem cells for liver tissue repair: Current Knowledge and Perspectives.** World journal of Gastroenterology, v. 14, n. 6, 2008.

Marcia Regina Monteiro. **Plasma rico em plaquetas em dermatologia.** Surg Cosmet Dermatol, v. 5, n. 2 p.155, 2013.

Martins PDE, Uebel CO, Machado DC, Da Silva JB. **Uso de células-tronco adultas de tecido adiposo na cicatrização da pele: estudo controlado, randomizado.** Rev Bras Cir Plást.

NEFFA PINTO, J. M. ; PIZANI, N. S. **Aplicabilidade em dermatologia do plasma rico em plaquetas.** Surg Cosmet Dermatol. v. 7, n. 1, pag. 61- 64, 2015.

Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. **Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis.** Cell Transplant. 2011;20(2):205-16.

OLIVEIRA, C. S. et al. **Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, 2010.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. **Platelet-rich plasma in burns.** Burns: journal of the International Society for Burn Injuries, v. 36, n. 1, fev. 2010.

Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. **Burn wound healing and treatment: review and advancements.** Crit Care. 2015;19:243.

SOUZA, C. F. et al. **Células-tronco Mesenquimiais: Células ideais para a Regeneração Cardíaca?** Revista Bras Invasiva, 2010.

Yarak S, Okamoto OK. **Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas.** An Bras Dermatol 2010;85(5):647-56.

YOKOMIZO, V. M. F. et al. **Células- tronco derivadas de tecido adiposo: isolamento, cultivo in vitro e perspectivas de utilização em dermatologia.** Surg Cosmet Dermatol. 3(1):55- 9, 2011.

## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE POLPAS DE AÇAÍ COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BARRA DO BUGRES-MT

Data de aceite: 12/12/2019

### **Juliane Pereira de Oliveira**

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus  
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de  
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

### **Carine Schmitt Gregolin Caloi**

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus  
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de  
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

### **Carla Andressa Lacerda de Oliveira**

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus  
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de  
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

### **Rosimeire Oenning da Silva**

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus  
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de  
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

**RESUMO** O açaizeiro é uma das palmeiras encontradas na floresta Amazônica, tendo como fruto o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). As indústrias produtoras de açaí não pasteurizam seu produto e, deste modo, a verificação da qualidade microbiológica do açaí consumido no país necessita ser avaliada. A finalidade desta pesquisa foi avaliar a qualidade microbiológica da polpa de açaí comercializada nos estabelecimentos do município de Barra do Bugres - MT. Todas as metodologias de análises adotadas nesta pesquisa seguiram o

Compendium of methods for the microbiological for the examination of foods da American Public Health Association (APHA, 2001) sendo pesquisado a presença de micro-organismos conforme determina a resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. As amostras de polpa de açaí foram coletadas de forma aleatória em cinco estabelecimentos comerciais do município de Barra do Bugres MT. Os micro-organismos analisados foram: *Salmonella*, *Escherichia coli*, bolores e leveduras, segundo a legislação brasileira vigente. Todas as amostras apresentaram valores superiores de bolores e leveduras ao determinado pela legislação, já para verificação da presença de *E. coli*. apenas duas amostras (B e D) obtiveram resultados positivos por menor dos testes qualitativos de provas bioquímicas nos meios Indol, Vermelho de Metila, Citrato de Simmons (IMVIC). Sendo assim, sugere-se a aplicação de boas práticas de manipulação nos estabelecimentos de venda e a verificação da aplicação de tratamento térmico (pasteurização) nas indústrias produtoras de açaí.

**PALAVRAS-CHAVE:** Polpa de frutas, avaliação microbiológica, qualidade, açaí.

**MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF ACAI  
PULP MARKETED IN BARRA DO BUGRES-  
MT**

**ABSTRACT** Açaí palm is one of the palm trees found in the Amazon rainforest, having as its fruit açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). The açaí producing industries do not pasteurize their product and, therefore, the verification of the microbiological quality of the açaí berry consumed in the country needs to be evaluated. The purpose of this research was to evaluate the microbiological quality of açaí pulp sold in establishments in Barra do Bugres - MT. All the analysis methodologies adopted in this research followed the American Public Health Association Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 2001). 2001. Açaí pulp samples were randomly collected from commercial establishments in the municipality of Barra do Bugres MT. The microorganisms analyzed were: *Salmonella*, *Escherichia coli*, mold and yeast, following the current Brazilian legislation. All samples presented higher values of mold and yeast than that determined by the legislation, already to verify the presence of *E. coli*. Only two samples (B and D) obtained positive results through the qualitative tests of biochemical tests on Indol, Methyl Red, Simmons Citrate (IMVIC) media. Therefore, it is suggested the application of good handling practices in sales establishments and the verification of the application of heat treatment (pasteurization) in the açaí producing industries.

**KEYWORDS:** Fruit pulp, microbiological evaluation, quality, açaí.

## 1 | INTRODUÇÃO

O açaizeiro é uma das palmeiras encontrada na floresta Amazônica, tendo como fruto o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) o qual apresenta alto valor energético. Com isso sua comercialização vem aumentando cada vez mais, sendo utilizado como polpa para a produção de sucos, sorvetes, picolés e outros. Em regiões produtoras como Pará, a polpa é comercializada à temperatura ambiente (Costa et al., 2014).

Para obtenção de um alimento isento de qualquer tipo de contaminação, boas práticas desde a colheita, transporte, processamento e armazenamento, são decisivos, e quando se destina aos comércios distantes o processo de congelamento e pasteurização são os padrões mais utilizados onde são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância sanitária (BRASIL, 2001).

Entretanto, algumas das indústrias produtoras de açaí congelado não pasteurizam seu produto e, deste modo, a verificação da qualidade microbiológica do açaí consumido no país necessita ser avaliada, pois além da carga microbiana inicial alta dos frutos, a polpa de açaí pode ser contaminada por microbiota proveniente das condições higiênico sanitárias dos centros de comercialização (FARIA; OLIVEIRA; COSTA, 2012).

Perante este contexto, a finalidade desta pesquisa foi avaliar a qualidade microbiológica da polpa de açaí comercializada nos estabelecimentos do município de Barra do Bugres, Mato Grosso.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as metodologias de análises adotadas nesta pesquisa seguiram o Compendium of methods for the microbiological for the examination of foods da American Public Health Association (APHA, 2001) sendo pesquisado a presença de micro-organismos conforme determina a legislação.

### 2.1 Coleta de amostras

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, no campus de Barra do Bugres. Foram coletadas aleatoriamente amostras de polpa de açaí, provenientes de cinco estabelecimentos comerciais do município citado. As mesmas foram coletadas de forma asséptica, por meio de frascos estéreis e transportadas em caixa isotérmica para avaliação microbiológica de coliformes, *Salmonella*, bolores e leveduras.

### 2.2 Diluição das amostras

Inicialmente foram pesados 25 gramas de cada amostra adicionado em erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina e homogeneizado, correspondendo a diluição  $10^{-1}$ , foram realizadas diluições decimais subsequentes até a diluição  $10^{-4}$ .

### 2.3 Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Na avaliação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, utilizou-se a técnica de Número Mais Provável (NPM), ao qual foram pipetadas alíquotas de 1mL de cada diluição descritas no item 2.2 em três séries de tubos contendo 9mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com tubo de Duhran invertido, incubando-os a 35°C/48h. A partir dos tubos com produção de gás, foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo verde brilhante bile (2%) à 35°C por 48h e coliformes fecais em caldo Escherichia coli (EC) à 45,5°C por 24 horas. Para a confirmação da presença de *E. coli*, todas as subculturas positivas do caldo anterior foram repicadas para placas de Petri com os seguintes meios: ágar EMB, ágar Hektoen, ágar SS e ágar verde brilhante. As placas foram incubadas à 35°C por 18-24h, posteriormente verificou-se o crescimento de colônias com características de *E. coli* em cada meio específico. As colônias com características desta bactéria nos meios supracitados foram submetidas as provas bioquímicas do IMVIC (Indol, Vermelho de Metila (VM) e Citrato de Simmons (CS)) para a confirmação da presença da bactéria.

### 2.4 Determinação de *Salmonella*

Para as análises qualitativa de *Salmonella*, foram pesados 25g de amostras e adicionado em Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada tamponada

esterilizada, correspondendo a fase de pré-enriquecimento. Após 24 horas seguiu-se a fase de enriquecimento seletivo, para isso transferiu-se assepticamente do pré-enriquecimento, alíquotas de 1 mL para 9 mL de caldo tetratônato verde brilhante incubando-os a 42°C por 24h em banho maria. O plaqueamento diferencial foi feito nos meios sólidos: ágar verde brilhante, ágar Hektoen e ágar Salmonella Shigella incubados em estufa a 37°C por 24h. Após esse período foi observado a presença de colônias com características desse gênero de bactéria.

## 2.5 Determinação de Bolores e Leveduras

Na contagem de bolores e leveduras, realizou-se a inoculação por superfície em duplicata de 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri, previamente esterilizadas. Estas foram mantidas em estufa na temperatura de 25°C por 3 a 5 dias.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra as contagens de bolores e leveduras realizadas para as 5 amostras de açaí analisadas. Nota-se que o ponto A apresentou maior contagem ( $3,01 \times 10^4$  UFC/mL).

Pontos de coleta	Bolores e Leveduras (UFC/mL)
A	$3,01 \times 10^4$
B	$1,22 \times 10^4$
C	$2,5 \times 10^4$
D	$1,82 \times 10^4$
E	$2,7 \times 10^4$
Padrão <sup>a</sup>	$2,0 \times 10^3$
Padrão <sup>b</sup>	$m=10^3$ $M=10^4$

Tabela 1: Contagem de bolores e leveduras de amostras de açaí.

<sup>a</sup> Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2000

<sup>b</sup> Resolução RDC 12 de 02 janeiro de 2001

Os resultados obtidos das cinco amostras foram superiores ao valor determinado pelo Padrão de Identidade e Qualidade para polpas de frutas (BRASIL, 2000). De acordo com Santos et al (2008) baixas contagens de leveduras e bolores são consideradas aceitáveis, no entanto contagens elevadas indicam potencial deteriorante e apresentam risco à saúde do consumidor devido a possível produção de micotoxinas por fungos filamentosos.

Cohen et al (2011) ao avaliarem a qualidade microbiológica de polpas de açaí na cidade de Belém-PA encontraram contagem de fungos filamentosos e leveduras

entre  $9,0 \times 10^2$  e  $5,5 \times 10^5$ .

A tabela 2 apresenta os dados das leituras obtidos nos testes de coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* e *E. coli*.

<b>Pontos de coleta</b>	<b>Coliformes totais (NMP/g)</b>	<b>Coliformes termotolerantes (NMP/g)</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Salmonella</i></b>
<b>A</b>	NE	NE	NE	Ausente
<b>B</b>	7	7	Presente	Ausente
<b>C</b>	NE	NE	NE	Ausente
<b>D</b>	10	10	Presente	Ausente
<b>E</b>	NE	NE	NE	Ausente
<b>Padrão Microbiológico<sup>b</sup></b>	ND	$m=10/g$ $M=10^2$	$m=10/g$ $M=10^2$	Ausente

Tabela 2: Resultado confirmativo de coliformes totais, termotolerantes, *E. coli*, e *Salmonella*.

NE = Não encontrado; ND = Não determinado

<sup>b</sup> Resolução RDC 12 de 02 janeiro de 2001

Verificou-se a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes apenas nos Pontos B e D com Número Mais Provável (NMP) de 7 e 10 por grama de amostra, valores superiores ao encontrado por Jones e Lemes (2014). Os valores encontrados nas amostras do ponto D encontram-se no limite “m” estabelecido pela RDC 12 (2001) que em um plano de três classes separa amostras aceitáveis de amostras com qualidade intermediária.

Segundo Santos et al. (2016) a contaminação de alimentos se deve principalmente durante sua manipulação, ou ainda por má higienização dos equipamentos. Dentre os micro-organismos veículos de contaminação está a *E. coli*, que se faz presente na microbiota intestinal normal e possui habilidade de se tornar um patógeno.

Nesta pesquisa foi feito plaqueamento diferencial das amostras com resultado positivo em caldo EC para meio EMB (Eosina azul de metíleno), ágar Hektoen, ágar *Salmonella shigella* e ágar verde brilhante. As colônias apresentaram as características de *E. coli* de acordo com a descrição feita por Hajdenwurcel (2010) e Siqueira (1995).

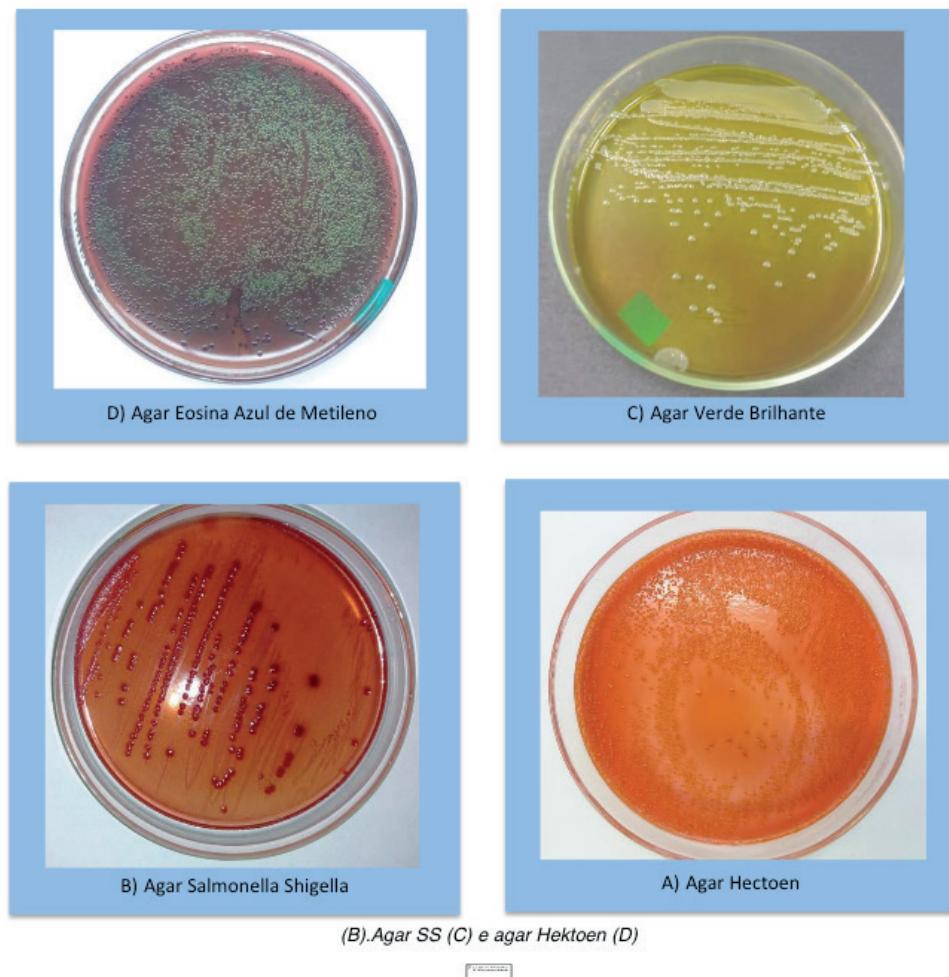


Figura 1: Plaqueamento da amostra de açaí nos meios de cultura EMB; (A) Verde Brilhante (B). Agar SS (C) e agar Hektoen (D)

As bactérias que apresentaram características de *E. coli* em placas foram submetidas as provas bioquímicas do IMVIC. Os resultados das provas bioquímicas nos meios Vermelho de Metila, Citrato de Simmons e Indol e estão apresentados na Tabela 3.

Ponto de coleta	Citrato de Simmons	Vermelho de Metila	Voges Proskauer	Indol
<b>B1</b>	–	+	–	–
<b>B2</b>	–	+	–	–
<b>B3</b>	–	+	–	–
<b>D1</b>	–	+	–	+
<b>D2</b>	–	+	–	+
<b>D3</b>	–	+	–	+

Tabela 3: Resultados das provas bioquímicas para *E. coli*, feito a partir de 3 colônias separadas.

Analisando a tabela, pode-se verificar que o ponto B apresentou resultados positivos para a prova de VM confirmando a presença de *E. coli* atípica enquanto as amostras do ponto D apresentaram resultados positivos também para indol caracterizando *E. coli* típica. Faria e Costa (2012) também detectaram presença de *E. coli* em polpas de açaí comercializada em Pouso Alegre, num total de 13,8% das amostras analisadas. As cinco amostras avaliadas apresentaram-se dentro do padrão microbiológico estabelecido para *Salmonella*, visto que não foi constatada a contaminação (BRASIL, 2001).

## 4 | CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, foram identificadas apenas duas amostras com a presença de *E. coli*, no entanto, no que tange a presença de bolores e leveduras, todas as amostras mostraram resultados insatisfatórios, indicando que todos os produtos estavam fora dos padrões exigentes. Sendo assim, sugere-se a aplicação de boas práticas de manipulação nos estabelecimentos de venda e a verificação da aplicação de tratamento térmico (pasteurização) nas indústrias produtoras.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**: 4 ed. Washington, 2001.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução n-12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, p. 46-53, 2001.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 01/00, de 07/01/00. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília - DF, 10 jan. 2000, Seção I, p.54-58.
- COHEN, K. O. et al. **Contaminantes microbiológicos em polpas de açaí comercializadas na cidade de Belém-PA**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial: Pará, v. 5, n. 2, 2011.
- COSTA, A. P. D. et al. **A Capacidade de inovação técnica de ribeirinhos do Estuário Amazônico: o Manejo de Açaizais nos PAEX Mutirão Japuretê e Emanuel**. Cadernos de Agroecologia, v. 9, n. 4, 2014.
- FARIA, M.; OLIVEIRA, L. B. D.; COSTA, F. E. C. **Determinação da qualidade microbiológica de polpas de açaí congeladas comercializadas na cidade de Pouso Alegre – MG: Minas Gerais**, Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 243-249, 2012.
- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, v.1, 1998.
- JONES, L. C.; LEMES, R. M. L. **Análise microbiológica de polpas de açaí comercializadas em**

**uma cidade do sul de Minas Gerais: Minas Gerais, Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 12, n. 2, p. 601-608, 2014.**

**SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 4, 2008.**

**SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: Embrapa, 1995.**

## ANÁLISE IN SILICO DO GENOMA DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) PARA O EXTREMO SUL DA BAHIA: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E GENES CANDIDATOS PARA ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Data de aceite: 12/12/2019

### **Tamy Alves de Matos Rodrigues**

Universidade Federal do Sul da Bahia – UFSB,  
Centro de Formação em Ciências da Saúde  
Teixeira de Freitas – BA

### **Lívia Santos Lima Lemos**

Universidade Federal do Sul da Bahia – UFSB,  
Instituto de Humanidades, Artes e Ciências  
Teixeira de Freitas – BA

### **Breno Meirelles Costa Brito Passos**

Universidade Federal do Sul da Bahia – UFSB,  
Instituto de Humanidades, Artes e Ciências  
Teixeira de Freitas – BA

### **Jeilly Vivianne Ribeiro da Silva Berbert de Carvalho**

Polímata, Soluções Agrícolas e Ambientais  
Teixeira de Freitas – BA

**RESUMO:** A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos alimentos mais básicos do mundo, compondo fonte de carboidratos e estando presente na alimentação de milhões de pessoas nos países em desenvolvimento. O Nordeste brasileiro responde por 24% da produção nacional de mandioca, em cuja região Extremo Sul no estado da Bahia encontra-se em uma situação inferior à média estadual, no qual o cultivo é feito quase em toda sua totalidade por agricultores familiares. Com

o objetivo principal de alcançar o aumento da produtividade da mandioca, vê-se que a introdução de novas variedades, adaptadas às condições edafoclimáticas locais é um dos meios para se promover esta melhoria e aumentar o rendimento da mandiocultura. Por isso, é necessário um esclarecimento sobre a variabilidade genética desses acessos, para que se tenha uma melhor eficiência e clareza de quais deles serão incluídos na etapa de avaliação agronômica. Com o sequenciamento da mandioca aliado ao uso de ferramentas da bioinformática é possível o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares ainda limitadas para essa cultura na região. Estes dados genômicos são uma incrível fonte para identificação de polimorfismos (microssatélites-SSRs) podendo ser utilizados para seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Desta forma, como ponto de partida para desenvolvimento de futuros projetos de pesquisa envolvendo o estudo da variabilidade genética e expressão de genes da Mandioca no Extremo Sul da Bahia, este projeto teve por objetivo a identificação de marcadores moleculares e de genes candidatos para o estudo de expressão gênica, utilizando dados Genômicos e Transcriptônicos da *Manihot esculenta* Crantz.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioinformática. Genoma. Mandiocultura.

# IN SILICO ANALYSIS OF CASSAVA GENOME (*Manihot esculenta* CRANTZ) FOR THE FAR SOUTHERN REGION OF BAHIA: IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS AND CANDIDATE GENES FOR GENE EXPRESSION STUDY

**ABSTRACT:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most basic foods in the world, making up the carbohydrate source and being present in the diet of millions of people in developing countries. The Brazilian Northeast accounts for 24% of the national production of cassava, in whose the far southern region of Bahia state, which is lower than the state average, where the cultivation is practiced almost entirely by family farmers. For the purpose of increasing productivity of cassava, it is seen that the introduction of new varieties, adapted to the local edaphoclimatic conditions, is one of the means to promote this improvement and increase the yield of cassava crop. Therefore, it is necessary to clarify the genetic variability of these accesses, in order to have a better efficiency and clarity of which will be included in the agronomic evaluation stage. With the sequencing of cassava combined with the use of bioinformatics tools, it is possible to develop new molecular tools that are still limited for this crop in the region. These genomic data are an incredible source for identification of polymorphisms (microsatellites-SSRs) and can be used for molecular marker assisted selection (MAS). Thus, as a starting point for the development of future research projects involving the study of genetic variability and expression of cassava genes in the far southern region of Bahia, this project aimed to identify molecular markers and candidate genes for the study of gene expression, using Genomic and Transcriptomic data from *Manihot esculenta* Crantz.

**KEYWORDS:** Bioinformatics. Genome. Mandioculture.

## 1 | INTRODUÇÃO

A mandioca, eleita pela Organização das Nações Unidas como alimento do século XXI, é historicamente utilizada pelos seres humanos nas Américas desde antes da colonização europeia no século XV (PEARSALL, 1992; SWEET, 1974; ESPINOSA, 1948; FRASER; CLEMENT, 2008). Tendo como origem a Amazônia, esta planta tuberosa encontra-se difundida, hodiernamente, por todo o orbe terrestre graças a sua adaptabilidade aos mais variados climas e condições do solo, o que faz com que seja pressuposto a sua alta variabilidade genética, principalmente no Brasil, onde se encontra um eixo de diversidade do gênero *Manihot* (ROGERS; APPAN, 1973), do qual já foram identificadas mais de duzentas espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo a *Manihot esculenta* Crantz a única cultivada comercialmente para a produção de raízes comestíveis.

A cultura da mandioca é cultivada em ambientes tropicais e subtropicais, possuindo manejo de lavra rústico, de fácil produção em solos menos férteis, além de ser consideravelmente resistente a pragas e doenças (AMARAL; JAIGOBIND;

JAISINGH, 2007; OTSUB; PEZARICO, 2002), podendo compor a base alimentícia dos seres humanos e animais e ser aproveitada com fins na indústria farmacêutica e na produção de álcool. Tais características fazem com que a mandioca seja uma planta de salutar relevância social e econômica para o país.

De acordo com Ribeiro (2010), a manufatura da mandioca integra cerca de dois milhões de pessoas à cadeia produtiva, convertendo-se na terceira cultura que mais emprega no Brasil, responsável por 14,2% dos empregos no campo. No que concerne ao Nordeste brasileiro, ele responde por 24% da produção nacional e a Bahia apresenta produtividade média de  $13,2\text{t/ha}^{-1}$  (IBGE, 2016). A região do Extremo Sul baiano, cuja atividade é composta principalmente pela agricultura familiar na utilização da variedade Caravelas, encontra-se em uma situação inferior à média estadual, com rendimentos em torno de 12 t/ha.

Como intuito de impulsionar a cultura na região supramencionada e fortalecer sua cadeia produtiva foi criado, em dezembro de 2016, o Plano de Ação da Mandiocultura do Território do Extremo Sul da Bahia. Sabe-se que o objetivo de alcançar o aumento da produtividade da mandioca, requerendo melhorias que expandam as condições de sustentabilidade do setor e diminuam os impactos da produção no meio ambiente só podem ser alcançados com a realização de pesquisas, sobretudo no que tange à utilização de novas variedades, cuja introdução no ambiente é praticável se for condizente com as condições edafoclimáticas. Para tal, é necessário um estudo acerca da variabilidade genética desses acessos, a fim de que se tenha uma melhor eficiência e clareza de quais acessos poderão ser incluídos na etapa de avaliação agronômica.

O sequenciamento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (PROCHNIK *et al.*, 2012) aliado ao uso de ferramentas da bioinformática torna possível o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para a cultura na região. As análises do tipo *in silico* são realizadas como meio de identificar sequências de genes relacionadas com processos biológicos de interesse. Estes dados genômicos são fonte para identificação de polimorfismos (microssatélites-SSRs) utilizados para seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). A saber, os SSRs são marcadores que fornecem codominância, e que foram utilizados em análises de polimorfismo em plantas (FUJII; TORIYAMA, 2005; JENSEN *et al.*, 2005).

O estudo de matrizes de expressão gênica demanda maneiras pelas quais podem ser realizadas. Inicialmente, faz-se o estudo de comparação do perfil de expressão de genes entre os genes analisados; isto feito, compara-se o perfil de expressão dos experimentos a partir de buscas e análises em ensaios bibliográficos. Segundo Southem (1975), se existir normalização dos dados analisados é possível realizar uma combinação de ambos. Neste caso, possibilitaria uma investigação entre similaridades e diferenças. O agrupamento – ou clusterização – é utilizado como

processo de separação dos elementos em grupos de similaridade, estabelecendo distâncias mínimas e máximas entre os mesmos.

Desta forma, como ponto de partida para o desenvolvimento de futuros projetos de pesquisa envolvendo o estudo da variabilidade genética e expressão de genes da mandioca no Extremo Sul da Bahia, este trabalho teve por objetivo elaborar uma revisão sistemática com metanálise a respeito da identificação de marcadores moleculares e de genes candidatos para estudo de expressão gênica na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Ao realizar-se um levantamento de artigos que desenvolveram análise da diversidade genética da mandioca, por meio de ações e estratégias específicas, utilizando métodos pragmáticos e sistematizados de pesquisa, análise e seleção dos dados, este estudo permitiu analisar os resultados relevantes, por meio da identificação e compilação de *primers*, resultando em uma ferramenta útil para selecionar materiais com características marcantes para o melhoramento da mandioca.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do trabalho foram utilizadas publicações encontradas nas bases de dados eletrônicas (SciELO; Periódicos CAPES), sobre a identificação de marcadores moleculares e genes candidatos para estudo de expressão gênica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Os artigos científicos que auxiliariam na identificação de marcadores moleculares e de genes candidatos para estudo de expressão gênica da *M. esculenta* foram revisados. Os idiomas aceitos para leitura foram o português e o inglês e os descritores utilizados para a pesquisa foram: *Manihot*, Microsatellites, ESTs (expressed sequence tag) e SSR (simple sequence repeats).

Os critérios de inclusão para escolha dos artigos a serem selecionados para a revisão sistemática com metanálise foram:

- Estudos analítico-experimentais;
- Presença de estudos com marcadores moleculares e genes candidatos para estudo de expressão gênica em *Manihot esculenta* Crantz;
- Idiomas: português e inglês.

Para isso foram utilizados os filtros de refinamento das próprias bases (ano de publicação, idioma, tipo de estudo e descritor no título). Ainda que os filtros automáticos disponibilizados pelas bases de dados não possam ser considerados fidedignos para a exclusão de estudos, já que estão além do controle dos revisores, o método propiciou objetividade na busca, principalmente, com relação ao conteúdo e sua relação com o escopo da revisão sistemática, não excluindo a etapa de leitura

integral dos artigos posteriormente.

A fim de se obter a identificação das similaridades entre as sequências promotoras e suas funcionalidades supostas, estas tiveram suas regiões *ítrons* e exons submetidas ao BLAST e o TBLASTX, a fim de confirmar sua identidade. O programa PLACE foi utilizado para identificar elementos reguladores conhecidos em outras plantas, tais como elementos responsivos à luz, elemento responsivo ABA, elemento responsivo ao estresse, elementos *jasmonate* e *elicitor* responsivos, motivo ACGT relacionado à expressão da raiz e elementos específicos da raiz. Em relação a identificação de resistência à doença do mosaico da mandioca, os mesmos foram realizados por meio da técnica de *Molecular-assisted selection* (MAS) ou seleção assistida molecularmente.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As pesquisas nas bases de dados identificaram 310 artigos com potencial de inclusão na revisão. Entretanto, após leitura deles, somente 13 estudos foram selecionados para a composição da revisão sistemática, em cuja análise permitiu a organização dos dados, discriminando seus métodos, eficiência analítica, apresentação e resultados alcançados de modo satisfatório seja na avaliação da diversidade genética seja na identificação de *primers* relacionados à eleição de traços importantes para o melhoramento genético.

Para tanto, foram identificadas relações de similaridade para as seguintes características: comportamento nutritivo, capacidade de recuperação pós-danificação física, resposta aumentada à captação de luz, resistência à deficiência hídrica, à salinidade e ao estresse de frio, padrão de alocação de biomassa relacionado à otimização da captação de recursos mais escassos, estimulação do crescimento celular, alongamento de caules e raízes, controle do gravitropismo (ou geotropismo), promoção de dominância apical, retardamento de abscisão (queda das folhas) e resistência a doenças.

A análise realizada acerca da resistência à DMC utilizando MAS identificou que o gene CMD1, previamente descrito em *M. glaziovii*, não foi encontrado em *M. esculenta*. Em contraste, o gene CMD2 foi encontrado em 5, 4 e 5% dos acessos de mandioca, com marcadores flankeadores NS169 + RME1, NS158 + RME1 e SSRY28 + RME1, respectivamente (CARMO, C. D. *et al.*, 2015). Já no que tange ao estudo da variabilidade genética em etnovariedades de mandioca por meio de marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), o resultado obtido foi de que 99,3% de lócus são polimórficos (SILVA, K. V. P *et al.*, 2011).

Avaliou-se, pela amplificação de microssatélites e análise estatística, a diversidade genética de 42 variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) selecionadas

de regiões no Brasil, examinando-se como estas são distribuídas nos municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Mato Grosso. Com isso, encontrou-se altos valores de diversidade nas cinco regiões analisadas, com 3,3 alelos por loco em média, além de uma alta porcentagem de loci polimórficos variando de 88,8% a 100%, bem como uma média de 0,265 para heterozigosidade observada e 0,570 para a diversidade genética (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Investigou-se, por meio de microssatélites, a estrutura e diversidade genética de 83 espécies de mandioca compostas por variedades locais, cultivadas por produtores tradicionais de sete municípios do estado do Mato Grosso do Sul e sua distribuição dentro do e entre os municípios do ecossistema do Cerrado, obtendo-se que todos os loci analisados são polimórficos, com média de 6,00 alelos por locil, além de apresentarem altos valores de heterozigosidade e diversidade genética (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Quanto aos promotores de genes que poderiam ser usados para expressão genética adequada a partir da mandioca, identificaram-se elementos reguladores conhecidos em outras plantas na sequência do promotor ARP, como os elementos responsivos à luz, ao estresse, motivo ACGT relacionado à expressão da raiz e elementos específicos dela (GBADEGESIN; BEECHING, 2001).

Em relação à variabilidade genética em acessos de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) mantidas no campo e às similaridades entre diferentes acessos de plantas micropropagadas, encontrou-se homogeneidade genética ao se utilizar ISSR (VIDAL *et al.*, 2015). Ao investigar-se a diversidade genética por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado por microssatélites (M-AFLP), identificou-se que esta técnica é um método eficaz para gerar marcadores microssatélites que são úteis para a análise da diversidade genética em espécies de *Manihot* (WHANKAEW *et al.*, 2012).

Quando se buscou analisar os bancos de dados públicos para identificar *expressed sequence tags* (EST) com a projeção de 49 *primers* a partir de sequências contendo di-, tri-, tetra-, penta e hexanucleotídis da mandioca, obteve-se que não há similaridade de sequência entre os dois conjuntos de sequências, indicando que os *loci* marcadores desenvolvidos neste estudo são novos (TANGPHATSORNRUANG, *et al.*, 2008). Ademais, ao caracterizar molecularmente acessos da mandioca por marcadores de *single nucleotide polymorphism* (SNP) em uma das maiores coleções de germoplasma desta cultura na América Latina na Embrapa Mandioca e Fruticultura, detectou-se somente pequenas alterações nos parâmetros de diversidade para as diferentes coleções nucleares em comparação com a coleção completa (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

Ao projetar *primers* para as sequências *long terminal repeats* (LTR) dos marcadores *inter-retrotransposon amplified polymorphism* (IRAP) e *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism* (REMAP) a partir do banco de dados da

mandioca foi produzido um alto número de bandas reprodutíveis, podendo ser informativos confiáveis para a investigação da diversidade genética e das relações entre seus cultivares (KUHN *et al.*, 2016). No que concerne à identificação de novos alelos para o de mapeamento de associação de traços de marcadores relacionados à tolerância à seca em germoplasmas de mandioca por meio da averiguação de *Expressed sequence tags-Simple sequence repeat* (EST-SSR), conforme o estudo de Wang *et al.* (2017), 53 de 107 marcadores estavam significativamente associados a características relacionadas à seca.

Realizada a caracterização e validação de 192 microssatélites identificados *in silico* a partir de 8.577 unigenes de mandioca definida por *fingerprinting* de DNA objetivando aumentar o número de marcadores SSR, a identificação dos derivados de 18.177 EST marcadores microssatélites em termos de abundância e nível de polimorfismo, assim como a avaliação de sua possibilidade de transferência para outras espécies na família *Euphorbiaceae*, foram identificados 836 microssatélites e um conjunto de 124 novos e únicos polimórficos EST-SSRs, o que amplia o repertório de marcadores SSR para a mandioca cultivada e seus parentes silvestres (RAJI *et al.*, 2009). Outrossim, ao desenvolver EST-SSRs utilizando recurso EST de mandioca e diversidade genética de vários acessos de *Manihot*, foi demonstrado o potencial de SSRs derivados dela, com um total de 1.889 microssatélites identificados, em estudo realizado por Zou *et al.* (2011). Ao desenhar *primers* identificou-se que dos 1.058 EST-SSRs desenhados, 431 foram polimórficos.

Características como a capacidade de aumento da captação de luz em ambientes sombreados podem estar associados a padrões de alocação de biomassa, identificados em uma sequência como local de ligação ABF (alocação de biomassa em folhas), que se relacionam diretamente com a otimização da captação dos recursos mais escassos. Em casos de deficiência hídrica foi identificada uma relação com um elemento responsivo ABA, um fitormônio ácido abscísico (Abscisic Acid - ABA). Dessa forma é possível associá-lo como indicador ou sinalizador ambiental indutivo de resposta à deficiência hídrica, à salinidade e ao estresse ao frio.

Foram, também, identificados elementos *jasmonate* e *elicitor* responsivos, os quais, sendo propostos como intermediários de sinalização na ferida e na defesa de plantas, mostraram a possibilidade de que o ácido jasmônico se configure como uma parte importante no sistema de sinalização e regulação de defesa vegetal. Diversas características foram associadas ao elemento sintético de auxina altamente ativo, uma vez que, além de estimular o crescimento celular, o alongamento de caules e raízes e o desenvolvimento dos frutos, também estão associados ao controle do gravitropismo, na promoção de maior dominância apical e retardo de abscisão.

A Doença do Mosaico da Mandioca (CMD) está entre as principais doenças globais dessa cultura e, no Brasil, é considerada doença de quarentena. Os prejuízos

ocasionados por eles vão desde perdas econômicas até avarias sociais. Mesmo existindo variadas medidas de controle, fazer uso de variedades resistentes é considerada a solução mais eficaz, já que não existiria fonte de inoculo nas culturas. Nenhuma das sequências identificadas relacionadas ao CMD1 foram encontradas nos acessos de mandioca no Brasil, embora têm sido usados como fonte de resistência a CMDs na África. Para as sequências de CMD2, sua implantação foi considerada bem-sucedida na transferência de genótipos de resistência genética em variedades na América Latina. Nesse sentido, certamente a implantação de uma alta variabilidade genética do germoplasma nacional da mandioca resistente à CMD obteria êxito, considerando que o Brasil é o seu centro de origem.

## 4 | CONCLUSÃO

Nessa perspectiva, dado que a mandioca ainda constitui um importante meio de subsistência para agricultura familiar e agricultores tradicionais, é profícuo que haja contribuições para o melhor conhecimento de variedades e distribuição genética deste alimento. Para que ele seja possível, o melhoramento genético depende da extensão de variabilidade genética do germoplasma estudado, característica essa apresentada pelos estudos realizados. Conhecer a diversidade genética é um requisito importante para melhorar e aumentar a produção de diferentes cultivares com qualidades que contribuam em seu manejo, como resistência a fatores climáticos, possibilidade de resistência a CMD e aumento da produtividade. Nos estudos realizados foram identificados *primers* da *Manihot esculenta* Crantz com similaridade para características que possivelmente podem auxiliar em estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, L.; JAIGOBIND, A. G. A.; JAISINGH, S. **Processamento de mandioca:** dossier, 2007.
- CARMO, C. D. et al. **Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz.** Sci. Agric., v. 72, n. 6, p. 520-527, 2015.
- CONESA, A. et al. **Blast2GO:** a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics, v. 21, n. 18, p. 74-3676, 2005.
- ESPINOSA, V. **Compendio y descripción de las Indias Occidentales.** Smithsonian Institution: Washington, 1948.
- FAIRCLOTH B. C. **Msatcommander:** Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. Molecular Ecology Resources, v. 8, p. 92–4, 2008.
- FIALHO, J. F.; ANDRADE, R. F. R.; VIEIRA, E. A. **Mandioca no Cerrado – Questões práticas.** Brasília: EMBRAPA: Cerrados, 2009.

FRASER, J. A.; CLEMENT, C. R. **Dark Earths and manioc cultivation in Central Amazonia: a window on pre-Columbian agricultural systems?** Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciênc. hum., v. 3, n. 2, p. 175-94, 2008.

FUJII, S.; TORIYAMA, K. **Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CWtype cytoplasmic male sterility of rice.** Theoretical and Applied Genetics, Jun 10. 2005.

GBADEGESIN, M. A.; BEECHING, J. R. **Isolation and partial characterization of a root-specific promoter for stacking multiple traits into cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ).** Genetics and Molecular Research, v. 10, n. 2, p. 1032-1041, 2011.

GOODSTEIN D. M. et al. **Phytozome:** a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research, v. 40, p. 1178-86, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil.** 113p. 2016.

JENSEN, L.B. et al. **QTL mapping of vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals co-location with an orthologue of wheat VRN1.** Theoretical and Applied Genetics, v. 110, n. 3, p. 527-36, 2005.

KUHN, B. C. et al. **Development of retrotransposon-based markers IRAP and REMAP for cassava (*Manihot esculenta*).** Genetics and Molecular Research, v. 15, n. 2, 2016.

OLIVEIRA, E. J. et al. **Development of a cassava core collection based on single nucleotide polymorphism markers.** Genetics and Molecular Research, v. 13, n. 3, p. 6472-6485, 2014.

OTSUB, A. A.; PEZARICO, C. R. A cultura da mandioca em Mato Grosso do Sul. In: OTSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. S. **Aspectos do cultivo da mandioca em Mato Grosso do Sul.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2002. p. 31-47.

RAJI, A. A. et al. **Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility.** BMC Plant Biology, v. 9, n. 118, 2009.

SILVA, K. V. P et al. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesq. agropec. bras.**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SIQUEIRA, M. V. B. M. et al. **Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats.** Genetics and Molecular Biology, v. 32, n. 1, p. 104-110, 2009.

SIQUEIRA, M. V. B. M. et al. **Microsatellite Polymorphisms in Cassava Landraces from the Cerrado Biome, Mato Grosso do Sul, Brazil.** Biochem Genet, v. 48, p. 879–895, 2010.

TANGPHATSORNRUANG, S. et al. **Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihot esculenta* Crantz.** Molecular Ecology Resources, v. 8, p. 682-685, 2008.

VIDAL, A. M. et al. **Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers.** Genetics and Molecular Research, v. 14, n. 3, p. 7759-7770, 2015.

WANG, B. et al. **Molecular diversity analysis, drought related marker-trait association mapping and discovery of excellent alleles for 100-day old plants by EST-SSRs in cassava germplasms (*Manihot esculenta* Crantz).** PLoS One, v. 12, n. 5, 2017.

WHANKAEW, S. et al. **Characterization of microsatellite markers in cassava based on microsatellite-AFLP technique.** Genetics and Molecular Research, v. 11, n. 2, p. 1319-1326, 2012.

ZOU, M. et al. **Mining EST-Derived SSR Markers to Assess Genetic Diversity in Cassava (*Manihot esculenta Crantz*).** Plant Mol Biol Rep, v. 29, p. 961-971, 2011.

## AÇÃO DE EXTRATOS E BIOCOPPOSTOS DE *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) Woodson NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS CULTIVADAS DE MELANOMA MURINO B16-F10

Data de aceite: 12/12/2019

### **Lucimar Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professora  
Doutora Adjunta de Biofísica, Departamento de  
Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

### **Silvana Gaiba**

Universidade Federal de São Paulo, Professora  
Doutora do Departamento de Cirurgia, São Paulo  
– SP

### **Elias Jorge Muniz Seif**

Universidade Federal de São Paulo, Mestrando  
em Biologia Molecular, Departamento de Biofísica,  
São Paulo – SP

### **Flávia Costa Santos**

Universidade Estadual de Santa Cruz, Discente  
do Curso de Enfermagem, Departamento de  
Ciências da Saúde, Ilhéus - Ba

### **Ana Carolina Moraes Fernandes**

Universidade Federal de São Paulo, Doutora da  
Unidade de Tratamento de Queimaduras (UTQ),  
Departamento de Cirurgia, São Paulo – SP

### **Luiz Alberto Mattos Silva**

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor  
Assistente de Botânica, Curador do Herbário  
UESC, Departamento de Ciências Biológicas,  
Ilhéus - Ba

### **Jerônimo Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor  
Doutor Adjunto de Biofísica, Departamento de  
Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

### **Lydia Masako Ferreira**

Universidade Federal de São Paulo, Professora  
Titular da Cirurgia Plástica, Departamento de  
Cirurgia, São Paulo – SP

### **Alba Lucilvânia Fonseca Chaves**

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professora  
Doutora Adjunta de Botânica, Departamento de  
Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

**RESUMO:** As linhagens celulares imortalizadas de melanoma são usadas para testar a eficácia dos medicamentos quimioterápicos. Assim, a linhagem de tumor B16-F10 serve como modelo para estudo in vivo e in vitro de melanoma. O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas medicinais para a fabricação de fitoterápicos. O objetivo desse trabalho foi identificar os biocompostos presentes na folha, e avaliar a atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson (EEHL) em células cultivadas de melanoma (B16-F10), e em células não tumorais de ovário de hamster chinês (CHO), controle. A análise histoquímica do EEHL indicou a presença de lipídios, taninos, alcaloides entre outros. A citotoxicidade do EEHL contra B16-F10 foi determinada por fotometria (MTT). O EEHL apresentou 02 fases com diferença estatística significativa ( $p<0.001$ ) e alto índice de seletividade (IS), superior a 3 (aproximadamente 80), para

B16-F10 em relação às CHO. As frações polares e apolares do EEHL apresentaram alta citotoxicidade contra as células B16-F10 (0,001–650  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Já a fração apolar (FAHL) apresentou três fases, indicativo de três ou mais compostos ativos. Esses resultados são promissores e necessitam de maiores estudos. O tratamento contra o câncer de pele do tipo melanoma é o resultado da ação eficiente do medicamento na difícil distinção entre células malignas e normais do corpo, e pode significar a vida ou a morte de um paciente.

**PALAVRAS-CHAVE:** citotoxicidade; extrato de planta; melanoma; B16-F10; *Himatanthus lancifolius*.

**ACTION OF *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) Woodson EXTRACTS AND BIOMATERIALS IN THE CONTROL OF CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS INDUCTION IN CULTIVATED CELLS OF MURINO MELANOMA B16-F10.**

**ABSTRACT:** Immortalized melanoma cell line are used to test the efficacy of chemotherapy drugs. Thus, murine B16-F10 melanoma cell line serves as a model of melanoma in vivo and in vitro study. Brazil is the most biodiverse country, with medicinal plants for the manufacture of herbal medicines. The objective of this work was to identify biocompounds present in the leaf and to evaluate the cytotoxic activity of the ethanolic extract on the leaves of *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson (EEHL) against cultured melanoma cells (B16-F10) and against Hamster Ovary (CHO) cells, non-tumor cells (Control). The histochemical analysis of the EEHL indicated the presence of lipids, tannins, alkaloids among others. The cytotoxicity of the EEHL against B16-F10 was determined by photometry (MTT). The EEHL, the polar (FPHL) and apolar fractions (FAHL) showed high cytotoxicity in B16-F10 (0.001–650  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). The EEHL presented 02 phases with significant difference ( $p<0.001$ ) and high selectivity index (IS), higher than 3 (approximately 80), for B16-F10 in relation to CHO. The apolar fraction (FAHL) presented three phases, indicative of three or more active compounds. These results are promising and need further study. Treatment against melanoma-type skin cancer is the result of the drug's effectiveness in the difficult distinction between malignant and normal body cells, that may indicate the life or death of a patient.

**KEYWORDS:** cytotoxicity; plant extract; melanoma; B16-F10; *Himatanthus lancifolius*;

## 1 | INTRODUÇÃO

A planta do gênero *Himatanthus* pertence à família *Apocynaceae*, próprio da América do Sul, composto por 14 espécies. É um arbusto de porte médio, e seu gênero possui considerável relevância na medicina tradicional, suportada por estudos que demonstram seu uso popular para diversos fins medicinais, por apresentar biocompostos farmacológicamente ativos, entre eles alcalóides indólicos, iridóides e ésteres triterpênicos (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; SOUZA, 2007).

Tais compostos apresentam atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (SOUZA et al., 2004; NARDIM et al., 2008) e principalmente antitumoral (SEIDL et al., 2017).

Baratto (2010) apud Silva, 1929 que descreve *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson como uma espécie neotropical da Farmacopeia Brasileira (1<sup>a</sup> edição - SILVA, 1929), sob o basinômio de *Plumeria lancifolia* Müll. Arg., e nessa monografia descreve que as cascas do caule, e a raiz age como droga vegetal de múltipla ação, inclusive para tratamento de doenças de pele.

O câncer se tornou a segunda causa de morte da população, nos países mais desenvolvidos do mundo, sendo apenas superado pelas doenças cardiovasculares (GRUNFELD et al., 2004). Contudo, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, os índices também são alarmantes.

As estimativas para o ano de 2018-2029 no Brasil são semelhantes a países desenvolvidos, com a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer. Considerando 68 mil novos casos de cânceres de próstata em homens 60 mil casos novos de mama em mulheres. Serão os mais frequentes os cânceres de pele tipo não melanoma, pulmão, intestino, estômago, cavidade oral, para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, intestino, colo do útero, pulmão e tireoide, para mulheres (INCA, 2017).

O melanoma é uma neoplasia maligna que atinge os melanócitos da pele, células dendríticas, fenotipicamente importantes, responsáveis pela síntese de melanina. A maioria dos melanócitos está localizada na pele, na camada basal da epiderme e em menor proporção na derme, porém também podem ser encontrados nas outras regiões do corpo, como olhos, mucosas e leptomeninges (MIOT et al., 2009). Em tumores, a difícil distinção entre células malignas e normais do corpo dificulta a obtenção de um tratamento mais eficiente.

## 2 | OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi a identificação qualitativa dos biocompostos presentes nas folhas de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, e avaliar a atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico dessas folhas em células cultivadas tumorais de melanoma (B16-F10) e de células controle não tumorais de ovário de hamster chinês (CHO).

## 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Cultivo de Células

As culturas de células foram tratadas com tripsina 0,2%, antes ou durante o estado de subconfluência. O meio era removido e as células lavadas com solução

de Versene: PBS NaCl (140mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,6mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10mM), EDTA (0,5mM) e sulfato de gentamicina (50mg/mL), o qual era aspirado. Após lavagem com PBS adicionamos 2,0 ml de tripsina em cada garrafa. As garrafas contendo as culturas de células foram transferidas para a estufa de CO<sub>2</sub> o tempo suficiente para que as células se soltem da matriz da garrafa (1-4 minutos), conforme o grau de atividade enzimática. Durante este intervalo, monitoraremos o descolamento das células com o auxílio do microscópio invertido de contraste de fase e coradas com marcadores fluorescentes para análise do crescimento e da morfologia (figuras 01 e 02). A suspensão de células era transferida para um tubo côncico, em RPMI completo e centrifugada durante 4 min a 358 g. Fez-se a contagem dessas células por meio da câmara de Neubauer.

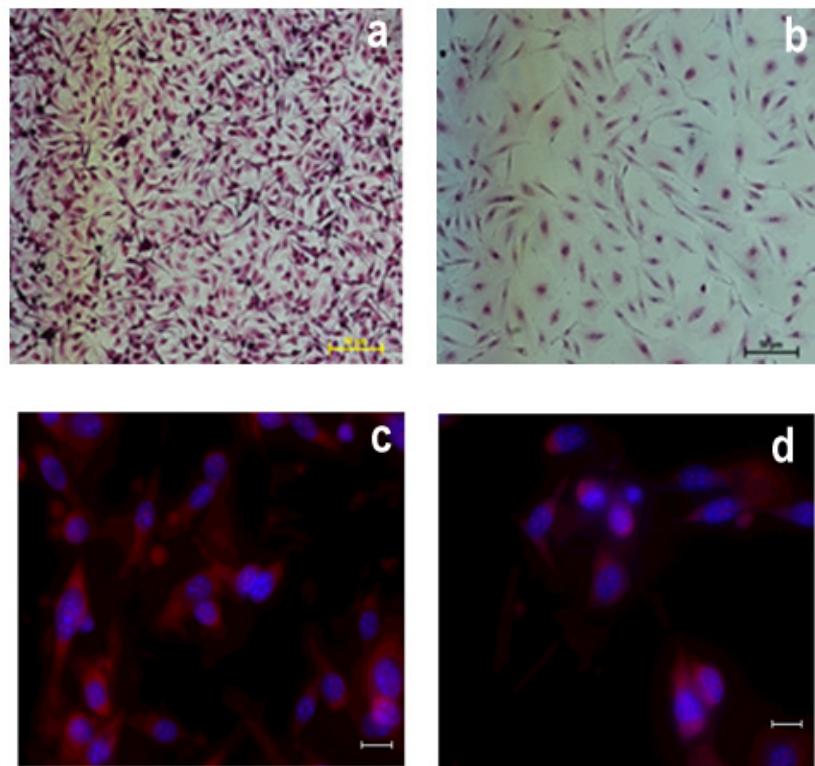


Figura 1. Micrografias das células de melanoma B16F10 ( a ); CHO ( b ) do grupo controle coradas com HE identificando o citoplasma e núcleo, respectivamente (barra de escala 50µm). As imagens foram obtidas por microscópio fotônico invertido Olympus/modelo CKX41 células de melanoma B16F10( c ) e CHO( d ) coradas com rodamina (vermelho) e DAPI (azul) identificando o citoplasma e o núcleo, respectivamente (barra de escala 20µm). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência microscópio Evos FL (AMF-4302) da ThermoFisher.

### 3.2 Determinação da atividade celular

Foram semeadas 1x10<sup>3</sup> células em cada poço de placas de cultura (96 poços) com 100µL de meio RPMI 1640 completo e mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 300µL de meio RPMI 1640 completo contendo os fitoextratos isolados da *Himatanthus Lancifolius* (0,0002 a 20µg/mL), por 48h. Para determinação da atividade celular,

estas células foram incubadas com uma solução de 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) por 4h. O meio contendo MTT foi removido e substituído por 100µL de álcool isopropílico, e após 10 minutos, as leituras de absorbância foram determinadas por fotometria em leitor de ELISA (Biochrom, modelo EZ Read 400) em 570nm.

### 3.3 Planta medicinal e preparo dos extratos

A planta medicinal utilizada para estudo da atividade citotóxicidade foi a *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson da família Apocynaceae que foi coletada no campus da UFBA / Salvador. Coordenadas Geográfica: Latitude: (-13.00119), Longitude: (-8.508493) e depositada no Herbário de Botânica da UESC sob número de voucher 23374 (figura 2 a). As folhas da *Himatanthus lancifolius* (figura 3A) foram secas em estufa ventilada (Biofoco, modelo BF2 ECN 100) e trituradas (Bermar, modelo BM 31) até que se obtivesse um pó de cor verde. Desta forma, os extratos hidroalcoólicos foram preparados com 1g do pó das folhas em 40mL de etanol/água 70% (V/V). Esta mistura foi reservada em um tubo de 50 ml e ficou no homogeneizador de soluções (Phoenix, modelo AP-22) por 24h protegida da luz a 25°C. Logo depois, foi filtrado em filtro de papel e em filtro de 0.22µm em fluxo laminar. A solução foi distribuída em eppendorfs, contendo 1,5ml do extrato, e foi levada ao speedvac (Eppendorf, modelo Concentrator 5301) por 6h, para que fosse removido o solvente. A seguir pesou-se 20µg/mL e solubilizou-se na solução hidroalcoólica de 70% de etanol/água (V/V), solução estoque. Outra solução similar de volume 1mL e 10 vezes mais concentrada (200µg/mL) foi transferida para um funil de separação de 50mL, adicionou-se 25mL de acetato de Etila (Sigma-Aldrich), e 25mL de água. Após intensa agitação em funil de separação a mistura permaneceu em repouso por 5 minutos e formou-se uma solução com duas fases: fração polar (FPHL) e apolar (FAHL), figura 2 b. A FPHL foi transferida para um tubo cônico de 50 mL, congelada a -20°C e levada ao liofilizador (Labconco, modelo FreeZone 6), figura 02. Após 48h, a FPHL secou e cerca de 6h a FAHL distribuídas em eppendorfs, e também secou no speedvac. Portanto, esse processo permitiu a preparação de três soluções para os ensaios: 1) o extrato hidroalcoólico da folha (20µg/mL); 2) a fração polar em água (20µg/mL) e 3) a fração apolar em acetato de etíla (20µg/mL) (figura 2 b).

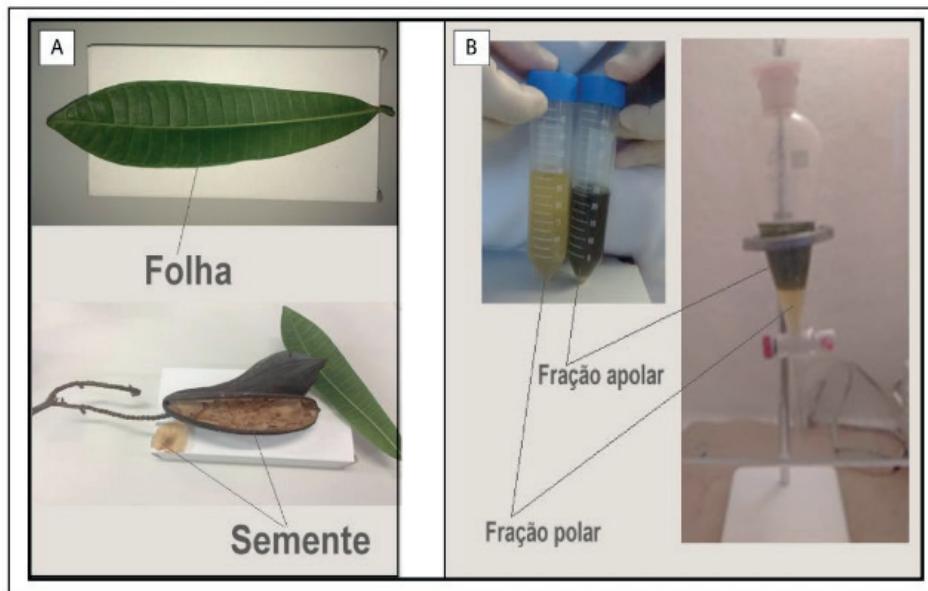


Figura 2. Imagem da semente e das folhas de *Himatanthus lancifolius* ( a ) e Imagem das frações no funil de separação após 05 minutos de repouso da mistura de acetato de etila e água, e imagem das duas frações isoladas dessa mistura: fração polar (FPHL) e fração apolar (FAHL)( b ).

### 3.4 Análise qualitativa dos biocompostos presentes na folha de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson

Realizou-se testes histoquímicos para identificação dos compostos presentes nas folhas, utilizando as seguintes substâncias: Sudam III para Lipídios totais (Sass, 1951); Lugol para Amido (Johansen, 1940); Vanilina clorídrica para Taninos (Mace e Howell, 1974); Floroglucinol acidificado para Lignina (Johansen, 1940); Reagente de Wagner para Alcalóides (Furr & Mahlberg, 1981); Cloreto férreo para Compostos fenólicos (Johansen, 1940); Cafeína + DMACA para Flavonóides (Feucht & Schmid, 1983).

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise histoquímica: A análise qualitativa dos biocompostos presentes na folha da *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson mostraram a presença de substâncias lipídicas somente na cutícula (figura 3a); amido nas células do parênquima clorofílico, principalmente do parênquima paliçádico (figura 3b); lignina nas paredes do esclerênquima e elementos traqueais do xilema (figura 3c e d); alcalóides no conteúdo de algumas células parenquimáticas nas nervuras (figura 3e); compostos fenólicos no conteúdo e paredes de células parenquimáticas do mesófilo (figura 3f); flavonóides no conteúdo de células parenquimáticas no mesófilo e epiderme (figura 3g e h).

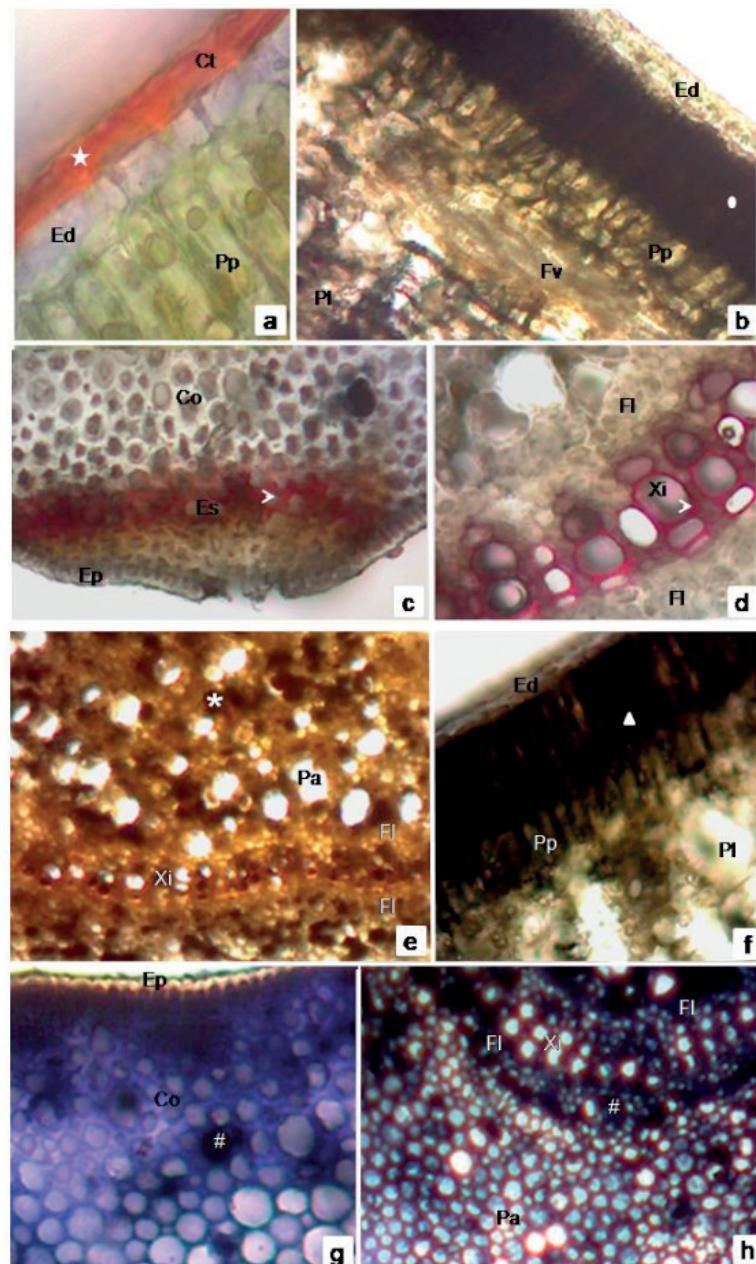
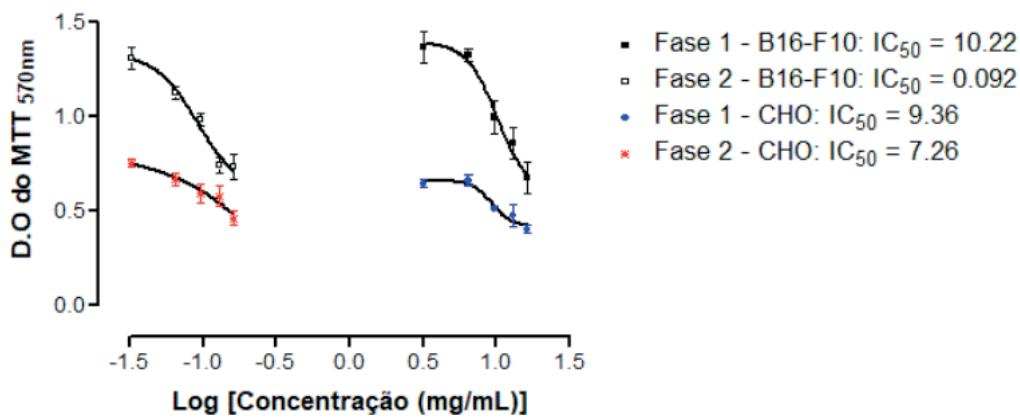


Figura 3. Cortes transversais das folhas de *Himatanthus lancifolius* com resultados de testes histoquímicos. a) Sudam III evidenciando lipídios na cutícula (estrela branca); b) Lugol evidenciando amido no parênquima clorofílico (ponto branco); c e d) floroglucinol acidificado evidenciando lignina na parede das células (ponta de seta branca); e) Reagente de Wagner evidenciando alcaloides na células do parênquima (asterisco branco); f) Cloreto férreo evidenciando compostos fenólicos no parênquima (triângulo branco); g e h) cafeína e DMACA evidenciando flavonídeos nas células parenquimáticas ( # branco). Aumentos: b, f, h –4X e a,c, d, e, g –10X. Legendas: Ep:epiderme, Pa:parênquima, Co: colênquima, Xi: xilema, Fl:floema, Ed: epiderme adaxial, Pp: parênquima paliçadico, Pl:parênquima lacunoso, Es: esclerenquima, Ct: cutícula, Fv: feixe vascular.

Nesse trabalho os primeiros ensaios foram feitos para o extrato hidroalcoólico da folha da *Himatanthus Lancifolius*, (figura 04). Tanto para células de melanoma como para células controle (CHO) foram evidenciadas duas fases. As células (B16-F10 e CHO) apresentaram duas fases (1 e 2), na fase 2 ocorreu uma diferença significativa no índice de seletividade (IS). O extrato hidroalcoólico da folha da *Himatanthus Lancifolius* apresentou citotoxicidade elevada e índice seletividade alta (muito superior

a 3) para células tumorais de melanoma (B16-F10) em relação a células de ovário de hamster Chinês (CHO), (figura 04). A atividade citotóxica e antitumoral relacionada aos compostos bioativos presente na *Himatanthus lancifolius* e seu uso na medicina popular no Brasil também é relatado por Wood et al., (2001).

Corroborando com nossos resultados em estudo de plantas como protótipo de drogas, Rosales et al., 2019 mostraram que a atividade citotóxica de alcalóides indólicos (metabolitos vegetais ativos) da planta da família da *apocynaceae* (*tabernaemontana catharinensis*) apresentaram citotoxicidade seletiva contra células tumorais de melanoma. Nesse estudo as frações enriquecidas identificada por espectrometria de massa de alta resolução são testadas *in vitro* contra linhagens celulares: A375 (melanoma), A549 (adenocarcinômicas) e células Vero não tumorais (células epiteliais de rim de macaco verde africano). Apartir dos alcalóides identificados como ativos foram obtidas seis subfrações. A subfração contendo afinisina mostrou toxicidade seletiva contra células de melanoma (A375), com um  $IC_{50}$  de 11,73  $\mu$ g/mL, e nenhuma citotoxicidade contra células normais (Vero). Esses autores concluem que os alcaloides indólicos da *apocynaceae* (*tabernaemontana catharinensis*) exibem citotoxicidade seletiva em células tumorais de melanoma (A375) e toxicidade em silico, considerando que a subfração contendo afinisina pode ser um indicativo de quimioterápico para células de melanoma (A375).



$$IS_{\text{fase 2}} = IC_{50} (\text{CHO}) / IC_{50} (\text{B16-F10}) = 78,91$$

Figura 4. Curva da atividade das células tumorais de melanoma B16-F10 e não tumorais (controle) de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) tratadas com extratos polar da folha da *Himatanthus Lancifolius*. Esse gráfico representam a densidade óptica observado do MTT, após 4h de incubação, em função os valores do Log da concentração do extrato polar da folha da *Himatanthus Lancifolius* (160 - 0,3  $\mu$ g/mL), para as células expostas por 48h. Essas linhas gráficas que refletem a dispersão dos pontos ( $R^2 = 0,994$ ) permitem o cálculo pelo Programa Gráfico PrismPlot3 para o valor do  $IC_{50}$  e do  $R_{\text{max}}$ .

Nossos estudos mostraram por ensaios de citotoxicidade (MTT), alta toxicidade celular para células de melanoma e CHO-K1 tratadas com EPHL. Para células de CHO-K1 foi obtido um  $IC_{50} = 410,2 \mu\text{g/mL}$  e citotoxicidade máxima numa concentração 400  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto as células B16-F10 tiveram  $IC_{50} = 8,998 \mu\text{g/mL}$  e citotoxicidade

máxima em  $40\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nessa análise observamos que  $IS = 1,11$ . O EPHL não apresentou toxicidade seletiva para células tumorais de melanoma (B16-F10) em relação a células (CHO-K1), (Figura 05 a).

Os ensaios de citotoxicidade (MTT) mostraram três fases para fração EAHL, com pelo menos três biocompostos ativos. A alta toxicidade celular para células de melanoma tratadas EAHL apresentou citotoxicidade máxima em  $350\mu\text{g}/\text{mL}$ , (Figura 05 b).

A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em maior proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO, 1998).

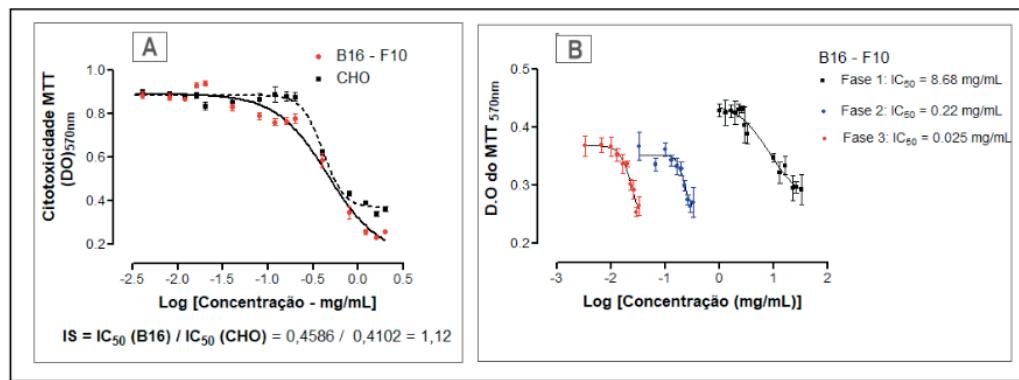


Figura 5. Em (A) Curva da atividade das células tumorais de melanoma B16-F10 e não tumorais (controle) de ovário de hamster chinês (CHO-K1) tratadas com extrato polar da folha da *Himatanthus Lancifolius*. (B) Curva da atividade das células tumorais de melanoma B16-F10 tratadas com fração apolar da folha da *Himatanthus Lancifolius*. Esse gráfico representam a densidade óptica observado do MTT, após 4h de incubação, em função os valores do Log da concentração do extrato polar (650-0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e apolar (350-3,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para as células expostas por 48h. Essas linhas gráficas que refletem a dispersão dos pontos ( $R^2 = 0,998$ ) permitem o cálculo pelo Programa Gráfico PrismPlot3 para o valor do IC<sub>50</sub> e do R<sub>máx</sub>.

Souza et al., (2010), que avaliou a ação da uleína e da fração rica em alcalóides, isolada das cascas de *Himatanthus lancifolius* sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16- F10. Os resultados demonstraram uma atividade antioxidante de  $59,3 \pm 0,8\%$  para a fração alcaloídica. Em ensaio DPPH (redução do radical livre), a fração alcaloídica apresentou IC<sub>50</sub> =  $196,3 \pm 8,9 \mu\text{g}/\text{mL}$  e para a uleína  $6475,0 \pm 25,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Existem mais de 1000 compostos fitoquímicos diferentes descritos com atividade preventiva contra o câncer e muitos estudos estão voltados para a elucidação de mecanismos moleculares (DAVIS et al, 2007), principalmente pelo fato que componentes bioativos presentes nos fitoterápicos podem prevenir a carcinogênese (SURH et al, 2003). Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com plantas indicam que elas são constituídas principalmente de glicosídeos esteroídis, triterpenos, terpenoides, taninos, quinonas, lactonas e flavonóides (SILVA & CECHINEL, 2002).

Atualmente, um dos importantes métodos de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos vem se baseando na busca de protótipos farmacêuticos de produtos de origem natural, provenientes de plantas, com ação citotóxica em células

tumorais e/ou indutores de apoptose.

## 5 | CONCLUSÕES

A análise histoquímica e qualitativa da folha da *Himatanthus lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson indicou a presença de lipídios, lignina, alcalóides, flavonóides e compostos fenólicos. Sendo que o extrato hidroalcoólico da folha *Himatanthus Lancifolius* (EEHL), a fração polar (FPHL) e apolar (FAHL) desse extrato apresentaram alta citotoxicidade contra célula de melanoma B16-F10 na faixa de 0,001 – 650  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , dependente do extrato, da fração e do tempo de contato com as células. O EEHL apresentou duas fases. A fase 2 apresentou diferença significativa ( $p<0.001$ ) e alto índice de seletividade (IS), que foi muito superior a 3 (aproximadamente 80), para células tumorais de melanoma (B16-F10) em relação a células de ovário de hamster Chinês (CHO).

A FPHL apresentou citotoxicidade máxima em 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\text{IC50} = 9,998 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e para CHO em 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\text{IC50} = 8,998 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), mas não induziu toxicidade diferenciada ( $\text{IS} = 1,12$ ). Já com o extrato EAFL solúvel em etanol para os ensaios de citotoxicidade (MTT) mostraram três fases, com pelo menos três biocompostos ativos. A alta toxicidade celular para células de melanoma tratadas com EAFL solúvel em etanol apresentaram citotoxicidade máxima em 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Esses resultados são promissores e necessitam de maiores estudo, pois em tumores, a difícil distinção entre células malignas e normais do corpo dificulta a obtenção de um tratamento mais eficiente.

## 6 | AGRADECIMENTO

Ao CNPq, CAPES, BNB – Fundeci, PAPESB pelo auxílio financeiro e bolsas. Ao Prof. Dr. Ismael dale cotrim guerreiro. Laboratório de Ginecologia Molecular, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP / EPM.

## REFERÊNCIAS

CECHINEL FILHO, V; YUNES ROSENDO, A. **Estratégias para a obtenção de compostos.** Química Nova, vol.21, n.1, pp.99-105. 1998. ISSN 0100-4042.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Gentianales medicinais.** Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP. p. 375-385, 2008.

FEUCHT, W.; SCHMID, P.P.S. **Selektiver histochemischer nachweis von flavanen (catechinen) mit p-dimethylamino-zimtaldehyd in sprossen einiger obstgehölzi.** Gartenbauwissenschaft, v. 48, p. 119–124, 1983. ISSN 0016-478X.

FURR, M.; MAHLBERG, P.G. **Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in Cannabis sativa.** Journal of Natural Products, v. 44, 153-159. 1981. ISSN 0163-3864

GRUNFELD E. et. al. **Better knowledge translation for effective cancer control: A priority for action.** Cancer causes and control, v. 15, 503-510. 2004. ISSN 1573-7225 (Online)

JOHANSEN, D.A. **Publications in the botanical sciences.** Plant microtechnique. New York, Mc Graw Hill. 1940.

KAUR, S. et. al. **The in vitro Citotoxic and Apoptotic Activity of Triphala-an Indian Herbal Drug.** Journal of Ethnopharmacology, v. 97 (1), 15-20. 2005. ISSN 0378-8741.

LEOPOLDO C. BARATTO, L.C. et al. ***Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae: estudo farmacobotânico de uma planta medicinal da Farmacopeia Brasileira.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy, V. 20 (5), 651-658. 2010. ISSN 1981-528X.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. **Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings** Canadian. Journal of Botany, v. 52 n.11 p. 2423-2426. 1974. ISSN 0008-4026.

MARCELI, O.S. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p. Revista Brasileira de Cancerologia, v.64 (1): 119-120, 2018. ISSN 0034-7116.

MIOT, L.D.B. et al. **Fisiopatologia do melasma.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 84, n°6, p.623-635. 2009. ISSN 0365-0596

NARDIN, J.M. et al. ***Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins.** Planta Med, v 74 (10), 1253-8. 2008. ISSN 0032-0943.

ROSALES, P.F. et al. **Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity in silico and molecular modelling studies.** Bioorg Chem, v. 85, 66-74. 2019. ISSN 00452068.

SASS JE. **Botanical microtechnique.** 2 ed. Ames: Iowa: State College Press. 1951.

SEIDL, C. et al. **Uleine Disrupts Key Enzymatic and Non-Enzymatic Biomarkers that Leads to Alzheimer's Disease.** Current Alzheimer Research, v. 14 (3), pp. 317-326. 2017. ISSN 1875-5828

SILVA, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. **Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002. ISSN 0100-4042.

SOUSA, E.L. et al. **Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor.** Braz. J. Pharm. Sci, v. 46, 199–203. 2010. ISSN 2175-9790.

SOUZA, W.M. **Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae - (agoniada).** Curitiba, 176p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. 2007

SOUZA W.M. et al. **Ação da uleine sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10.** Rev Bras Farmacogn., V.17, 191-196. 2007. 1981-528X.

SOUZA W.M. et al. **Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*.** Fitoterapia, V. 75 (7-8), 750-3. 2004. 0367-326X.

SURH, Y. J. et al. **Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.** Natur Rev Cancer, v. 3 (10), 768-80. 2003. INSS 1474-1768.

WOOD C.A. et al. **A bioactive spirolactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*.** ChemPharm Bull, v. 49, 477-147. 2001. ISSN 0102-695X.

# CAPÍTULO 6

## ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE COMPOSTOS FTALIMÍDICOS

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 11/11/2019.

### João Ricardhis Saturnino de Oliveira

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE

<http://lattes.cnpq.br/0295659137782141>

### Vera Cristina Oliveira de Carvalho

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE

<http://lattes.cnpq.br/6778813192947451>

### Vera Lúcia de Menezes Lima

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE

<http://lattes.cnpq.br/8429792710135888>

**RESUMO:** **Introdução:** Ftalimidas são moléculas com grande potencial terapêutico, pois sua estrutura, de maior conteúdo apolar, consegue atravessar membranas celulares e disponibilizar grupamentos ativos em seus sítios de ação com quatro a quinze vezes mais facilidade. Estudos avaliam a possibilidade do efeito analgésico de novas moléculas criadas em estruturas de ftalimida, ajudando a reduzir medicamentos com alto custo e risco de dependência, como alguns analgésicos

opioides. No entanto, poucos levantamentos trazem os reais benefícios e possíveis riscos do uso de medicamentos com este grupamento químico. **Objetivo:** Este estudo objetivou realizar um levantamento bibliográfico das principais ftalimidas investigadas para a atividade analgésica e os seus potenciais riscos e benefícios. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. Os artigos foram processados por dois avaliadores de forma independente e, então, as informações foram cruzadas. **Resultados e Discussões:** A maior parte dos estudos clínicos (realizados em humanos) foi realizada por grupos norte-americanos, enquanto que estudos experimentais (participantes não-humanos) foram mais utilizados por grupos brasileiros. Das moléculas testadas, apenas a Lenalomida não conseguiu efeito analgésico maior que o grupo placebo (16,1%). As demais moléculas, muitas ainda em fase experimental, conseguiram aumentar o limiar de dor por redução da produção de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores, ou a partir da estimulação de receptores no sistema nervoso central, reduzindo a condução dos impulsos neuronais referentes ao estímulo doloroso. No entanto, os estudos clínicos indicaram mais efeitos colaterais do tratamento e estes a nível de administração aguda, como tontura e constipação. Das moléculas criadas, todas as

escolhidas reduziram a dor em mais de 50 %, com ação associada à via opioide.

**Conclusão:** A maior parte dos compostos ftalimídicos sintetizados conseguem combater a dor, por vias periféricas ou centrais. No entanto, efeitos colaterais do uso crônico dessas medicações não está elucidado, bem como estudos clínicos são escassos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ftalimidas; Dor; Analgesia.

## ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF PHTHALIMIDE COMPOUNDS

**ABSTRACT:** **Introduction:** Phthalimides are molecules with great therapeutic potential, because their structure, with higher apolar content, can cross cell membranes and let active groups available at their sites of action four to fifteen times more easily. Studies evaluate the possibility of the analgesic effect of new molecules created in phthalimide structures, helping to reduce costly drugs and the risk of addiction, such as some opioid analgesics. However, few studies bring the real benefits and possible risks of using drugs with this chemical group. **Objective:** This study aimed to conduct a bibliographic review of the main phthalimides investigated for analgesic activity and their potential risks and benefits. **Methodology:** This is an integrative review of literature. The articles were processed by two reviewers independently, and then the information was crossed. **Results and Discussion:** Most clinical studies were performed by North American groups, while experimental studies (non-human participants) were mostly used by Brazilian groups. Of the molecules tested, only Lenalomide had no greater analgesic effect than the placebo group (16.1%). The other molecules, many still in the experimental phase, were able to increase the pain threshold by reducing the production of inflammatory mediators that sensitize nociceptors, or by stimulating receptors in the central nervous system, reducing the conduction of painful stimulating neuronal impulses. However, clinical studies have indicated more side effects of treatment and these at the acute administration level, such as dizziness and constipation. Of the molecules created, all the chosen ones reduced pain by more than 50%, with action associated with the opioid pathway. Conclusion: Most synthesized phthalimide compounds are able to combat pain by peripheral or central routes. However, side effects of chronic use of these medications are not elucidated as well as clinical studies are scarce.

**KEYWORDS:** Phthalimides; Pain; Analgesia.

## 1 | INTRODUÇÃO

Imidas cíclicas é o termo dado à família de compostos químicos cuja estrutura apresenta duas carbonilas ligadas ao mesmo átomo de nitrogênio. As imidas cíclicas são formadas por glutarimidas, naftalimidas, maleimidas, succinimidas e as ftalimidas. Sendo esse último componente um dos mais utilizados na síntese de novas partículas (Horvat et al., 2012). A propriedade hidrofóbica das ftalimidas

é resultante, principalmente, dos seus anéis aromáticos. Estes conferem a esta molécula facilidade de transporte em membranas celulares. (Martines et al, 2000; Pin & Tavares, 2016).

Além disso, a estrutura das ftalimidas possui grande plasticidade no que se diz respeito à adição de novos grupamentos hidrofóbicos, ou não. Deste modo, consegue-se ampliar os efeitos desta molécula e/ou aproveitar de suas propriedades de transporte transmembrana para disponibilizar grupamentos ativos dentro da célula de forma mais eficaz e eficiente. O anel imídico é o ponto de maior manipulação biofarmacológica (Horvat et al., 2012; Pin & Tavares, 2016).

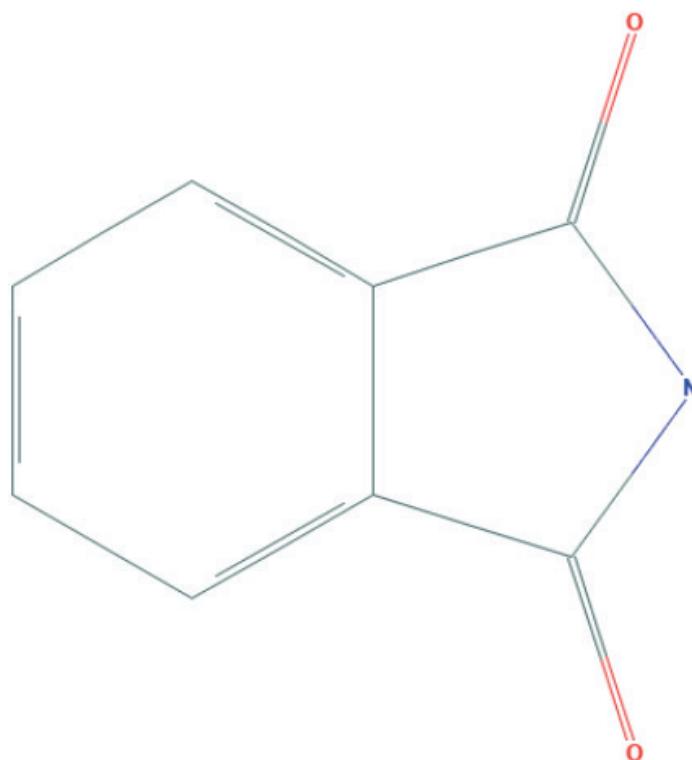


Figura 1. Representação estrutural de uma molécula simples de Ftalimida.

As ftalimidas podem ser obtidas através da condensação do anidrido ftálico com aminas específicas, como a ureia. Esses dois compostos são misturados na proporção molar de um para um (1:1), em meio etéreo, e deixados sob agitação. Quando condensados, formam o ácido ômico, que recebe ácido acético e a reação é deixada por duas horas e posteriormente refluxada, obtendo-se a ftalimida (Buzzi et al, 2003).

Muitas propriedades biológicas das imidas cíclicas já foram reportadas na literatura, dentre as principais estão, hipolipidêmica, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (Gajare; Mahajan 2012; Jean et al, 2009). As propriedades desses compostos estão diretamente ligadas ao tamanho das moléculas e principalmente aos grupos substituintes adicionados ao anel imídico. Esses novos grupamentos podem amplificar a ação biológica, por conseguirem chegar mais rápido no sítio de

ação (Cechinel Filho et al., 2003).

A partir dessas possibilidades terapêuticas, iniciaram-se investigações sobre o potencial analgésico de compostos contendo ftalimidas como base. A dor é um sinal neurológico que indica dano a algum componente do sistema. No ser humano, principalmente, a dor possui fatores subjetivos e objetivos. Em sua objetividade, a dor pode ser gerada por fatores neurológicos (principalmente envolvidos com neurotransmissores ou receptores do sistema nervoso central) e/ou fatores inflamatórios (a partir da sensibilização de neurônios nociceptores mediados por agentes pró-inflamatórios) (Bourne et al., 2014; Wang et al., 2016).

No mecanismo de lesão clássico, a dor neurológica se representa pela estimulação nervosa periférica nos primeiros minutos após a agressão, enquanto que dores de origem inflamatória são geradas minutos após o dano, quando se inicia a chegada de mediadores inflamatórios. Fármacos que visam a atuação analgésica são amplamente prescritos e utilizados de forma autonômica em todo o mundo. No entanto, novos medicamentos com atuação mais eficaz e/ou ampla atuação nos diferentes promotores de dor se fazem necessários para diminuição de custos, sintomatologia e tratamentos mais eficazes (Queiroz et al., 2010).

Atualmente, a classe analgésica representa mais de 10% das vendas de todos os medicamentos no mundo e dor é o sintoma que mais leva à busca por serviços de saúde (Turunen et al., 2005). Isto se dá pela grande busca de medicações que reduzam o estresse físico associado a extensas jornadas de trabalho e o aumento de doenças crônico-degenerativas do aparelho musculoesquelético. No entanto, muitos destes medicamentos podem acarretar em insuficiência hepática e/ou renal, além de causar dependência. O que dificulta mais ainda na cessação de dor e redução do uso de medicações (Daoust et al., 2019).

As ftalimidas já mostram efeitos positivos como analgésicos, porém pouco se sabe sobre quais são os principais grupamentos adicionais que fornecem esta atividade e quais os reais benefícios e riscos da terapia. Deste modo, este estudo objetivou realizar um levantamento bibliográfico das principais ftalimidas investigadas para a atividade analgésica e os seus potenciais.

## 2 | METODOLOGIA

### DESENHO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. As informações foram buscadas nas bases de dados PubMed, SciELO, ScienceDirect, Cochrane Library e Google Scholar. Para a busca, foram utilizadas as palavras chaves e descritores (segundo o MeSH): ftalimidas, imidas cíclicas, analgesia, dor, nocicepção, phtalimides, phthalimides, analgesy, cyclic imides, pain, nociception, acompanhados do operador

booleano AND.

### ESCOLHA DOS ARTIGOS

Foram utilizadas todas as publicações que abordassem investigação do potencial analgésico de compostos ftalimídicos. Não houve restrição de data, nem língua. No entanto, todos os estudos precisavam ter caráter experimental (avaliação em seres vivos não-humanos) ou clínico (avaliação em humanos). Não foram aceitos estudos com análise de potencial analgésico por cruzamento em bases de dados ou softwares.

### PROCESSAMENTO DOS DADOS

Os artigos selecionados foram avaliados individualmente por dois investigadores, separadamente. Então, foi realizada reunião para cruzamento das informações e relato dos achados.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No final da busca, foram encontrados 653 estudos. Dos quais, a maioria não se encaixou por tratar a dor de forma indireta ao tratar processos oncológicos, principalmente, mieloma múltiplo. Após retirada dos exemplares duplicados, 15 estudos foram selecionados. Destes, dois eram dissertações de mestrado, que se mantiveram neste estudo devido a relevância para discussão. A maior parte dos estudos foi realizada por grupos brasileiros ou norte-americanos. Outros estudos, pontuais, vieram de países dos continentes europeu e asiático.

O primeiro estudo reportando atividade analgésica de compostos ftalimídicos data de 1960 (Harris; Allgood, 1960). A talidomida foi utilizada no intuito de potencializar o efeito da analgesia peridural (APC). Sabe-se que alguns casos de dor, como as originárias de compressão nervosa em hérnias de disco lombar, podem gerar episódios intensos e duradouros de dor, o que leva à necessidade de maior aporte analgésico, como a APC. No entanto, pacientes podem perder a sensibilidade ou necessitar de doses muito altas, o que leva a efeitos colaterais diversos. Neste estudo, 10 pacientes receberam APC associada com doses de talidomida (em 25 mg de talidomida por dia). Deste modo, foi visto que todos os pacientes tiveram o limiar de dor aumentado sem a necessidade de aumento do APC. Apesar de pouco elaborado metodologicamente, este estudo deu portas a mais estudos voltados para o uso de ftalimidas sobre os mecanismos da dor (Harris; Allgood, 1960).

Um dos mais recentes trabalhos com talidomida evidenciou seu uso em indivíduos com espondilite anquilosante (Zhu et al., 2010). Ao todo, 232 indivíduos com diagnóstico de espondilite anquilosante receberam 150 mg por dia. Destes,

63,8 % reportaram redução da dor em mais de 50 % e 32,8 % alegaram cessação do quadro álgico. Apesar dos efeitos benéficos, este estudo relatou que 13,8 % dos participantes iniciais desistiram do estudo devido efeitos colaterais da talidomida. Dos quais, tontura, constipação e boca seca foram os mais reportados e cessaram com o término da medicação (Zhu et al., 2010).

Lenalomida, outra ftalimida bastante conhecida comercialmente, foi testada para tratamento de síndrome complexa regional dolorosa (Manning et al., 2014). No entanto, na fase II dos ensaios clínicos, não houve diferença entre o grupo lenalomida e o grupo placebo na redução de dor. Participantes de ambos os grupos reportaram a mesma frequência de analgesia, 16,1 %. Apesar disto, os autores levantam a preocupação sobre os mecanismos de ativação das vias nociceptivas destes indivíduos, que podem interferir por mais questões ainda não descobertas do que os mecanismos já sabidos sobre a condução do estímulo de dor (Manning et al., 2014).

Campos (2001) reportou a síntese de 13 compostos ftalimídicos. Destes, apenas 3 obtiveram redução da dor em mais de 50 %, no entanto, todos os três reduziram a dor em mais de 80 %; o dobro de seus controles positivos, dipirona, aspirina e paracetamol. Na investigação da mecanística, a autora confirmou ação neurogênica na inibição da dor. Mais precisamente, nas mesmas vias que a morfina, opioide (Campos, 2001).

Isto também foi encontrado na dissertação de Costa (2006). A autora sintetizou 10 compostos N-(adição)-tetrahidroftalimida e outros 3 derivados. Dos compostos, quatro obtiveram resultados melhores que o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, seis obtiveram resultados similares aos controles positivos, dois não obtiveram resultados similares e apenas um não teve ação analgésica no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (Costa, 2006). Por ter tido melhor resultado, o composto N-benzil-1-morfolino-tetrahidroftalimida foi utilizado para os testes da formalina e da placa quente. Na concentração de 10 mg / kg de peso, os animais tratados com este composto tiveram potencial analgésico, por vias centrais, comprovado. Sendo seus resultados similares ao do controle positivo, morfina (Costa, 2006).

Na tentativa de criar um antagonista do receptor de bradicinina B1, Éles e colaboradores (2012) sintetizaram 20 compostos quinolinil- e fenantridinil-acetamidas. Destes, o composto 20, o mais complexo e mais rico em anéis aromáticos apresentou maior relação antagônica aos receptores. Seus resultados foram tão bons quando o diclofenaco de sódio, porém o composto 20 foi administrado em doses dez vezes menores que seu controle positivo (Éles et al., 2012).

Baraldi e colaboradores também realizou síntese de mais de 30 compostos a partir da 7-substituto-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diona, porém para ação antagonista aos receptores transientes de potencial anquirina 1. Destes, os compostos 3H e 5E

apresentaram os melhores resultados de antagonismo. No entanto, 5E foi o único que também manteve antagonismo equipotente para a isoforma do receptor em camundongos. Pouco foi discutido sobre o motivo pelo qual estas moléculas foram as mais potentes (Baraldi et al., 2012).

Outro estudo avaliou análogos da glutarimida a partir de 2-ftalimidetanol e nitrato 2-ftalimidetil na ação analgésica e anti-inflamatória (Godin et al., 2014). Ambas moléculas conseguiram reduzir a migração de neutrófilos. Porém o composto nitrato foi o único que também reduziu as concentrações de fator de necrose tumoral alfa e ligante de quimoquina 1. Apesar disto, ambos conseguiram reduzir o edema de pata induzido por carragenina e a dor abdominal induzida por ácido acético. O composto nitrato ainda foi associado a altos níveis sanguíneos de nitrato e óxido nítrico, já apontando um grande efeito colateral de seu uso (Godin et al., 2014).

Após um ano, o mesmo grupo resolveu investigar possíveis mecanismos da ação analgésica, uma vez que já haviam sinalizado as vias inflamatórias (Godin et al., 2015). Por meio do teste da formalina, os autores comprovaram ação agonista de ambas as moléculas na via opioide, gerando redução da dor por via central (Godin et al., 2015).

Recentemente, a talidomida foi novamente colocada em teste, dessa vez, na redução da intolerância à morfina em modelo animal (Hassanzadeh et al., 2016). Após análise de 11 dias em tratamento, os animais que apenas receberam morfina iniciaram a apresentar tolerância à mesma, reduzindo o potencial analgésico. Em contrapartida, os animais que também receberam talidomida mantiveram os efeitos analgésicos da morfina, pois os mecanismos de resistência foram relacionados ao aumento de processo inflamatório (gerado, principalmente, por altas concentrações de fator de necrose tumoral), que podem ser remediados com o uso da talidomida (Hassanzadeh et al., 2016).

Ademais, o grupo de Roecker (2017) reportou a síntese de mais de 30 N-ligantes arilsulfonamida com eficácia analgésica em modelo animal. No entanto, apenas os compostos 5 e 19 conseguiram apresentar 100 % de ação analgésica. Não foram avaliadas as vias de ação para estes compostos, porém os autores acreditam que vias opioides sejam ativadas por estes compostos, assim como a maioria das ftalimidas consegue (Roecker et al., 2017).

Outro grupo brasileiro testou os mecanismos de ação da N-(4metil-fenil)-4-metilftalimida em diferentes modelos de dor em camundongos e percebeu a ativação de prostaglandinas e interleucinas na redução do potencial doloroso (Silva et al., 2017). O possível mecanismo de ação das vias foi sinalizado como um bloqueio de canais da foskolina, estimulação da interleucina 1-beta e da prostaglandina E2 no aumento da inibição desses canais, reduzindo a hipersensibilidade dos modelos de dor (Silva et al., 2017).

Li e colaboradores (2018) sintetizaram derivados da tansinona 2A e encontraram 12 compostos com computacional possibilidade de reduzir a atividade da monoacilglicerol lipase, uma das responsáveis pela formação do ácido araquidônico e posterior cascata inflamatória. Os resultados foram preliminares, pois não houve aplicabilidade experimental, apenas cruzamento de dados por análise computacional (Li et al., 2018).

Além desses, recentemente, Batista e grupo (2019) reportou a ação analgésica de análogos de N-3-hidroxipropulftalimida (HPP) e N-carboximetil-3-nitroftalimida (CNP). Destes, CNP apresentou efeito anti-inflamatório, que conseguiu reduzir dor inflamatória e HPP conseguiu reduzir a dor por mecanismos inflamatórios e por via central, opioide (Batista et al., 2019).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ftalimidas são testadas para ação analgésica há mais de meio século. Apesar disto, pouco ainda se sabe sobre suas aplicabilidades, pois a maioria dos testes são pré-clínicos e as drogas utilizadas em indivíduos não apresentaram efeitos tão satisfatórios para dor, apesar de serem potentes medicamentos para processos oncológicos. Das ftalimidas com efeitos analgésicos por via central, a via opioide é a via de ação por unanimidade, enquanto que os mecanismos anti-inflamatórios são variados, podendo ser desde a ação de enzimas chave para a formação do ácido araquidônico, como na redução de citocinas.

## REFERÊNCIAS

- Baraldi, P.G. et al. 7-substituted-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine-2,4-dione derivatives as antagonists of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel: a promising approach for treating pain and inflammation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 1690-1698, 2012.
- Batista, C.R.A. et al. The phthalimide analogues N-3-hydroxypropylphthalimide and N-carboxymethyl-3-nitrophthalimide exhibit activity in experimental models of inflammatory and neuropathic pain. **Pharmacological Reports**. v. 71, p. 1177-1183, 2019.
- Bourne, S.; Machado, A. G.; Nagel, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurg Clin N Am**. v. 25, p. 629-638, 2014.
- Buzzi, F. C.; Corrêa, R.; Chechinel, V. F. In: Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. **Itajaí, Univali**, cap. 2, p.59-105, 2003.
- Campos, F. Síntese e atividade biológica de imidas derivadas da 4-aminoantipirina. Dissertação de mestrado. UFSC, Florianópolis, p.165. 2001.
- Cechinel, V. F.; Corrêa, R.; Campos, F.; Yunes, R. A; Nunes, R. J. Chemical aspects and therapeutic potential of cyclic imides: A review. **Química Nova**. p.230-241, 2003.
- Costa, B.B.C. Síntese de novos derivados de tetrahidroftalimida de interesse biológico e estudos

preliminares de correlação estrutura-atividade. UVIVALI, Itajaí, p.96, 2006

Daoust, R. et al. Side effects from opioids used for acute pain after emergency department discharge. **The American Journal of Emergency Medicine**. June, p. 1-7, 2019.

Éles, J. et al. Quinolinyl- and phenantridinyl-acetamides as bradykinin B1 receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 3095-3099, 2012.

Gajare, S. P.; Mahajan, S. S. Qsar studies of phthalimide derivatives for their potent anxiolytic activity. **Int J Cur Res Rev**. p.151, 2012.

Godin, A.M. et al. Activities of 2-phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate, phthalimide analogs devoid of the glutarimide moiety, in experimental models of inflammatory pain and edema. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.122, p. 291-298, 2014.

Godin, A.M. et al. Activities of 2-phthalimidethyl nitrate and 2-phthalimidethanol in the models of nociceptive response and edema induced by formaldehyde in mice and preliminary investigation of the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**. v. 756, p. 59-66, 2015.

Harris, S.C; Allgood, J.P. Analgesia enhancing effect of thalidomide. **Proc Soc Exp Bio Med**. v. 103, p. 580, 1960.

Hassanzadeh, K.; Khodadadi, B.; Moloudi, M.R.; Amini, H.; Rahmani, M.R.; Izadpanah, E. A new pharmacological role for thalidomide: attenuation of morphine-induced tolerance in rats. **Acta Anesthesiologica Taiwanica**. v. 54, p. 65-69, 2016.

Horvat, M.; Uzelac, L.; Marjanovic, M.; Cindro, N.; Frankovic, O. Evaluation of antiproliferative effect of N-(alkyladamantyl)phthalimides in vitro. **Chemical Biology & Drug Desing**. p.497-506, 2012.

Jean, S. L.; Paulo, Y. R.; Chung, C. M.; Celio, T. H.; Fernando, P. R.; Clarice, L. Q. Synthesis and in vitro anti mycobacterium tuberculosis activity of a series of phthalimide derivatives. **Bioorg Med Chem**. p.3795-3799, 2012.

Li, Q.N. et al. Sunthesis and biological evaluation of novel tanshinone IIA derivatives for treating pain. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v.16, n. 2, p. 113-124. 2018.

Manning, D. C.; Gimbel, J.; Wertx, R.; Rauck, R.; Cooper, A.; Zeldis, J. B.; Levinsky, D. M. A phase II randomized, double-blind, placebo-controlled safety and efficacy study of lenalidomide in lumbar radicular pain with a long-term open-label extension phase. **Pain Medicine**. v. 0, p. 1-11, 2016.

Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Júnior, M. J.O efeito do Ultra-som em Reações Químicas. **Química Nova**. p.251, 2000.

Pin, B. L.; Tavares, L. A. Estudo comparativo dos métodos e das condições para a obtenção de ftalimidas. **Brazilian Journal of Production Engineering**. v.2, n.2. 2016.

Queiroz, A. C.; Lira, D. P.; Dias, T. L. M. F.; Souza, E. T.; Matta, C. B. B.; Aquino, A. B.; Silva, L. H. A. C.; Silva, D. J. C.; Mella, E. A. C.; Agra, M. F.; Barbosa-Filho, J. M.; Araújo Júnior, J. X.; Santos B. V. O.; Moreira, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of Piptadenia stipulacea Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377-383, 2010.

Roecker, A. J. et al. Discovery of selective, orally bioavailable, N-linked arysulfonamide NAv1.7 inhibitors with pain efficacy in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p. 2087-2093, 2017.

Silva, G.F. et al. Anti-hypersensitivity effects of tge phthalimide derivative N-(4methyl-phenyl)-4-methylphthalimide in different pain models in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 96, p. 503-

Turunen, J.H.O.; Mantyselka, P.T.; Kumpusalo, E.A.; Ahonen, R.S. Frequent analgesic use at population level: prevalence and patterns of use. **Pain**. v. 115, n. 3, p. 374-381, 2005.

Wang, F.; Bélanger, E.; Paquet, M.; Côté, D. C.; Koninck, Y. Probing pain pathways with light. **Neuroscience**. v. 338, p248-271, 2016.

Zhu, J.; Huang, F.; Zhang, J.L. The efficacy and safety of long-term thalidomide in the treatment of ankylosing spondylitis. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. v. 49, n.8, p. 667-670, 2010.

## AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS NO DIAGNÓSTICO DE PARASITOLOGIA

Data de aceite: 12/12/2019

### **Elizandra Landolpho Costa Pedrosa**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Ana Luiza do Rosário Palma**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Simone Aparecida Biaffi de Lapena**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Ana Gabriela Rodrigues**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Andrezza Vaz Miao**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Angelica Kimiko Kawasaka**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Bruna Patrícia Menezes da Silva**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

### **Michele de Oliveira Maciel de Holanda**

Universidade Paulista, Instituto de Ciências da  
Saúde

São José dos Campos – São Paulo

**RESUMO:** O exame parasitológico de fezes (EPF) tem como finalidade o diagnóstico de parasitos intestinais causados por helmintos e protozoários, por meio das diferentes formas parasitárias que são eliminadas através das fezes. Para que se tenha um diagnóstico completo e seguro convém realizar uma coleta adequada, preservar a amostra e evitar a contaminação por fragmentos alimentícios, pólen, células vegetais, o que pode comprometer a análise, muitas vezes se assemelhando a algum tipo de parasito. Caso ocorra uma das situações inadequadas, será de pequeno valor, mesmo com uma boa técnica laboratorial, terá seu resultado comprometido, e assim comprometendo a confirmação do diagnóstico e o tratamento para o paciente. Existe uma grande quantidade de técnicas coprológicas presentes na literatura, grande parte das técnicas são modificadas com o tempo, para melhorar a identificação dos parasitas e por apresentarem diferentes sensibilidades na detecção de ovos, larvas e cistos. Sendo as técnicas qualitativas, as mais utilizadas, pois observa-se melhor a presença de formas parasitárias. Normalmente, o número de formas parasitárias é pequeno,

sendo necessário recorrer a processos de enriquecimento dessas técnicas e as técnicas quantitativas onde podemos avaliar a quantidade de parasitos para um melhor diagnóstico, fornecendo informações para melhor manejo do paciente e maior certeza no tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** exame parasitológico de fezes; parasitologia; diagnóstico.

## EVALUATION OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE TECHNIQUES IN THE DIAGNOSIS OF PARASITOLOGY

**ABSTRACT:** The parasitological stools examination purpose the diagnosis of intestinal parasites caused by helminths and protozoa, by means of different parasitic forms that are eliminated through feces. In order to have a complete and secure diagnosis, it is necessary a proper collection, preserving and avoiding the contamination by food debris, pollen and plant cells, that can compromise the analysis, on account of resemble with a parasite. In the event of an problem with the collection, it will be little value, even with a good laboratory technique, your result will be compromised, and thus compromising the confirmation of the diagnosis and treatment for the patient. There is a large amount of coproscopic techniques in the literature, a large part of these techniques are modified over time to improve the identification of parasites and by the different sensitivities in the detection of eggs, larvae and cysts. Being the qualitative techniques, the most used, because it is better observed the presence of parasitic forms. Normally, the number of parasitic forms is small, it is necessary apply enrichment technics and the quantitative techniques, where we can assess the quantity of parasites for a better diagnosis, providing information to better patient management and greater certainty in the treatment.

**KEYWORDS:** parasitological stools examination; parasitology; diagnosis.

## 1 | INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil e em países em desenvolvimento, constam um alto índice e frequente de parasitoses intestinais. Doenças parasitárias são mais frequentes na população carente, um grande problema de saúde pública, tendo como o maior alvo as crianças com baixo nível socioeconômico (MARINHO et al. 2002).

A maior parte da contaminação pelas parasitoses intestinais, são pelas vias oro-fecal, pela ingestão de ovos e cistos de protozoários, presentes em alimentos, água e ou objetos contaminados por fezes (MARINHO et al. 2002).

Estudos indicam a alta prevalência de brasileiros acometidos por algum tipo de parasitose, consideramos uma tarefa difícil o diagnóstico laboratorial, pois há uma resistência da população em coletar material para esse tipo de exame (ANDRADE et al., 2011).

Os sintomas mais comuns são: diarreia, perda de peso, hemorragia do trato

gastrointestinal, anemia, dores abdominais, ansiedade, nervosismo e inquietação e até mesmo o óbito (ABRAHAM et al., 2007).

O diagnóstico clínico realizado, levará a análise laboratorial específica necessária para cada tipo de parasitose que está sendo investigada, auxiliando na diferenciação do agente etiológico e sua morfologia.

Para um diagnóstico satisfatório, segue alguns passos a seguir:

1. Coleta de fezes: A detecção de parasitas intestinais, tem relação direta com a qualidade da amostra, que deve ser coletada em recipiente limpo e seco. Com uma quantidade de 20 a 30g para as análises. As fezes devem ser colocadas em refrigeração, se a análise não for realizada no dia e não deve ser congelada e nem incubada, a não ser que seja para fins de estudos na biologia molecular. Medicamentos como antimicrobianos e contrastes que contenham bário e bismuto podem interferir na análise. O tempo recomendado para análise é de 30 minutos para fezes líquidas, uma hora para as pastosas e amostras sólidas dentro de 24 horas. Para preservação, é necessário o uso de soluções, como exemplo, a solução de formaldeído.
2. Métodos de análise: O melhor método de análise a ser escolhido, deve seguir 2 pontos importantes: 1) o grau de confiança deve ser conhecido e 2) a escolha deve ser feita por pessoal do laboratório que tem conhecimento da exatidão e precisão do método.
3. Exames macroscópicos: Deve-se atentar para a consistência, odor, cor, presença de muco e presença de parasitos adultos.
4. Exames microscópicos: Os esfregaços a fresco pelos métodos diretos são os métodos mais fáceis, usados rotineiramente em laboratórios. Pode ser qualitativo e/ou quantitativo. Para obtenção de melhores resultados seria necessário o uso de técnicas de concentração, ou seja, mecânicos ou biológicos. Nos processos mecânicos são concentrados por centrifugação.

## 2 | TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO

As técnicas de concentração dividem-se em flutuação e sedimentação. E cada uma subdividem-se em flutuação simples e centrifugo-flutuação, sedimentação simples e centrifugo-sedimentação. Dentre as técnicas de concentração, citaremos três técnicas.

### 2.1 Técnica de flutuação

#### *2.1.1 Técnica de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio: método de willis*

A técnica de Willis é fundamentada na capacidade que alguns ovos de helmintos

flutuarem na superfície de uma solução de alta densidade e de aderência ao vidro. É um procedimento simples e eficiente, indicado para pesquisa de ovos com baixa densidade, como os ovos de ancilostomídeos e de *Trichostrongylus orientalis*.

Não recomenda-se para ovos pesados de trematódeos, ovos de *E. vermiculares* e ovos inférteis de *A. lumbricoides*, pois os cistos se encolhem, ficando irreconhecíveis.

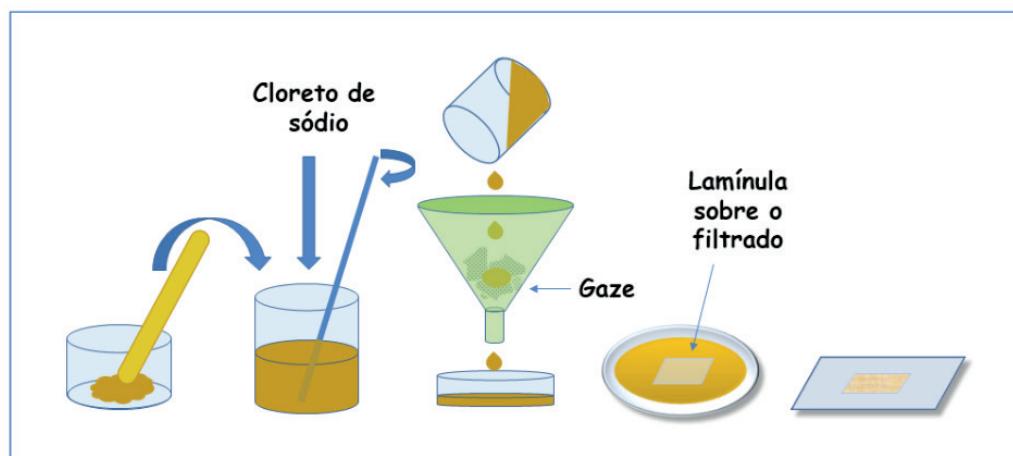
Observações importantes dessa técnica: se a homogeneização das fezes for incompleta, haverá uma imperfeita separação dos ovos e dos detritos fecais e/ou o período de flutuação dos ovos for curto (menos de 30min.) ou longo (mais de 60min.), os ovos que flutuam na superfície podem descer para o fundo da cuba.

Em alguns experimentos realizados com esta técnica, a técnica de Willis, foi a que apresentou a menor positividade.

Amostra: Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagente: Cloreto de Sódio (NaCl).

Preparação da Solução: Solução Saturada de Cloreto de Sódio, densidade 1,20 g/ml.



Fonte: do próprio autor

1. Usar luvas durante todo o procedimento;
2. Colocar de 1 a 2 g de fezes frescas, em uma cuba de 3 cm de diâmetro com capacidade aproximada de 20 ml. Completar com  $\frac{1}{4}$  da capacidade do recipiente com a solução saturada de cloreto de sódio;
3. Suspender as fezes na solução saturada salina até homogeneizar completamente;
4. Completar o volume. Colocar uma lamínula (22 x 22 mm) ou uma lâmina sobre a borda da cuba;
5. A lamínula deve ficar em contato com o menisco durante 30 a 45 minutos: não deverá haver formação de bolhas de ar entre a lamínula e a superfície do líquido. A gota que contém os ovos se adere a face inferior da lamínula;

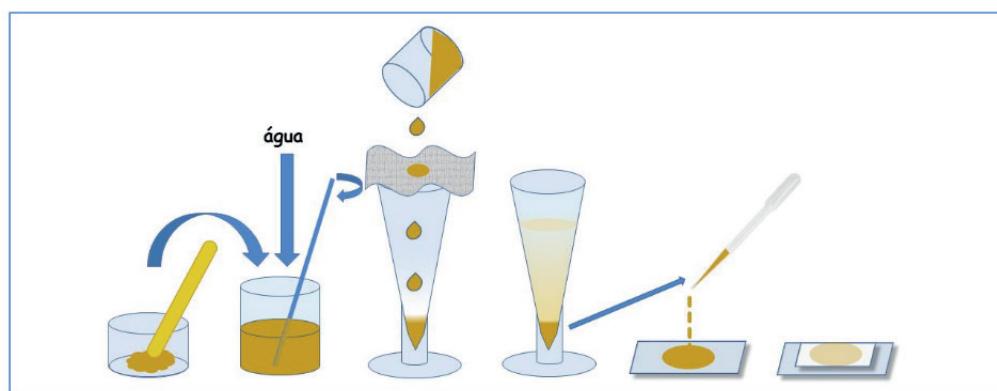
6. Remover a lamínula e inverter rapidamente a posição sobre uma lâmina. Examinar o microscópio com objetiva de pequeno aumento.

## 2.2 Técnicas de sedimentação

### 2.2.1 Técnica de sedimentação espontânea: método de Hofman, Pons e Janer - HPJ (1934)

O método de Hofman, Pons e Janer - HPJ (1934) sedimentação espontânea é a técnica-padrão mais utilizada em laboratórios. Considerado padrão ouro para diagnóstico, apresenta fácil manuseio, baixo custo e boa sensibilidade, detectando cistos, larvas e ovos.

No método de HPJ (1934) são realizados procedimentos bem simples, como a homogeneização das fezes com água, a filtração, repouso e microscopia em lâmina com lugol.



Fonte: do próprio autor

### 2.2.2 Técnica de centrifugo-sedimentação: método de Ritchie

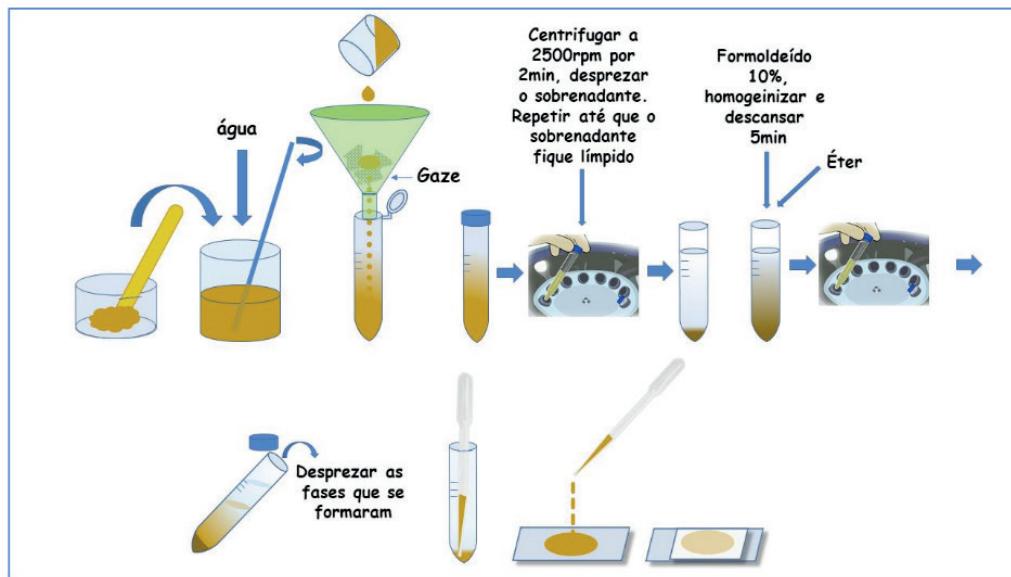
A técnica de Ritchie, feita através da centrífugo-sedimentação, acaba superando a técnica de Faust, feita através da centrífugo-flutuação, na detecção de cistos de protozoários e ovos de helmintos como *Schistosoma mansoni* por serem mais pesados, porém a técnica de Ritchie possui limitações como a baixa sensibilidade para se detectar a presença de ovos de *Schistosoma mansoni* e *Ascaris lumbricoides* nas fezes, em comparação com o método de sedimentação espontânea, além de ser mais trabalhosa e possuir mais riscos devidos aos reagentes químicos utilizados.

O método de Ritchie também pode ser utilizado para análise quantitativa e qualitativa de helmintos e protozoários juntamente com a coloração pela técnica de Kinyoun.

Por ser um método de sedimentação possui a desvantagem de ocorrer presença de detritos fecais no sedimento analisado interferindo na identificação dos parasitas.

A técnica de Ritchie é realizada conservando as fezes em uma solução de

MIF (Mertiolado-lodo-Formaldeído), depois é realizada sua filtração e permanência em repouso durante 20 minutos, após esse processo é adicionado o éter e feito sua agitação e centrifugação, desprezando o sobrenadante e utilizando o sedimento para ser analisado em uma lâmina com lugol.



Fonte: do próprio autor

### 3 | TÉCNICAS ESPECIAIS

#### 3.1 Técnica quantitativa: método de KATO-KATZ

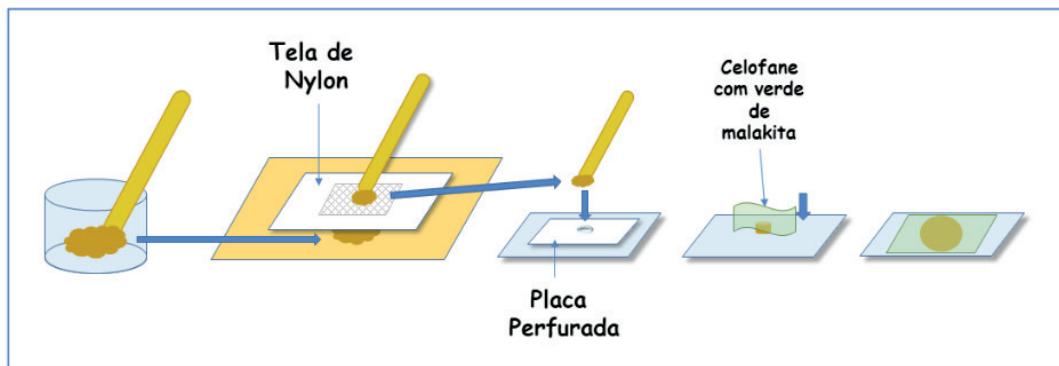
Utilizado na detecção ovos de *Schistosoma mansoni*, *Trichuris trichiura* e *Ascaris lumbricoides*. O método de Kato-Katz é um dos mais conhecidos, sendo de fácil execução e baixo custo é uma técnica quali-quantitativa e é dentre outras considerada assertiva.

Um inconveniente dessa técnica é a dificuldade de identificação em infecções leves, devido a quantidade reduzida de ovos presentes nas amostras.

Ao invés da técnica de Kato-Katz em diversos casos pela comparação entre seus resultados, a técnica de Mini-FLOTAC é recomendada para laboratórios de baixos recursos por não requerer uso de centrífuga ou outros equipamentos, possuindo uma alta precisão na contagem de ovos revelou-se uma possibilidade de aplicação.

Permite identificação e a quantificação por grama de fezes das infestações por alguns helmintos. Cistos de protozoários podem não ser identificados por este método. A sua execução pode ser inviável em fezes diarréicas.

Materiais utilizados: Lâminas/lamínula de celofane, folha absorvente, placa perfurada, tela bastão, placa de Petri, solução diafanizadora (azul de metileno ou verde malaquita)



Fonte: do próprio autor

1. Preparar a solução diafanizadora (verde de malakita);
2. Cortar papel celofane em tamanho de lamínula e mergulhar na solução diafanizadora por 24 horas;
3. Colocar uma amostra de fezes sobre o papel absorvente;
4. Comprimir as fezes na tela para passagem de ovos de helmintos e detritos menores que os ovos;
5. Transferir as fezes peneiradas para a placa perfurada;
6. Após encher, retirar a placa sobre a lâmina;
7. Com o auxílio de uma pinça, pegar o papel celofane e cobrir o bolo de fezes, inverter a lâmina em papel e pressionar;
8. Aguardar duas horas e examinar ao microscópio todos os ovos presentes na preparação.

#### 4 | CONCLUSÃO

O conhecimento de técnicas diagnósticas em exames de fezes (EPF) aplicadas nas formas parasitárias corretas ajuda na escolha do melhor método, já que é um dos maiores desafios para obter o diagnóstico correto. Uma coleta mal feita, um armazenamento incorreto e uma técnica sem conhecimento da forma parasitária em questão, pode impossibilitar o diagnóstico.

E por não existir um método capaz de diagnosticar ao mesmo tempo todas as formas parasitárias, é ideal que exista uma combinação entre técnicas de flutuação e sedimentação. O que se faz de rotina é o emprego de um método geral como o de Lutz ou de Hoffman, Pons e Janer, um específico para cistos de protozoários e um para a pesquisa de larvas e helmintos, além de utilizar uma técnica para contagem de formas parasitárias.

## REFERÊNCIAS

- Alves, LC; Borges, CCA; Silva, S; Couto, SER e Menezes, RC. **Endoparasitos em cobaias (Cavia porcellus) (Mammalia, Rodentia, Caviidae) provenientes de biotérios de criação e experimentação do município do Rio de Janeiro, Brasil.** Cienc. Rural vol.37 no.5 Santa Maria Sept./Oct. 2007.
- Belo, VS; Oliveira, RB; Fernandes, PC; Nascimento, BWL; Fernandes, FV; Castro, CLF; Santos, WB e Silva, ES. **Fatores associados à ocorrência de parasitos intestinais em uma população de crianças e adolescentes.** Rev Paul Pediatr 2012;30(2):195-201.
- Carvalho, AF; Barnabe, AS; Federsoni, IP; Ferraz, RRN; De Marco, RM e Garcia, IP. **Eficácia dos métodos de diagnóstico parasitológico em animais silvestres mantidos em cativeiro.** Arq. Inst. Biol. vol.84 São Paulo 2017 Epub 01-Feb-2018.
- Chaves, A; Alcantara, OS; Carvalho, OS e Santos, JS. **Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado.** Rev. Saúde Pública vol.13 no.4 São Paulo Dec. 1979.
- Coulibaly, JT; Ouattara, M; Becker, SL; Lo, NC; Keiser, J; N'Goran, EK; Ianniello, D; Rinaldi, L; Cringoli, G. and Utzinger, J. **Comparison of sensitivity and faecal egg counts of Mini-FLOTAC using fixed stool samples and Kato-Katz technique for the diagnosis of Schistosoma mansoni and soil-transmitted helminths.** <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.024>
- De Carli, GA. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001
- Gonçalves, GS; Rocha, RDR; Vieira, BM; Garofalo, GC; Costa, CMS; Belém, MEP; Rocha, RDR e Júnior, JFR. **Estudo comparativo de técnicas parasitológicas de sedimentação espontânea: kit comercial coproplus®10 e método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ.** Revista Iniciação Científica - 2015/2016 | 124 -129 INCNP.
- Guizelini, E; Castilho, VLP; Moreira, AAB; Campos, R; Neto, VA; Sant'Ana, EJ; Pinto, PLS e Takiguti, CK. **Pesquisa de ovos “pesados” de helmintos nas fezes: estudo comparativo entre os métodos da sedimentação espontânea em água e de Ritchie.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 20(1): 23-24, Jan-Mar, 1987
- Haidar, AO; Silva, KP; Agyemang-Badu, Panyin; Ribeiro Neto, LM. **A importância do farmacêutico na área de análises clínicas.** IV Simpósio de ciências farmacêuticas. OUT/2015.
- Mati, VLT; Pinto, HA e Melo, AL. **Avaliação de métodos de Kato-Katz e sedimentação espontânea para o diagnóstico de platinossomíase em primatas neotropicais.** Rev. Bras. Parasitol Veterinario. vol.24 no.1 Jaboticabal Jan./Mar. 2015.
- Neves, David Pereira. **Parasitologia Dinâmica.** Editora Atheneu, 3<sup>a</sup> edição – São Paulo, 2009.

RABELLO, A., et al. **Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni.** In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 895-925. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books.

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DA *Luehea divaricata*

Data de aceite: 12/12/2019

**Jadiel de Abreu Pimenta Lins**  
**Antonio Carlos Romão Borges**  
**Aruanã Joaquim M. Costa R. Pinheiro**  
**Lídio Gonçalves Lima Neto**  
**Marilene Oliveira da Rocha Borges**

**RESUMO:** A *Luehea divaricata* popularmente conhecida como açoita cavalo é utilizada na medicina popular, entretanto os estudos que avaliam a atividade farmacológica desta espécie vegetal são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-inflamatória de extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata* (EHLd). O efeito anti-oxidante de EHLd foi avaliado pelo método de DPPH e a citotoxicidade de EHLd em células Raw 264.7 foi avaliada pelo método MTT (tetrazólio de metiltiazol), assim como, e o seu efeito anti-inflamatório foi avaliado pela dosagem de NO e expressão gênica de IL-1 $\beta$  e IL-6 pelos métodos de griess e PCR em tempo real (RT-qPCR), respectivamente. Além disso, o efeito anti-inflamatório de EHLd também foi avaliado em camundongos com dano pulmonar agudo (DPA). Foram analisadas a contagem total e diferencial de leucócitos tanto do lavado quanto do sangue, a expressão gênica de IL-1 $\beta$  e IL-6 pela RT-qPCR do pulmão e foi realizada

a análise histológica dos pulmões, rins e fígado. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o EHLd apresentou como picos majoritário as substâncias, Rhoifolin, Isorhoifolin, Naringin, Kaempferol – 3 -0 caffeoyl glucoside 7 – 0 Glucoside, e Nuzhenide. O EHLd na concentração de 250 $\mu$ g/mL, apresentou efeito anti-oxidante ao capturar 55% de radicais livres. O EHLd apresentou baixa citotoxicidade em todas concentrações testadas de 50 $\mu$ g/mL a 250  $\mu$ g/mL ( $p<0,05$ ). Em relação ao estudo *in vivo*, o pré-tratamento com EHLd reduziu a migração celular, principalmente de neutrófilos, para os pulmões dos camundongos com DPA, e também reduziu a expressão dos genes IL-1 $\beta$  e IL-6 dos pulmões, assim como, reduziu o edema e o infiltrado leucocitário nos pulmões provocado pelo LPS. Diante deste contexto, o extrato da *Luehea divaricata* poderá auxiliar no tratamento de inflamações.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Luehea divaricata*, açoita cavalo, atividade Anti-inflamatória.

**ABSTRACT:** *Luehea divaricata* popularly known as horse whip is used in folk medicine, however studies evaluating the pharmacological activity of this plant species are scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory action of the hydroalcoholic bark extract of *Luehea divaricata* (EHLd). The antioxidant effect of EHLd was evaluated by the

DPPH method and the cytotoxicity of EHLD in Raw 264.7 cells was evaluated by the MTT (methyltiazole tetrazolium) method, as well as its anti-inflammatory effect was evaluated by the NO and IL-1 $\beta$  and IL-6 gene expression by griess and real-time PCR (RT-qPCR) methods, respectively. In addition, the anti-inflammatory effect of EHLD has also been evaluated in mice with acute lung injury (APD). Total and differential leukocyte count from both lavage and blood, IL-1 $\beta$  and IL-6 gene expression by lung RT-qPCR were analyzed and histological analysis of the lungs, kidneys and liver was performed. Through high performance liquid chromatography (HPLC), the EHLD showed as major peaks the substances Rhoifolin, Isorhoifolin, Naringin, Kaempferol - 3 - caffeoyl glucoside 7 - O Glucoside, and Nuzhenide. EHLD, at a concentration of 250 $\mu$ g / mL, showed anti-oxidant effect by capturing 55% of free radicals. EHLD showed low cytotoxicity at all concentrations tested from 50 $\mu$ g / mL to 250  $\mu$ g / mL ( $p < 0.05$ ). Compared to the in vivo study, pretreatment with EHLD reduced cell migration, mainly from neutrophils, to the lungs of DPA mice, and also reduced the expression of lung IL-1 $\beta$  and IL-6 genes, as well as, reduced edema and leukocyte infiltrate in the lungs caused by LPS. In this context, *Luehea divaricata* extract may help in the treatment of inflammation

**KEYWORDS:** *Luehea divaricata*, horse whip, Anti-inflammatory activity.

## 1 | INTRODUÇÃO

A fitoterapia já é conhecida a muitos séculos e com relatos de sua prática desde o Império Chinês entre 2.838-2.698 a. C., com uso e diversas formas de tratamento. Outro registro importante está em livros portugueses de farmacologia do século XVIII, que confirmam que os fitoterápicos já eram utilizados em Portugal e suas colônias, além do uso de minerais e produtos de origens animais para tratamento, prevenção a saúde (FIRMO et al, 2012).

No Brasil, desde do tempo de seu descobrimento, existem relatos de indígenas usando plantas medicinais para tratamento de diversas doenças, e esse uso e formulações empíricas vem sendo repassado de geração a geração (BRUNING et al., 2012).

Várias plantas são utilizadas pelo homem, cerca de 50.000 espécies diferentes, contudo esse número cai exponencialmente em relação ao estudo fitoquímico e seu potencial de ação (GULER; KUMUSTEKIN; UGURLU, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) diante do uso das plantas medicinais divulgou sua posição no final da década de 70, criando o Programa Medicina Tradicional. No Brasil essa abordagem iniciou na década 80 e se consolidou com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), que possibilitou a assistência envolvendo o uso das plantas medicinais (BRASIL, 2006)

Grande parte dessa biodiversidade de espécies se localiza no Brasil, e são

utilizadas a séculos na medicina popular para o tratamento de doenças e melhoria da saúde, e grande parte sem a comprovação científica da ação farmacológica. (TRIBESS et al., 2015).

Uma parte da população carente não tem acesso aos fármacos industrializados, e continuam usando chás, lambedores e garrafadas. A Política Nacional voltada as plantas medicinais e uso dos fitoterápicos, foi criada com o intuito de padronizar os fitoterápicos, com a participação de pesquisadores, usuários e profissionais de saúde (BRASIL, 2006).

Para consolidação da Fitoterapia, algumas resoluções foram modificadas visando celeridade para seu desenvolvimento, padronização, produção e comercialização (FIGUEREDO et al., 2011).

Segundo Maciel et al. (2002), o uso de plantas medicinais se constitui no único recurso terapêutico de grupos étnicos e comunidades, sem registro escrito e transmitidas oralmente. As pesquisas sobre as plantas medicinais são necessárias, e exige uma equipe multidisciplinar.

De acordo com ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os medicamentos fitoterápicos são aqueles que são obtidos a partir de derivados vegetais, com mecanismos de ação, possíveis riscos, e como eles agem no corpo humano, e seus os efeitos devem ser conhecidos. Os fitoterápicos obrigatoriamente devem comprovar através de estudos de toxicologia e farmacológicos a sua ação e efeito. Os artigos publicados, conhecimento tradicional sobre o uso das plantas medicinais serve de base para registro junto a ANVISA (BRASIL, 2016).

As espécies mais procuradas e indicadas no tratamento de infecções, bronquites, má-digestão, inflamações entre outras enfermidades são aquelas que a população acredita possuir ação de cura. Em feiras e mercados públicos ocorre a inter-relação dos conhecimentos tradicionais, medicina popular, e os consumidores podendo-se evidenciar a grande diversidade de saberes sobre plantas medicinais (FERREIRA JUNIOR et al., 2014).

A incidência de doenças em que ocorrem inflamações está diretamente relacionada a uma patologia, portanto a continua busca em encontrar novos compostos anti-inflamatórios com baixos efeitos adversos, e que sejam de origem natural (GUO et al., 2017).

A Inflamação é um mecanismo imunológico de defesa do organismo a diversos patógenos como: bactérias, vírus e outros. Durante esse processo, inicia-se a liberação de mediadores inflamatórios, as citocinas, que realizam danos no tecido e sinalizam a inflamação. (CHEN et al., 2016). O processo inflamatório é complexo e tem a participação de vários mediadores inflamatórios e citocinas que são liberadas por células ativadas, como: macrófagos (TNF-alfa, IL-6 e NO), linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF), eosinófilos (proteína basal principal-MBP, proteína catiônica

eosinofílica-ECP, peroxidase eosinofílica-EPO, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas), neutrófilos (elastase) e, pelas células epiteliais (endotelina-1, leucotrienos, prostaglandinas e NO). Embora o endotélio vascular ativado realize recrutamento de células inflamatórias, concomitantemente existe um aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1 (GINA, 2018). A predisposição genética e fatores ambientais pode ter um papel importante no prognóstico de uma doença inflamatória, além de acidentes químicos, físicos e biológicos.

Diante do exposto, a pesquisa propõe viabilizar o liofilizado do EHLd possibilitando um tratamento alternativo e viável economicamente, além de ser eficiente nos processos inflamatórios e auxiliando na prevenção.

## 2 | OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da casca da *Luehea divaricata*.

### 2.2 Objetivos específicos

Identificar os metabólitos secundários presentes no EHLd;

Analizar o efeito antioxidante do EHLd;

Avaliar a citotoxicidade do EHLd;

Analizar o efeito anti-inflamatório do EHLd na produção de óxido nítrico e na expressão gênica de IL-1 $\beta$  e IL6 em macrófagos estimulados por LPS;

Avaliar o efeito anti-inflamatório do pré-tratamento do EHLd em camundongos com Dano Pulmonar Agudo;

## 3 | REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais acompanham o desenvolvimento da humanidade, e esse conhecimento do uso e das práticas de preparo são passados de geração a geração (FREIRES, et al., 2010).

Nas últimas décadas houve aumento expressivo no uso de diversas plantas medicinais, e uma das explicações é o fato dos fármacos convencionais ocasionarem alguns efeitos colaterais, o que para alguns pacientes com restrição se torna inviável o uso (KOK et al., 2015).

Além disso, as discussões associadas ao resgate da diversidade biocultural local sobre o uso de plantas medicinais são essenciais para preservar o conhecimento

tradicional (SIQUEIRA e LEMOS, 2017)

O homem vem observando como alguns animais utilizam as plantas como medicamentos, e com o passar do tempo, através das próprias experiências empíricas foi possível organizar uma base de dados, gerando um acervo imenso para a fitoterapia moderna (BRASIL, 2006; BRANDÃO, 2011).

Plantas medicinais são vegetais naturais ou cultivados que são usados para fins terapêuticos, processados a partir de vários modos de preparamos e várias maneiras de administração como: lambedores, garrafadas, chás, tinturas e outros (JARDIM, 2016).

Plantas medicinais são aquelas utilizadas tanto pelo homem para fins medicinais e/ou que tenha alguma ação terapêutica.

Existem várias formas de utilizar as plantas medicinais, e os chás são a forma preferida pela população, pois contribuem na preservação dos compostos ativos, na hidratação, no equilíbrio da temperatura do corpo (MARODIN E BAPTISTA, 2001).

O homem ao longo do tempo foi conhecendo e usando as plantas medicinais de acordo com o possível potencial de cura. Contudo, somente no final do século XX, a comunidade científica intensificou um estudo mais aprofundado sobre as propriedades das plantas medicinais (SARAIVA, 2007).

O uso de fitoterápico caracteriza-se pelo uso de plantas medicinais e deve possuir formulações, modos de preparo e administração específicos, contudo sem utilização de princípios ativos isolados (SCHENKEL, 2001).

Várias pesquisas foram desenvolvidas para viabilização de formulações seguras do uso das plantas medicinais e fitoterápicas, visando disponibilizá-las a população brasileira.

A indústria farmacêutica cresceu muito após a 2<sup>a</sup>Guerra Mundial devido ao grande marketing, e os fitoterápicos foram colocados de lado, mas nas últimas décadas houve crescimento dos fitoterápicos ressurgindo como alternativa para diversas patologias (CARVALHO, BINO, MACIEL, PERFEITO, 2008).

A produção de fitofármacos e seus componentes ativos são extraídos de plantas, e esses compostos podem se transformar em medicamentos ou não dependendo da pesquisa, mas o produto pode se tornar um protótipo com propriedades farmacêuticas (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001). No Brasil, estimasse que os fitoterápicos movimentam US\$550 milhões por ano, e com taxas de crescimento girando em torno de 15% ao ano (BRASIL, 2015).

O aumento no uso das plantas medicinais no Brasil tem diversos fatores como: maior uso de produtos naturais, preços acessíveis, e a resolução dos problemas de saúde.

Existem tratamentos ainda não desenvolvidos de plantas no Brasil e consequentemente o não uso terapêutico no SUS, constituindo um atraso na

qualidade dos atendimentos (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006).

As plantas medicinais já são utilizadas no Brasil a bastante tempo, mas a inovação tecnológica é uma realidade e ferramenta importante, e detectar oportunidades para criar um produto baseado no conhecimento empírico, é muito mais do que retorno financeiro, se trata de mesclar uma série de combinações e práticas dos antepassados, gerando aprendizado e consolidando um processo (TIDD; BESSANT, 2015).

O Governo Federal buscou regularizar o crescente uso das plantas medicinais e fitoterápicos, e aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) através do Decreto Presidencial 5.813 de 22/6/2006 (BRASIL, 2006). Esse decreto regulamentou as diretrizes que diz respeito ao uso dos produtos naturais, como as plantas medicinais e fitoterápicos, visando a melhorias na qualidade de vida da população. Esses medicamentos naturais foram incorporados ao Sistema Único de Saúde – SUS (Portaria nº 971 do Ministério da Saúde, de 03/5/2006) (BRASIL, 2006).

Com isso a Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, possibilitou a agricultura familiar uma nova geração de emprego e renda, combatendo o êxodo rural e promovendo a redução das desigualdades regionais e locais (ZUANAZZI, MAYORGA, 2010).

De Acordo com a Constituição Federal de 1988, no artigo 6º, descreve que “A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e ao acesso às ações e serviços para a promoção, proteção e recuperação”.

O Sistema Único de Saúde (SUS), segundo a lei nº 8.080 de 1990, no artigo 04º, se refere ao conjunto de procedimentos e serviços de saúde, sendo os mesmos sem ônus para o cidadão, e prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, sendo de Administração direta e indireta, ou de Fundações mantidas pelo Poder Público (CNS, 2015). Então, conclui-se que todos têm direito à saúde, cumprida através do SUS (OAB, 2008).

A falta de medicamentos é uma realidade no Sistema de Saúde no Brasil, devido a burocracia e má logística de distribuição, e os fitoterápicos chegaram como uma alternativa integrativa de medicação muito útil e importante (SANTOS et al., 2011; BRANDÃO, 2011).

O uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no Brasil já está inserido nas práticas no serviço de saúde, e complementam as terapias medicamentosas alopáticas para a população menos favorecidas (BRUNING, MOSEGUI e VIANA, 2012).

Visando dar um maior suporte a questão das plantas medicinais que tem potencial de gerar produtos de interesse fitoterápico e posterior uso da população, o

Governo Federal lançou o RENISUS, que tem o objetivo de organizar, regulamentar e subsidiar a cadeia produtiva relacionadas à produção, manejo, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse no SUS (RENISUS), possibilitando segurança e melhoria para o tratamento de determinadas doenças. O Ministério da Saúde custeia pesquisas de interesse para o RENISUS, evidenciando a importância das plantas medicinais para desenvolvimento biotecnológico do Brasil, proporcionando medicamentos naturais e de baixo custo, ofertando qualidade de vida a população.

### 3.2 Plantas medicinais anti-inflamatórias

As plantas em geral são produtoras de metabolitos químicos primários e secundários, e grande parte das espécies produzem metabólicos primários que são essenciais para a sobrevivência dos vegetais. Em relação aos metabólitos secundários, esses possuem diferentes quantidades e tipos, com variações de espécie para espécie pois a produção desses metabólitos é influenciada pelo ambiente onde vivem como pluviosidade, pH dos solos, irradiação solar e outros, mas esses metabólitos secundários favorecem e proporcionam sobrevida e segurança ao vegetal (ASHU AGBOR; NAIDOO, 2015).

O uso de plantas medicinais como fitoterápicos, segundo Silva et al. (2008), vem sendo utilizada de geração a geração pelas famílias residentes em comunidades rurais, e essa prática é muitas das vezes a única opção que os mesmos têm, devido à falta de recursos financeiros, distâncias geográficas e dificuldades topográficas de se locomoverem até um posto de atendimento médico. As comunidades rurais do Brasil ainda sofrem com situações básicas como comunicação (telefone fixo ou celular), transporte e até falta de alimentos, e no Maranhão a situação piora pois possui um dos menores índices de IDH com 0,639, ocupando a 26º posição no ranking nacional (IBGE, 2010).

Algumas plantas se destacam em relação a confiança dos resultados pela população, é o caso do mastruço ou matruz, que é uma planta medicinal com ação antimicrobiana, fungicida, vermífuga, anti-inflamatória e cicatrizante. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que o matruz é a espécie mais usada do planeta em relação a medicina popular (RIBEIRO et al., 2004).

Outra planta anti-inflamatória é a romã, *Punica granatum L.* que pertencente à família Punicacea e é originária da região do mediterrâneo e oriente médio, muito utilizada no controle de inflamações diversas. As partes da planta mais utilizadas são os frutos, folhas, flores e casca da árvore, no tratamento de infecções em geral, além do trato respiratórios da garganta ao pulmão. Embora a população a usem também como antisséptico e antiviral, além de inflamações na boca (MENEZES, 2004).

A romã é muito usada devido sua ação anti-inflamatória e antimicrobiana, e uma das classes de metabólitos secundários encontrados na romã são os flavonoides, que são uma subclasse de polifenóis, que desempenham um importante papel na biologia desses vegetais e na saúde humana. (MANSURI et al., 2014).

Bastante utilizada pelas mulheres, a Aroeira é uma planta arbórea da família Anacardiaceae, e tem sua utilização na medicina popular para o tratamento de problemas ginecológicos e da região do útero, com atividade cicatrizante e anti-inflamatória. Sua composição fenólica das folhas é diferente da casca, contudo as duas são ricas em taninos e em óleo essencial, habilitando as mesmas ao combate e ação antimicrobiana. (JORGE et al., 1996; SALES, 2013).

De acordo com Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, confirma um dado interessante de que um dos produtos do Laboratório Aché, a erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), originária da mata atlântica, é um produto fitoterápico anti-inflamatório comercializado como pomada no mercado, já conseguiu ultrapassar as vendas do Cataflam.

Diante do exposto a *Luehea divaricata* se constitui em uma alternativa viável, pois é uma planta bastante utilizada na medicina popular, e devido a sua ação anti-inflamatória para o tratamento e prevenção de processos inflamatórios, pois é de simples manipulação e acessibilidade.

### 3.3 *Luehea divaricata*

#### 3.3.1 Aspectos Botânicos

A origem do nome *Luehea divaricata* é em homenagem ao botânico austríaco Karl Von der Lühe (*Lühea*), e *divaricata* que se refere aos aspectos dos pedúnculos da inflorescência (CUNHA, 1985). A escrita original *Lühea* passou a ser *Luehea*, de acordo o Artigo 73.6 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Outra grafia utilizada no Paraguai, Uruguai e sul do país, na língua tupi-guarani, é *Ivatingi*, que significa “fruto-que-aborrece”. Mas o nome vulgar açoita-cavalo advém da rigidez e flexibilidade dos galhos que era usado como chicote no manejo de diversos animais.

Pertencente à ordem Malvaceae, e família Tiliaceae, ao qual existem espécies no Sul da África e América do Sul e em todo Brasil. A açoita cavalo é uma árvore caducifólia, e uma planta adulta tem altura de 25 m com diâmetro de 50 cm (BACKES; IRGANG, 2002). Suas sementes são aladas e modo de dispersão anemocórica (pelo vento), tendo suas flores hermafroditas nas colorações rósea, amarelo e brancas, e são pentámeras, sendo o fruto capsulado com valvas lenhosas oblongas de coloração castanha e estouram para liberar as sementes aladas (CARVALHO, 2003).



Figura 01 - Árvore da espécie *Luehea divaricata*.

Fonte: João Augusto Bagatini - 03/2014 - Jadiel de Abreu Pimenta Lins – 04/2019

A *Luehea divaricata* é considerada espécie secundária inicial, isso quer dizer que em uma área degradada, com ação antrópica ou não, ela é uma das primeiras espécies florestais a surgir dentro de um processo natural de regeneração da vegetação (VACCARO et al., 1999).

De acordo com Lorenzi (1992), *Luehea divaricata* faz parte de um grupo de menos de 60 espécies aptas ao rápido crescimento, assim como o cedro, ipê roxo e branco, peroba, murta e outras, que são muito indicadas ao reflorestamento, e usadas nas áreas degradadas.

O Tronco é irregular, tortuoso, e com várias reentrâncias onde é comum encontrar

fungos. O fuste (parte do tronco) tem características de serem curtos, porém quando a planta se desenvolve no interior da floresta, tornam-se retos, medindo até 10 m de comprimento, isso ocorre devido a planta buscar o máximo de luz do sol, na competição com outras espécies na floresta (ORTEGA, 1995).

A açoita cavalo possui a copa larga e densa, possui folhas alternas, irregularmente e serreadas nas bordas, sendo branacenta na face inferior, medindo de 5 a 15 cm de comprimento. Sua casca chega a medir até 25 mm de espessura, sendo sua casca interna avermelhada e fibrosa. É comum a presença de diversos fungos, pois sua casca possui reentrâncias que permite a retenção da umidade.

A *Luehea divaricata* é uma planta muito adaptada, estabeleciondo-se em diferentes terrenos, seja seco ou úmido, raso ou pedregoso, em solos com textura variando de franca a argilosa, em solos com drenagem ou encharcados (LORENZI, 1992).

### 3.3.2 Planta medicinal - *Luehea divaricata*

As moléculas bioativas presentes em plantas medicinais, teve um aumento exponencial nos últimos anos, devido a uma série de fatores relacionados ao aumento de consumo da população pelos medicamentos fitoterápicos (DINIZ et al., 2007).

Novas ferramentas permitem um detalhamento melhor das substâncias presentes nas plantas medicinais, utilizando-se das análises fitoquímicas (SILVA et al., 2010).

A açoita cavalo já é muito conhecida pela população, e seu já é bem difundido e descrito por vários autores. Já as cascas do caule, assim como as folhas e folhas tem diversos usos como antisséptico, cicatrização, e afecções do sistema respiratório destacando-se bronquite e laringite (REINTZ 1950; TANAKA et al, 2003).

De acordo com Alice et al. (1985), a parte mais utilizada como depurativo e controle da inflamação é a raiz.

Já as folhas, segundo Tanaka et al. (2005), são utilizadas como fitoterápicos contra reumatismo e disenteria, além de ação anti-inflamatória e calmante. Pesquisadores do Sul do Brasil realizaram testes a parti de um extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata*, obtendo dois triterpenos, sendo um derivado do ácido torâmico e o outro do ácido maslínico, todavia esses compostos não foram avaliados (TANAKA, VIDOTTI, SILVA, 2003).

Posteriormente esse mesmo grupo de pesquisa, fazendo uso do mesmo extrato, identificaram um flavonóide, a epicatequina, e realizaram testes com concentrações do extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata* nas concentrações de 250-500 µg / mL, demonstrando a ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. (TANAKA et al., 2005).

Foram realizados testes antifúngicos usando um extrato de diclorometano

da *Luehea divaricata* (25 µg / disco filtrante), que conseguiu inibir montagem da parede celular de *Neurospora crassa*, ou em outras palavras, a síntese de polímeros (Zacchino et al., 1998).

Em outro estudo, Coelho de Souza et al. (2004), foi testado extrato metanólico das folhas da *Luehea divaricata*, na concentração de 50 mg / mL, obtendo resultado significativo para ação antimicrobiana.

### 3.4 Atividade anti-inflamatória

Vários são os conceitos para processo inflamatório, mas em geral se define como um processo imediato de resposta do organismo imunológico contra um dano do tecido, como cortes, batidas, aquecimento, ou até a invasão de patógenos, e nesse caso as células de defesa entram em ação. Acontece sempre com eventos sequenciais, que pode caracterizar-se por alguma características como dor, vasodilatação, vermelhidão, migração celular; maior permeabilidade vascular; ativação de mediadores inflamatórios, assim como outros processos.

A dor é uma das respostas de algo errado no organismo, e ela se divide em quatro tipos: fisiológica, inflamatória, neuropática e disfuncional, que são gerados por mecanismos diferentes em cada caso (GOLAN et al., 2017)

O corpo humano possui sistema de defesa organizado, e dispõe de três linhas básicas de defesas: a primeira são as barreiras físicas e anatômicas do corpo humano como: a pele (que é inultrapassável para muitos patógenos); mucosas; epitélios; suco gástrico (baixo pH); reflexos como espirros e tosses; pH vaginal; mucosa na câmara do pulmão entre outros. Já a segunda defesa é baseada na identificação, eliminação do agente infeccioso pela imunidade inata, realizada por algumas citocinas e componentes celulares, como monócitos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas.

Existem vários conceitos para resposta imunológica, e ela pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata caracteriza-se por barreiras físicas, químicas e biológicas com uma resposta rápida e limitada a determinados estímulos. Portanto ela é realizada por meio de componentes humorais, como complementos proteicos; já algumas citocinas; além de componentes celulares, como por exemplo os monócitos, eosinófilos e das células fagocíticas, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Sobre a terceira linha de defesa do organismo chamamos de imunidade adquirida ou adaptativa que é específica e envolve a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos (AGIER; EFENBERGER; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, 2015)

As principais células são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK. (CRUVINEL et al, 2010). Já a imunidade adquirida é a ativação de células

especializadas (linfócitos T e B) por meio de células que apresentam de antígeno (APCs). (CRUVINEL et al, 2010). Em relação as células dendríticas, são denominadas APCs, e consideradas a ponte entre as imunidades inata e adaptativa sendo atraídas e ativadas por elementos da resposta inata e viabilizam a sensibilização de linfócitos T da resposta adaptativa. (CRUVINEL et al, 2010)

Existem vários tipos de citocinas, e as mesma são divididas em dois grupos: citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Para que o sistema imune funcione de maneira ordenada, é preciso haver uma sincronia entre as funções específicas de cada grupo de citocinas. (TRIFUNOVIC et al., 2015).

Um dos representantes de citocinas inflamatória é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), produzida por macrófagos expostos a patógenos, que são os mais ativados no sistema imune inato (CALDWELL et al., 2014).

A IL-1 $\beta$  foi a primeira citocina descoberta nas pesquisas que descrevia a nocicepção inflamatória, e é umas das principais citocinas pró-inflamatórias. Outra citocina muito conhecida é a interleucina 10 (IL-10), do grupo anti-inflamatório, em função de defender o hospedeiro de resposta inflamatória grave (UDDIN et al., 2015).

Atualmente várias pesquisas envolvendo plantas e derivados têm resultados promissores para atividade anti-inflamatória, visando principalmente minimizar os efeitos colaterais dos fármacos. Os medicamentos agem no processo inflamatório em várias vias de sinalização celular e molecular, e com resultados na prevenção e tratamento, por isso as pesquisas biotecnológicas estão focadas em dados científicos que consigam gerar fitofármacos com ação comprovada (WANG et al., 2013).

## 4 | MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de Coleta

A área de coleta do material vegetal localiza-se na Universidade Federal do Maranhão – UFMA, nas coordenadas 02°33'09,71"S e 44°18'17,73"O, e altitude de 25m. A *Luehea divaricata* já possui exsicata no Herbário Ático Seabra na Universidade Federal do Maranhão, registrada sob o nº01117. A coleta da casca da açoita cavalo foi realizada na manhã de 15 de Junho de 2016, com retirada da casca no sentido vertical respeitando a fisiologia e botânica da planta. Após retirada da casca, a mesma foi limpa e selecionada para processo de secagem em temperatura ambiente de 25°C. Após 72 horas, as cascas foram trituradas em moinho elétrico e o pó obtido foi medido e graduado visando a extração dos metabólitos presentes e demais testes.

## 4.2 Extrato hidroalcoólico da casca

A recomendação do Etanol para a extração de compostos fenólicos durante o preparo de extratos hidroalcoólicos vegetais tem sido explicada devido à sua capacidade de inibir a oxidação de polifenóis (YAO et al., 2004). O etanol é diferente de outros solventes, porque sua estrutura molecular apresenta uma parte polar (possui o grupo OH) e outra apolar (com cadeia carbônica), proporcionando ao solvente uma maior extração da amostra e consequentemente apresentando uma maior variedade de compostos.

O processo de extração de metabólitos secundários EHLD foi realizada por maceração, utilizando-se uma mistura de álcool etílico (solução hidroalcoólica 70%) como solvente (Stowe, 1979). O volume de solvente foi quatro vezes o volume do soluto, sendo adicionado solvente sempre que preciso durante o processo de diluição tendo o cuidado de homogeneizar todo volume. A mistura foi feita em frasco âmbar fechado e mantido em constante agitação por 2 horas diárias. Após 72 horas foi realizada a primeira filtragem do extrato, com auxílio de um funil de vidro e papel filtro, além da segunda filtragem visando retirar materiais indesejados. O volume filtrado foi medido em proveta graduada e o obtido reposto com mais solvente da mistura inicial.

## 4.3 Cromatografia e espectrometria de massa

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se constitui em um dos métodos mais utilizados para identificar compostos diversos, e essa técnica realiza separações e análises quantitativas dos metabólitos secundários, com alta resolução, sensibilidade e segurança dos resultados (Collins et al., 2006).

Foi realizada investigação dos compostos secundários do extrato através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um Espectrômetro de massa (LC-MS). Na análise de Espectrometria de massa foi utilizado aparelho Amazon Speed ETD – Bruker, com faixa média de pressão operacional de Nebulizer 27 Psi, Dry gas: 12 L/min, temperatura de 300°C, HV: 4500V. Para a Cromatografia Líquida é utilizado uma Controladora: CBM-20A- Shimadzu, bomba LC-20AD Shimadzu, Detector SPD-20A – Shimadzu, Forno CTO-20A – Shimadzu e Autoinjetor SIL 20AC – Shimadzu, além Solvente A: H<sub>2</sub>O 1% ácido acético, Solvente B: MeOH, Coluna: Phenomenex Luna C18 (250x4,6mm-5µm), T forno: 40°C e Fluxo: 0,6 ml/min. Essas Análises foram realizadas no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – Central Analítica localizado no Instituto de Química da USP.

## 4.4 Cultura dos Macrófagos

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meios RPMI suplementados

com soro fetal bovino (SFB) a 10% e mantidos em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. As células foram tripsinizadas a cada 3 dias com o meio substituído e novamente mantidos nas mesmas condições em incubadora.

Os macrófagos RAW 264.7 (1,0 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram estimulados com LPS a 100µg/mL, e incubados com diferentes concentrações de EHLd (50µg/mL, 100µg/mL 250µg/mL) em placas de 96 poços (200 µL por poço) por 48 horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. A seguir, o sobrenadante foi coletado para dosagens de NO e as células utilizadas para expressão gênica.

#### 4.5 Teste antioxidante

Um dos vários métodos que são utilizados para a avaliação da atividade antioxidante é o sequestro do radical 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH; Sigma-Aldrich). O ensaio se baseia na quantidade da capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH, e é mensurado através da redução da hidrazina (ALVES et al, 2010). Neste trabalho, usou-se ensaio a partir de uma fração de 250µL de solução de DPPH (1mM), com 40µL das concentrações de 50µg/mL, 100µg/mL 250µg/mL do EHLd. As leituras foram feitas no ELISA, após 30 minutos de incubação, e a capacidade de reduzir o radical DPPH foi calculada através da média das absorbâncias, com base na seguinte fórmula [DPPH] (%) = (Ac - As) / Ac x 100, e temos: Ac - controle de absorção; As - Absorbância da Amostra. O Ácido Gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como o controle, por possuir boa ação antioxidante comprovada. O teste foi realizado em duplicita para cada amostra, e em diferentes concentrações, onde foi feita a média da atividade antioxidante que cada amostra apresentou.

#### 4.6 Teste de citotoxicidade

O método escolhido foi o MTT (tetrazólio de metiltiazol) que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, capazes de reduzir o MTT a sais de formazan, um composto de coloração azul escuro (MOSMANN, 1983). Foram utilizados macrófagos RAW 264.7, em placas de microdiluição de 96 poços a uma concentração 2 x 10<sup>5</sup> células em 200uL de meio RPMI + SFB 2% por poço e incubadas por 24h para aderência. As células foram cultivadas a 37 °C. Depois da incubação, o sobrenadante foi pipetado e descartado e acrescido 200uL das concentrações 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL e 250µg/mL do EHLd, em triplicata, diluídas no mesmo meio de cultura e incubadas por 48h. O próximo passo foi descartar o sobrenadante e colocar 100uL do mesmo meio com MTT (0,5%) (Sigma-Aldrich, EUA), para melhor visualização dos cristais de formazan nas células viáveis.. As placas foram incubadas por mais 24h e após esse período observou-se leitura no ELISA com

absorbância a 570nm. Os cálculos das porcentagens de crescimento e viabilidade celular, foram obtidos a partir da seguinte fórmula: %Viabilidade = TA/T1x100, tendo: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; e T1 = absorbância da suspensão celular de controle.

#### **4.7 Atividade anti-inflamatória – dosagem de Óxido Nítrico**

A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess (GREEN et al.; 1982). Foi realizado teste para mensurar a produção de óxido nítrico, através da concentração de nitrato presente no sobrenadante do meio de cultura. A absorbância foi mensurada em leitor de microplaca.

Para o reparo da curva de calibração da investigação do teor de nitrito presente nas amostras, foi necessário construir uma curva de calibração (absorbância x concentração de nitrito), com diluições padrões de uma solução estoque de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), cuja concentração inicial era de 1mg/mL.

A curva padrão foi construída com 6 pontos de concentração distintos e diluições específicas, em duplicata, para o cálculo da absorbância média de cada concentração. Esses resultados foram baseados em curva padrão de  $\text{NaNO}_3$ .

#### **4.8 Atividade anti-inflamatória *in vivo***

##### ***4.8.1 Animais***

No modelo experimental foram utilizados camundongos machos, 8 – 10 semanas de idade, pesando entre 20-30g, provenientes do Biotério do Uniceuma. Segundo protocolo do biotério, foram acondicionados o máximo de 05 animais por gaiola, em ambiente com temperatura e umidade controladas, estante com ventilação automática e individual por gaiola, ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais estavam com livre acesso a água e alimentação. A verificação do peso dos animais foi constante até o dia do experimento para ajuste das doses administradas.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Uniceuma, sob o protocolo N°147/17. A equipe envolvida no teste animal, possui certificado no Curso de Bioética em Experimentação Animal, além da experiência em manejo com animais de laboratório.

##### ***4.8.2 Modelo experimental - dano pulmonar agudo***

Utilizou-se camundongos Swiss, machos todos provenientes do biotério da UNICEUMA, e mantidos em condições higiênicas ideais.

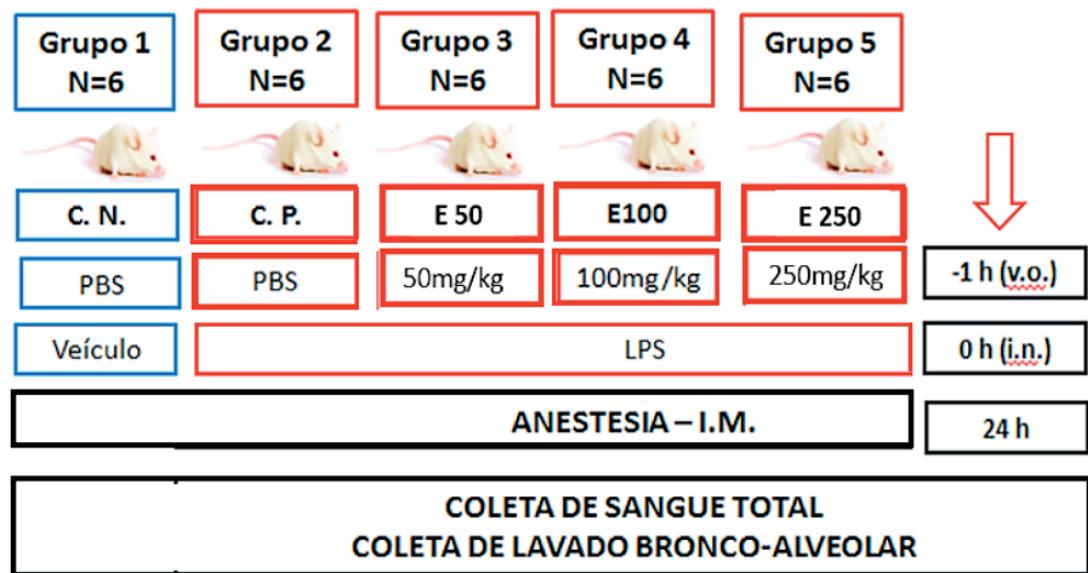


Figura 02 - Modelo Experimental – 05 grupos divididos em: CN, CP, CP + diferentes concentrações EHLD – animais induzidos por LPS.

Foram utilizados 48 animais nos testes, sendo que estes foram divididos em cinco grupos: Veículo+PBS (Controle Negativo - CN / N=6); Veículo+LPS (Controle Positivo - CP / N=6); EHLD 50mg/kg+LPS (E50 / N=6); EHLD 100mg/kg+LPS (E100 / N=6); EHLD 250mg/kg+LPS (E250 / N=6). Foi administrado, via oral (v.o.), uma solução de PBS como veículo (1ml/kg) nos grupos CN e CP, e nos grupos EHLD 50, EHLD 100, EHLD 250. Após uma hora, a infecção respiratória foi induzida nos animais dos grupos CP, EHLD 50, EHLD 100, EHLD 250, através da instilação de 30.000EU/10 $\mu$ g/50 $\mu$ L/animal (25 $\mu$ L/narina) de lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); e no grupo CN foi administrado 50 $\mu$ L de PBS na narina. Cumprindo normas de protocolo do CEUA, os sinais clínicos dos camundongos foram monitorados até o final do efeito sedativo.

#### 4.8.3 Lavado broncoalveolar

Nessa etapa, o procedimento teve início após vinte e quatro horas da instilação intranasal, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (80mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) visando coleta do sangue total por punção cardíaca. A coleta do lavado broncoalveolar segue a sequência: expõe toda a cavidade pulmonar e a traqueia do animal, para realizar uma punção traqueal com auxílio de um cateter, injetando um volume de 1,5ml de PBS estéril, sendo três etapas de 500 $\mu$ L cada, observando se o pulmão se enche, realizando a coleta imediata. O sangue e o lavado foram coletados para determinação do número de leucócitos total e diferencial.

#### 4.8.4 Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue

A contagem total dos leucócitos no sangue total foi feita no mesmo dia da coleta,

com utilização de microtubos pipetados a 400 $\mu$ L de solução de Turk e adicionado 20 $\mu$ L da amostra (diluição 1:20); após homogeneização, a contagem realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial dos leucócitos presentes no sangue foi feita por esfregaço sanguíneo, com alíquota de 10 $\mu$ L da amostra em lâmina e leitura em microscopia ótica em objetiva de 100X com imersão a óleo através da contagem de 100 células.

#### *4.8.5 Contagem total e diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar*

A contagem total dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada no mesmo dia da coleta, através de uma diluição de 1:2 de 10 $\mu$ L da amostra com 10 $\mu$ L de solução de Turk; a contagem foi feita em Câmara de Fuchs Rosenthal. A contagem da diferença dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada por gota espessa de uma alíquota de 100 $\mu$ L da amostra em citocentrífuga (TEKLAB) e leitura da lâmina em microscopia ótica em objetiva de 100X com imersão a óleo através da contagem de 100 células.

#### *4.8.6. Análise histológica*

Os órgãos coletados (pulmões, rins e fígado), foram fixados com formaldeídos a 10% por 24 horas, e foram embebidos em parafina. Após a desparafinização e desidratação, seções teciduais de 4 $\mu$ m foram fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e então analisada por microscopia na magnificação de 100x e 400x. Dois pesquisadores independentes fizeram análise cega, e se existisse discordância dos dados, um terceiro pesquisador realizaria outra análise. Todas as imagens histológicas foram realizadas no microscópio Binocular Axio Imager Z2.

### **4.9 Expressão Gênica *in vitro***

#### *4.9.1 Extração e análise de RNA total*

O RNA total obtido do lavado do pulmão do animal com utilização de um conjunto de reagentes *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) de acordo com o manual de instrução do fabricante. Após extração, a concentração de RNA total foi obtida por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotômetro GeneQuant 100 (GE Health care, Wisconsin, EUA) além do grau de pureza do RNA determinado pela relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>.

Foi utilizado reagentes SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen, Gathersburg, EUA), de acordo com protocolo do manual do fabricante, com a síntese de cDNA a partir de 200 $\mu$ g de RNA total. Na síntese de cDNA foi utilizado iniciadores aleatórios 200 nM (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), dNTP 200nM(Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), DTT 20mM, transcriptase

reversa 200 U (Superscript<sup>TM</sup>II RT RNase H) e com tampão (Tris-HCL 250mM pH 8,3, KCl 375mM, MgCl<sub>2</sub>15mM) (Invitrogen, MD, EUA). Após essa etapa a mistura foi incubada a 25°C por 10 min, a 50°C por 50 min e aumentada para 70°C a 15 min. O cDNA resultante foi conservado a -20°C até a realização da PCR em Real Time, visando a quantificação relativa dos genes inflamatórios.

#### 4.9.2 Análise da expressão de RNAm pela PCR em tempo real

O resultado da análise foi pela quantificação relativa da expressão dos genes IL-1 $\beta$ , IL-6. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes de interesse IL-1 $\beta$  e IL-6, e para o gene de controle endógeno GAPDH (Tabela 01), e selecionados utilizando o programa *Primer Premier 5.0* (Premier Biosoft International, Califórnia, EUA). As regiões analisadas possuem seqüência disponíveis no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Para a análise da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real, foi utilizado o método de Delta Ct ( $\Delta$ Ct) (Livak & Schmittgen, 2001). Foi feito um cálculo usando o  $\Delta$ Ct de cada uma das amostras, e para o cálculo do  $\Delta$ Ct, foi utilizado a fórmula: [Ct gene alvo - Ct gene endógeno]. Uma vez determinado os valores de  $\Delta$ Ct, foi aplicado a fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
IL-1 $\beta$	GGCAGCTACCTGTGTCTTCC	ATATGGGTCCGACAGCACGAG
IL-6	CAGGCTCCGAGATGAACAAAC	GGTGGAGAGCTTCAGCTCATAT
GAPDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGG	CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA

Tabela 01: Primers utilizados na expressão gênica..

### 4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos ao teste de simetria das variâncias quantitativas de Kolmogorov-Simirnov, e para as variáveis com distribuição assimétricas utilizou-se teste paramétricos de one-way ANOVA. O nível de significância para todas as análises foi  $p<0,05$ , realizados com auxílio do programa estatístico Graphpad Prism, versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), 2013.

## 5 | RESULTADOS

### 5.1 Rendimento do EHLd

O rendimento do EHLd foi de 18%, e calculado de acordo com Rodrigues et al.

(2011), sendo o peso inicial da coleta de 400g, e o teste de massa seca liofilizada foi repetida três vezes com resultado mediano de 72,02g, utilizando a seguinte fórmula:  $Re = (P_{ext} / P_{cascas}) \times 100$ . Onde:  $Re$  = Rendimento total do extrato (%);  $P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g);  $P_{cascas}$  = Peso das cascas (g).

## 5.2 Análise cromatográfica do EHLd

A avaliação da cromatografia revelou a presença de metabólitos secundários no EHLd, e observou-se a presença de flavonoides e iridóide. Esses metabólitos secundários foram identificados através da cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa permitindo a quantificação dos compostos. Os picos majoritários foram identificados, confirmando a presença de compostos de acordo com Figura 02.

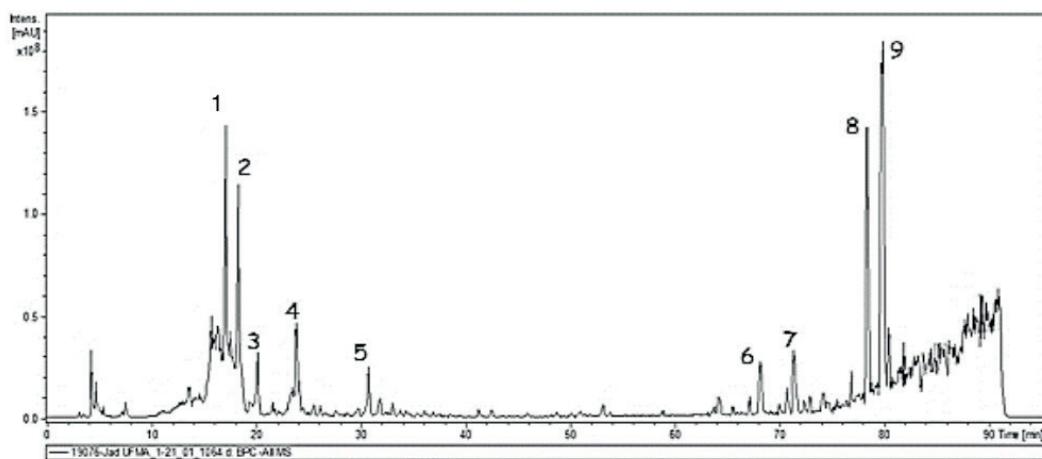


Figura 03. CLAE da EHLd - Identificação de picos marjoritários.

Pico	TR	M - H	Composto
1	17,2	577	Rhoifolin - flavanoide
2	18,4	865	Isorhoifolin – flavanoide
3	20,3	579	Naringin – flavanoide
4	23,9	577	Não identificado
5	30,8	731	Não identificado
6	68,2	689	Não identificado
7	71,3	619	Não identificado
8	78,3	933	Kaempferol – 3 -0 caffeoyl glucoside 7 – 0 Glucoside flavanoide
9	79,8	685	Nuzhenide – iridóide

Tabela 02. CLAE da EHLd - compostos identificados.

## 5.3 Ensaios *in vitro*

### 5.3.1 Atividade Antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação Antioxidante *in vitro* pelo ensaio de DPPH apresentou resultados de porcentagem de inibição de 22.5% determinado na concentração de 100 $\mu$ g/ mL e em adição na 250 $\mu$ g/ mL apresentou 54% de capacidade de captura de radicais livres. Os resultados obtidos na avaliação antioxidante foram comparados ao composto controle Ácido Gálico que é um potente antioxidante bem conhecido na literatura.

De acordo com Lima et al. (2007), extratos que apresentam atividade antioxidantes superior a 70% são considerados eficazes, com resultados entre 60% a 70% sua ação é moderada e abaixo de 60% são avaliados como fracos gradualmente. Portanto a atividade antioxidante depende da concentração do extrato, sendo considerada a relação de aumento da capacidade oxidante com o aumento da concentração.

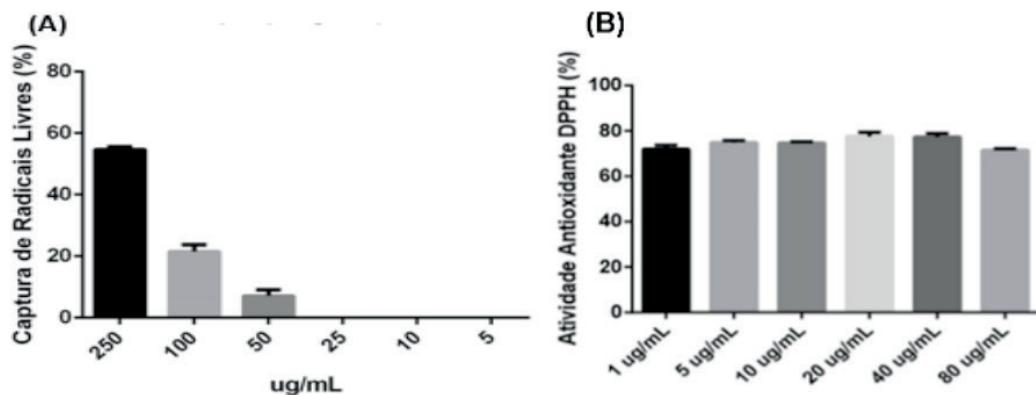


Figura 04 – Avaliação do efeito antioxidante da EHLD (A) através da captura de radicais livres pelo método DPPH. O Ácido Gálico foi utilizado como controle (B).

### 5.3.2 Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade pelo método MTT, demonstraram que todas as concentrações testadas apresentaram baixa citotoxicidade, ao observar a maior concentração do EHLD testada de 250  $\mu$ g/mL apresentou 75% de viabilidade.

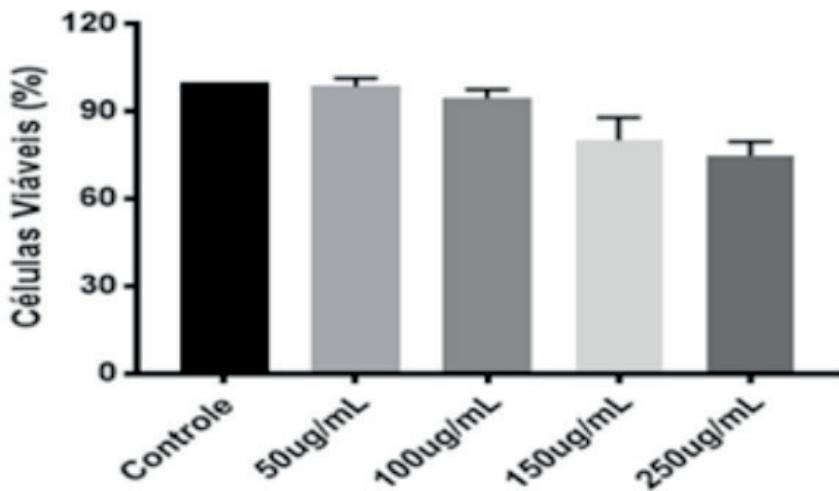


Figura 05 – Avaliação da viabilidade celular da EHLd em células Raw 264.7.

### 5.3.3 Óxido Nítrico – NO

A quantidade de nitrito presente no meio de cultura foi mensurada como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess, e o LPS estimulou o aumento significativo de NO,  $p<0,05$  (figura 07). Todas as concentrações testadas do EHLd reduziram a produção de NO.

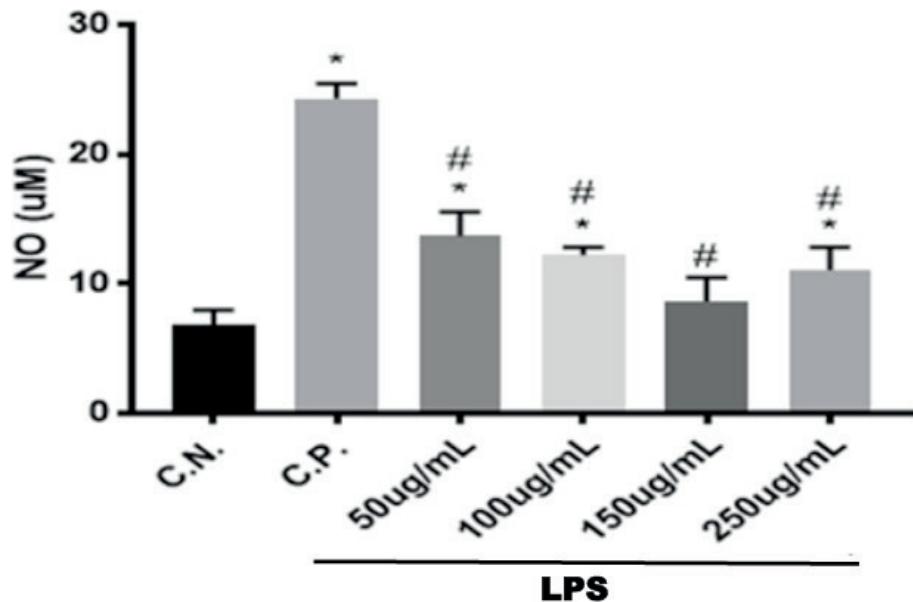


Figura 06 – Efeito do tratamento com o EHLd na produção de NO em macrófagos Raw 264.7. Os grupos foram identificados como: veículo+veículo C.N. - Controle Negativo; veículo+LPS

C.P. – Controle Positivo; 50 $\mu$ g/ mL+LPS; 100 $\mu$ g/ mL+LPS; 250 $\mu$ g/ mL+LPS ; CP\*  $p<0,05$  quando comparados com o grupo controle negativo. 50 $\mu$ g/ mL, 100 $\mu$ g/ mL e 250 $\mu$ g/ mL #  $p<0,05$  quando comparados com o grupo controle positivo - CP. (ANOVA)

### 5.3.4 Expressão Gênica

A figura 07 mostra a expressão genica de IL 1b e IL6 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, e tratados com diferentes concentrações do EHLd,

onde o LPS estimulou a expressão tanto do IL 1b quanto de IL6, nas concentrações do extrato da açoita cavalo (100, 150 e 250  $\mu$ g/ mL), reduzindo os marcadores pró-inflamatórias.

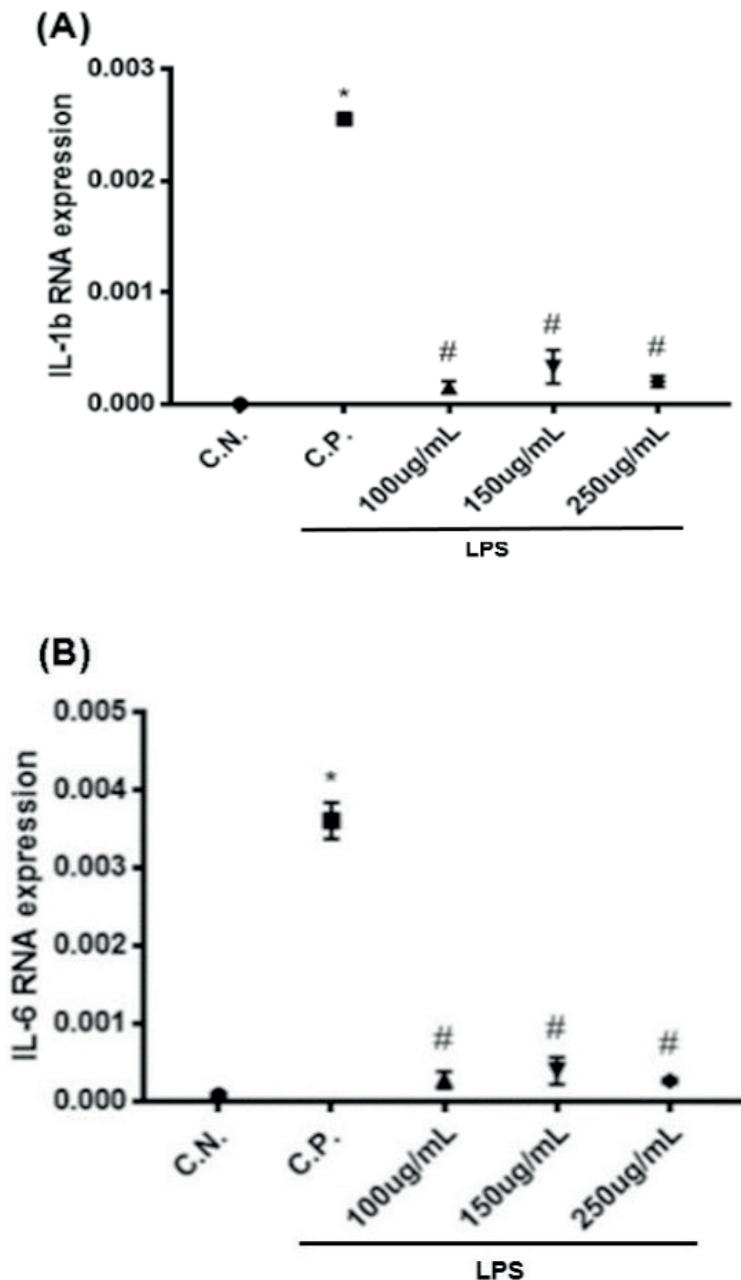


Figura 07 – Efeito do tratamento com o EHLd na Expressão Gênica de IL1 $\beta$  (A) e IL 6(B) em macrófagos peritoneais RAW 264.7 estimulados com LPS.

#### 5.4 Ensaios *in vivo* –

##### 5.4.1 Análise Histológica - Fígado

Nas administrações das doses de 50, 100 e 250 mg/kg (v.o.), não houve alteração significativa em relação ao fígado. Porém na dose de 250mg/kg, foi observado discreto infiltrado inflamatório. Nas demais estruturas, como capilares sinusóides e espaço porta, nenhuma alteração grave foi identificada. No geral não houve alterações histopatológicas crônicas nos animais tratados (24h).

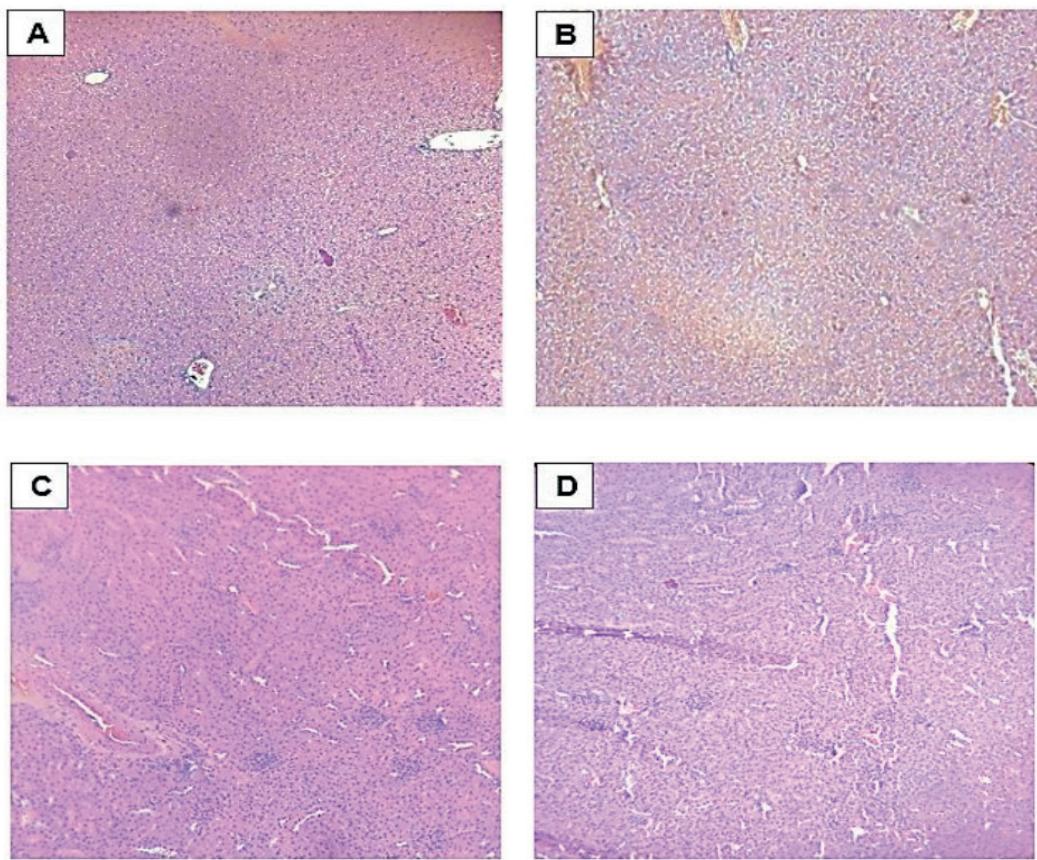


Figura 08: Análise histológica 10x: Fígado (A) CN - sem congestão vascular e com hepatócitos pouco vacuolizados; Fígado (B) LPS+EHLd 50mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, alguns hepatócitos mais volumosos; Fígado (C) LPS+EHLd 100mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, hepatócitos mais volumosos, pouca circulação sanguínea; Fígado (D) - LPS+EHLd 250mg/kg - 24 horas: com pouca congestão vascular, alguns hepatócitos com perda das ligações celulares, circulação sangue diminuída.

#### 5.4.2 Análise Histológica - Rim

Os resultados analisados nas lâminas do rim coletado, figura 09, foi de aspecto sem danos teciduais agudo, e observado em todos os grupos, submetendo-se que o intervalo de tempo estudado talvez não foi suficiente.

Nas doses 50, 100, 250mg/kg (v.o.), nenhuma alteração significativa foi observada, porém na dose de 250mg/kg observou-se congestão vascular na cortical em pequena quantidade e na dose de 100mg/kg notou-se também uma discreta congestão vascular e discreto infiltrado inflamatório entre os glomérulos. Diante do exposto, também foi observado que os animais não apresentarem alterações clínicas, além de apresentarem comportamento discreto em relação a anatomo-patológicas.

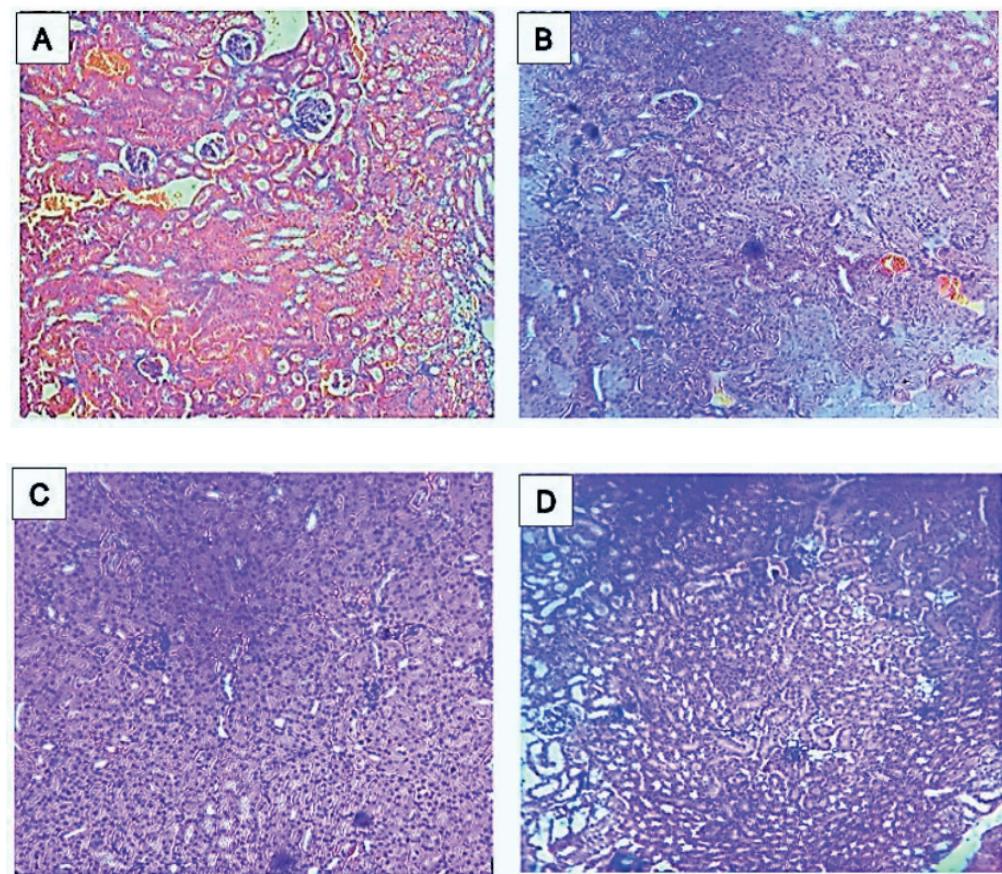


Figura 09: Análise histológica 10x: Rim (A) CN - túbulos renais preservados, apresentando corpúsculo renal e glomérulo bem preservados; Rim (B) LPS+EHLd 50mg/kg - 24 horas, região cortical pouco congesta, túbulos renais preservados; Rim (C) LPS+EHLd 100mg/kg - 24 horas: Rim apresentando corpúsculo renal com presença de alguns vasos congestos, mas com aspecto morfológico preservado; Rim (D) - LPS+EHLd 250mg/kg - 24 horas com região cortical preservada com presença de alguns vasos congestos com algumas áreas corticais com congestão vascular, com corpúsculo com aspecto normal.

#### 5.4.3 Análise Histológica - Pulmão

A Análise histológica dos pulmões estão ilustradas nas figuras de A – F, onde foram confeccionadas 48 lâminas, correspondentes ao número de animais do experimento. O Grupo Negativo - Salina, apresentou um aspecto histológico compatível com a normalidade, com o parênquima consistindo de alvéolos conectados a ductos alveolares, separados um do outro apenas por septos alveolares finas. Já os pulmões dos camundongos do Grupo CP – salina + LPS, observou-se que apresentaram áreas de ruptura de septos alveolares e congestionamento da área demonstrando dano pulmonar agudo.

Foi observado nesse estudo, através da análise do lavado brocoalveolar a presença de neutrófilos, confirmado a indução por LPS, além do que o neutrófilo faz um papel importante na fagocitose de material necrosado como também no recrutamento de outras células inflamatórias, ambos os eventos são associados com o sucesso na resposta regenerativa do pulmão (Teixeira et al., 2003). Os bronquíolos respiratórios são estruturas diferenciadas dos bronquíolos terminais pelo fato de

suas paredes serem associadas aos alvéolos. Esses conjuntos de alvéolos formam estruturas semelhantes a sacos ou corredores denominados ductos alveolares ao qual se abrem nos bronquíolos respiratórios. Em relação a este estudo, os testes *in vivo* os pulmões dos grupos E 50 e E100 (EHLd 50mg/kg + LPS, EHLd 100mg/kg + LPS), tiveram um padrão histológico reduzido em relação grupo controle CP. Já para o Grupo E250, LPS+EHLd 250mg/kg, foram observadas diferenças em relação as fibras colágenas dos alvéolos, bronquíolos e pulmões, quando comparados com o grupo controle CP – salina + LPS. Podemos observar melhor na figura 09, o efeito das diversas concentrações testadas do EHLd.

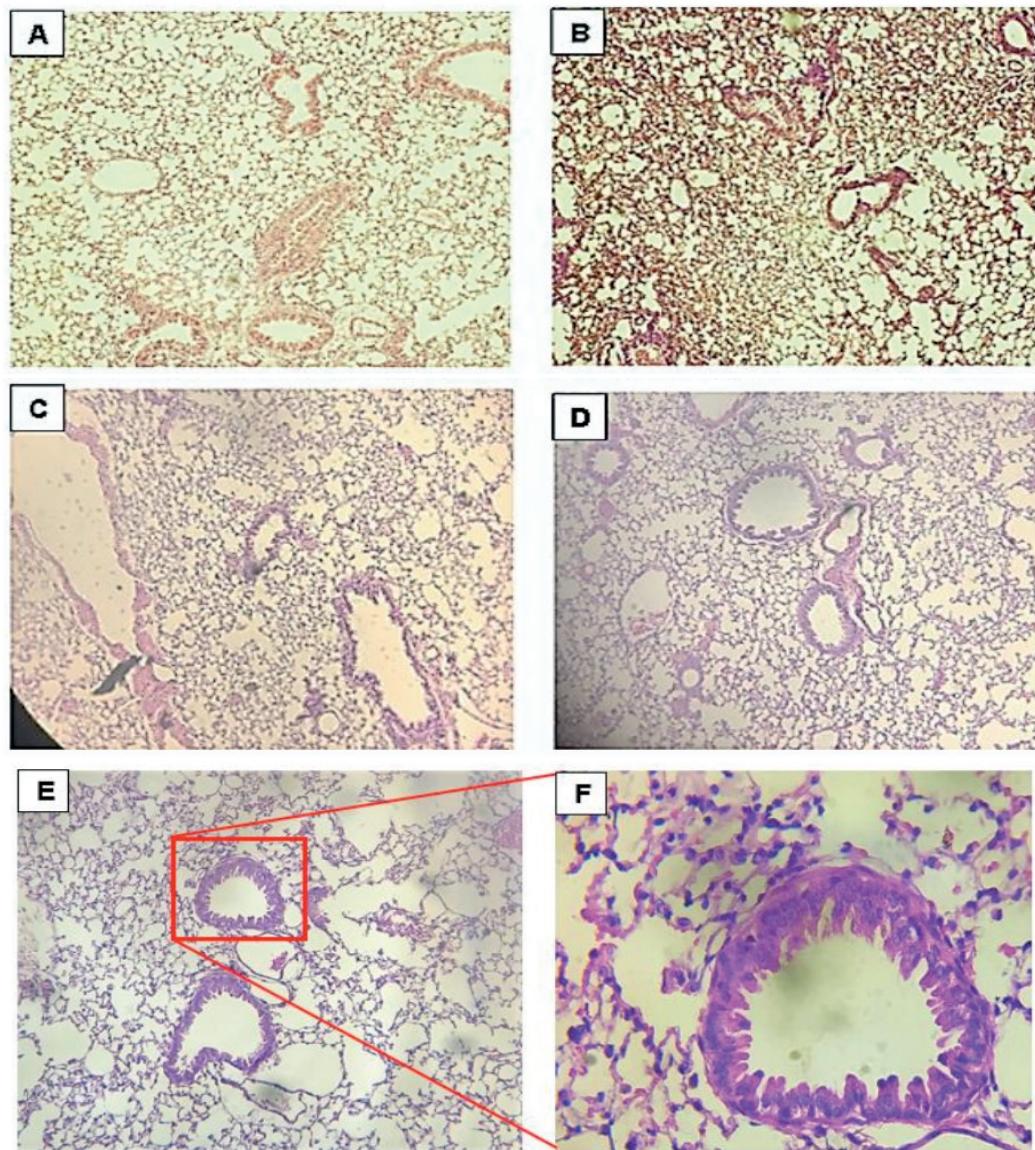


Figura 10 – Análise Histológica 10X – Pulmão - Efeito do tratamento com EHLd no acúmulo de leucócitos e formação de edema nos pulmões obtidos de camundongos tratados com: Salina (A), LPS (B), EHLd 50mg/kg + LPS(C), EHLd 100mg/kg + LPS (D) e EHLd 250mg/kg + LPS (E), e na objetiva de 40X o EHLd 250mg/kg + LPS (F).

#### 5.4.4 Lavado Broncoalveolar

No presente estudo, o achado mais consistente relacionado com os testes *in vivo* é a celularidade do LBA, onde observou-se as taxas reduzidas e significantes

de neutrófilos no grupo E250 (LPS+EHLd 250mg/kg) nas figuras (A) e (F) em comparação ao grupo controle positivo nas figuras (A) e (C).

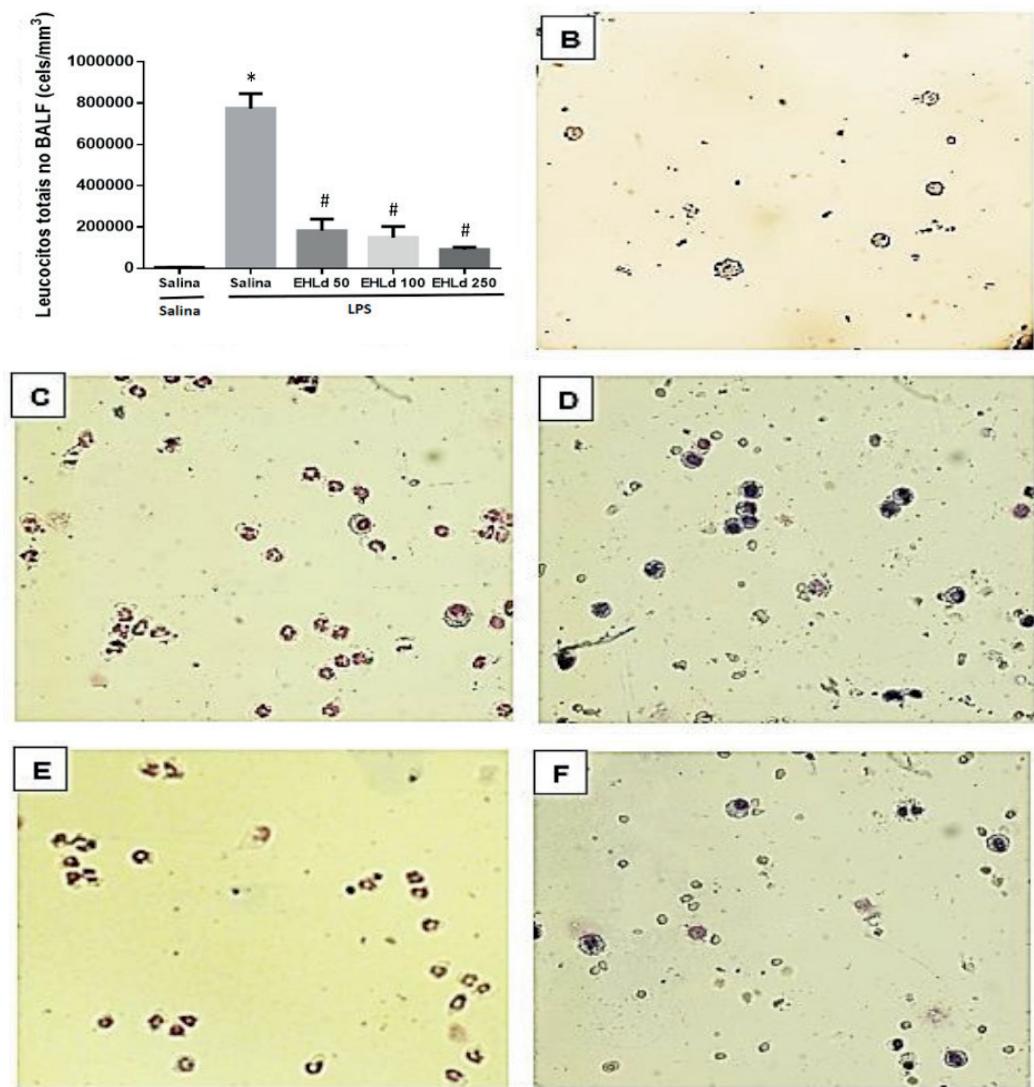


Figura 11 – Efeito do tratamento com EHLd com número de leucócitos totais do LBA (A). Os painéis B, C, D, E e F mostram figuras ilustrativas das células presentes no LBA de camundongos tratados com Salina (B), Salina+LPS (C), LPS+EHLd 50mg/kg (D), LPS+EHLd 100mg/kg (E), LPS+EHLd 250mg/kg (F), sendo essa última significativamente menor que Salina+LPS (C).

## 6 | DISCUSSÃO

A *Luehea divaricata* é uma planta utilizada na medicina popular no Brasil, e as partes mais utilizadas são as aéreas (folhas, flores e casca), e apesar de seu potencial anti-inflamatório existem poucos estudos com a espécie.

Segundo Tanaka (2005), ela é usada contra disenteria, reumatismo, além da infusão das flores que é usada contra bronquite. Por outro lado, estudos de Rai (2003) confirmaram que as partes aéreas de *L. divaricata* são usadas popularmente para feridas cutâneas e para higiene íntima. Em relação ao uso nas diferentes regiões do Brasil, podemos concluir que a *Luehea divaricata* tem grande importância na medicina popular.

Corroborando com nosso estudo, Bessa et al (2013), relataram uma citação do açoita-cavalo como sendo de utilidade para o tratamento de úlcera na comunidade rural do Assentamento Green Vale, no Estado do Tocantins, Brasil Central. Em outro estudo similar de BIESKI et al (2012), pesquisa etnofarmacologica de plantas medicinais do Pantanal (Mato Grosso, Brasil), relataram que a *L. divaricata* está entre as espécies com maior valor de importância relativa. Corroborando sobre uso da *L. divaricata*, pesquisas de MONTELES e PINHEIRO (2007), realizaram um estudo etnodirigido no Quilombo Sangrador, Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil, a açoita-cavalo foi uma das espécies de maior importância, com indicações para o tratamento de doenças do aparelho geniturinário.

O EHLD desse estudo apresentou as classes flavonoides e iridóide em sua composição de metabólitos químicos secundários. Neste contexto, pesquisas realizadas por Arantes (2012), também analisou o extrato etanólico de folhas de *Luehea divaricata* coletadas no sul do Brasil, e através da CLAE relatou a identificação de flavonóides como a quercetina, rutina, ácidos aromáticos ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e kaempferol, sendo esse último composto também identificado em nosso estudo. Outra pesquisa similar desenvolvida por Albuquerque et al.(2014), realizaram análise fitoquímica no extrato das folhas de *Luehea divaricata* coletada em feiras de Belém - PA, e conseguiram observar a presença de taninos, catequinas, flavonóides, carotenóides, esteróides, triterpenóides e saponinas.

Por outro lado, Bertucci et al.(2008) em pesquisas por triagem fitoquímica com extratos etanólicos das folhas e caule, também observaram a presença de flavonóides, taninos, saponinas e triterpenos. Outra pesquisa em questão, foi a desenvolvida por Vargas et al (1991), que conseguiram confirmar a presença de taninos, flavonóides e saponinas nas folhas e casca de *L. Divaricata*, sendo quercetina e kaempferol os flavonoides descritos, assim como em nosso estudo em que a EHLD também apresentou o flavanoide kaempferol.

Em relação a citotoxicidade do EHLD, foi observado que este possuiu baixa citotoxicidade no ensaio utilizando macrófagos Raw 246.7. Por lado um estudo realizado por Bianchi et al. (1996), observaram que o extrato etanólico das folhas da *Luehea divaricata*, apresentavam toxicidade na dose de 500mg/kg, quando administrado via oral, ocasionando a morte de 25% dos camundongos. A atividade fitotóxica de *Luehea divaricata* foi claramente demonstrada por Souza et al. (2005), onde os autores apontam o teste com extrato aquoso de folhas coletadas em Pelotas, RS, e mostrou efeito inibitório na germinação de *Lactuca sativa*. No entanto, extratos de *L. divaricata* demonstram *in vivo* falta de toxicidade ou mutagenicidade.

Em relação ao efeito antioxidante da *Luehea divaricata*, esse estudo observou que o EHLD pode ser utilizado para tratar doenças em que a produção de radicais livres é deletéria. Essas mesmas propriedades antioxidantes foram observadas

por Müller (2006) em folhas de *L. divaricata*, utilizando o método DPPH, o autor observou o extrato bruto com ação antioxidante semelhante à quercetina. Por outro lado, Arantes (2012) mostrou atividade antioxidante em baixas concentrações de extrato etanólico das folhas desta espécie, e seu efeito protetor contra a peroxidação lipídica.

Pesquisa envolvendo atividade anti-inflamatória e citotoxicidade foi realizada por Lopes (1990), que investigou a ação anti-inflamatória de *L. divaricata* através de experimento utilizando o extrato aquoso obtido das folhas secas da planta, com teste de edema de pata de rato induzido por carragenina e segundo o autor, houve redução no edema. Por outro lado, Siqueira (2006), utilizando o extrato hidroalcoólico de *L. divaricata* reduziu taxa de lesões ulcerativas produzidas por indometacina e etanol. Nossa pesquisa indica que o mecanismo de ação anti-inflamatória do EHLd está relacionado à atividade antioxidante confirmada pela captura dos radicais livres, e que a análise fitoquímica do extrato apresentou polifenóis na casca da planta. Corroborando com nossa pesquisa, estudos de Bianchi (1996), realizou teste de toxicidade aguda e subaguda com extratos dessa espécie e fez uso de ratos Swiss machos. O extrato alcoólico foi administrado por via intraperitoneal e foi observado que 50% dos animais morreram em 48 horas. Em outro teste de toxicidade subaguda, intraperitoneal, administrada uma vez por semana durante 8 dias, desencadeou a morte de um animal após a 8<sup>a</sup> dose, ao contrário do extrato alcoólico que nesta dose não causou nenhuma morte.

Sendo assim a atividade anti-inflamatória observada *in vitro* e *in vivo* com uso do extrato bruto da *Luehea divaricata*, pode ser resultado do efeito isolado ou sinérgico desses fitoquímicos. A síntese dos flavonoides antioxidantes e anti-inflamatórias em algumas plantas é um processo natural de fotoproteção e estresse ao período seco, e está diretamente relacionada a presença de altas quantidades dos flavonoides quercetina e/ou kaempferol (TREUTTER, 2006).

Foram observados durante nossa pesquisa que o tratamento com EHLd causou uma redução da contagem diferencial do lavado broncoalveolar de dois tipos celulares: macrófagos e neutrófilos. Existiu uma migração significativa de neutrófilos, no lavado broncoalveolar dos animais testados, o mesmo foi relatado em pesquisas de XU, M. et al. (2015).

De modo geral, podemos concluir que os resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos nesse estudo, do extrato da *Luehea divaricata* testado, foi capaz de reduzir a formação do edema pulmonar, evidenciando mais uma vez, o potencial da atividade anti-inflamatória.

## 7 | CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos (CLAE) demonstraram a presença de flavanóides e iridóide no extrato da casca da *Luehea divaricata*.

O EHLd apresentou baixa citotóxidade entre as concentrações de 50 $\mu$ g/ mL, 100 $\mu$ g/ mL, 150 $\mu$ g/ mL e 250 $\mu$ g/ mL.

Nos ensaios de atividade antioxidante, o EHLd apresentou mediana capacidade de captura de radicais livres em relação ao controle ácido gálico.

O EHLd reduziu a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, nos pulmões dos camundongos com inflamação pulmonar aguda.

Os testes com macrófagos RAW 264.7 confirmaram ação anti-inflamatória, e reduziram significativamente a produção de NO nas concentrações de 50 ug/mL, 100 ug/mL, e 250 ug/mL, frente ao EHLd.

Houve redução significativa da expressão genica de IL1 $\beta$  e IL6 com tratamento do EHLd nas concentrações de 100, 150 e 250  $\mu$ g/mL.

## REFERÊNCIAS

Agier, J.; Efenberger, M.; Brzezinska-Blaszczyk, E. **Cathelicidin impact on inflammatory cells**. Cent Eur J Immunol, v. 40, n. 2, p. 225-35, 2015.

Albuquerque, U. P. A.; Monteiro, J. M.; Ramos, M. A.; Amorim, E. L. C.; Alves, R. N. **Ethnobiological Research in Public Markets**, 2014.

Alice C. B., G. A. A. B. Silva, N. C. S. Siquei Ra, And L. A. Mentz, **Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul**. Cadernos de Farmácia, vol. 1, no. 2, pp. 83–94, 1985.

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., Aguiar, R. M. **Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos**, Química Nova, 33(10) 2202-2210, 2010

Arantes L. P., **Atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico das folhas de Luehea divaricata Mart**, UFSM, Santa Maria, Brazil, 2012.

Backes, P.; Irgang, B. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Santa Cruz do Sul: Clube da Árvore, 2002.

Bessa N., J. Borges, F. Beserra et al., **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde—Tocantins**, Revista Brasileira de Plantas Medicinais, vol. 15, no. 4, pp. 692–707, 2013

Bianchi, N.R. et al. **Estudo da toxicidade de Luehea divaricata**. Revista Brasileira de Farmacologia, v.77, n.2, 49-50, 1996.

Bieski I. G. C., F. R. Santos, R. M. De Oliveira Et Al., **Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil)**, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no 84**, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira – disponível em:

**BRASIL ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** RENISUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

**BRASIL. Portal da Saúde. Ministério da Saúde, 2014.** Disponível em: . Acesso em 27 de abril de 2015. BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. rev. e atual– Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

**BRASIL. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Secretaria de Atenção à Saúde.** Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

**BRASIL. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Secretaria de Ciência, Tecnológica e Insumos Estratégicos.** Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

**BRASIL. Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006.** Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 de maio de 2006.

**BRASIL. Presidência da República; Decreto Nº 5.813 de 22 de junho de 2006.** Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006.

**BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.** Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 2. 23 jun. 2006.

Bruning, M.C.R.; Mosegui, G.B.G.; Viana, C.M.M. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** Ciência e Saúde coletiva, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

Carvalho, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras.** Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, vol. 1. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003.

Carvalho, A.C.B; Bino, E.E; Maciel, A; Perfeito, J.P.S. **Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. Paraíba, Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Curitiba/ PR, v.18, n. 2, p. 314-319. 2008.

Chen, H. Et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry,** PLoS ONE, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

Collins, C. H.; Braga, G. I.; Bonato, Perina, S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

Cunha, L. H. De S.; Branda, M.; Laca-Buendia, J.P. Del C.; Gavilanes, M. L. **Plantulas, frutos/ sementes e sementes de plantas daninhas em pastagens naturais de cerrado, no Estado de Minas Gerais.** In: CONRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 36., 1985.

Diniz, A.C.B.; Astarita, L.V.; Santarém, E.R. **Alteração dos metabólitos secundários em plantas de Hypericum perforatum L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento.** Acta bot. bras. v. 21, n.2, p. 443-450, 2007.

Ferreira Junior, W. S.; Almeida, J. L.; Albuquerque, U. P. **Urbanização e serviços públicos.** In: ALBUQUERQUE, U. P. (Ed.). Introdução à Etnobiologia. Recife: NUPEEA, p. 175-179, 2014.

Figueroedo, C.A. **Fitoterapia**. João Pessoa: Núcleo de Estudo e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas, 2011.

Firmo, Wellyson da Cunha Araújo et al. **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais**. Cadernos de Pesquisa, 2012. Disponível em: <https://goo.gl/L9PorU> Acesso em: 08.abril.2018.

Freires, I.A. et al. **Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) e *Solidago microglossa* (arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário**. Odontologia Clínico-científica. V. 9, p. 139-143, 2010.

Golan De, Armstrong Ej, Armstrong AW **Principles of pharmacology : the pathophysiologic basis of drug therapy**, 2017.

Green, L. C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982

Guler, B.; Kumustekin, G.; UgurLU, E. **Contribution to the Traditional Uses of Medicinal Plants of Turgutlu (Manisa - Turkey)**. J Ethnopharmacol, Oct 19 2015.

Guo, B. J. et al. **Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1401, n. 1, p. 37-48, 2017.

IBGE. Censo Demográfico 2010 – Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), 2010. Resultados do Panorama – Economia. Disponível em. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/panorama>. Públíco acesso em 16 de junho de 2018.

Jardim, P. M.S. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Guia Rápido Para a Utilização de Algumas Espécies Vegetais**. 2 Ed. Brasília – DF. Universidade de Brasília. 98 p. 2016

Jorge L.I.F; Markmann B.E.O. **Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. Ciênc. Farm. V.17, p.139-45, 1996.

Kok, E. T. et al. **Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium**. Evid Based Complement Alternat Med, v. 2015.

Lima A, Silva Amo. Tridande Ra. Torres Rp. Mancini-Filho J. **Chemical composition and biocative compounds in the pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) Pulp and almond**. Revista Brasileira de Fruticultura, 2007.

Lopes E., **Avaliação das Atividades Biológicas de *Luehea divaricata***, Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia, São Paulo, Brazil, 1990.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352 p. 1992.

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. & Veiga, V.E. **Plantas medicinais:a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova v.23: 429-438, 2002.

Mansuri, M. L. et al. **Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways**. Genes Nutr, v. 9, n. 3, p. 400, May 2014.

Marodin, S.M.; Baptista, L.R.M. **O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.4, n.1, p.57-68, 2001.

Menezes, S.M.S. **Avaliação da eficácia antimicrobiana do extrato hidroalcoólico dos frutos de Punica granatum L. (romã) na placa bacteriana.** 80p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2004.

Monteles R. E Pinheiro B. U. C., **Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica,** Revista de Biologia e Ciências da Terra, vol. 7, pp. 17–37, 2007

Napolitano, D.R.; Mineo J.R.; Souza M.A.; Paula, J.E.; Espindola, L.S.; Espindola, F.S. **Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude extracts from Brazilian Cerrado.** J. Etnopharmacol., v.99, p.37-41, 2005.

Ortega, L. S. **Temperamento de luz de los arboles del alto Paraná y potencial de regeneración forestal.** Assunción, v. 11, n. 1, p. 16-20, 1995.

Ribeiro, F.A.Q.; Guaraldo, L.; Borges, J.P.; Zacchi, F.F.S.; Eckley, C.A. **Clinical and histological healing of surgical Wounds Treated With Mitomycin C. Laryngoscope,** v. 114, p.148-152, 2004.

Rodrigues, T. S.; Guimarães, S. F.; Rodrigues-Das-Dôres, R. G.; Gabriel , J. V. **Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de Plectranthus barbatus (boldo-da-terra) e P. ornatus (boldo-miúdo).** Rev. Bras. Pl. Med., v.13, especial, p.587-590, 2011

Sales, M.D.C. **Avaliação e caracterização de insumos bioativos da aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi) com potencial econômico para o desenvolvimento tecnológico de bioproductos** [Tese de Doutorado]. Vitória (ES): Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2013.

Souza S. A. M., Cattelaia L. V., and Vargas D. P., **Efeitos de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface**, Biologia & Saúde, vol. 11, pp. 29–38, 2005.

Saraiva, A. M. **Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de Caesalpinia pyramidalis Tull. e Schinopsis brasiliensis Engl. frente a cepas de Staphylococcus aureus MRSA Multirresistentes.** Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007. 58 p. <<http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3522>>

Silva, F.L.A.; Oliveira, R.A.G.; Araújo, E.C. **Uso de plantas medicinais pelos idosos em uma Estratégia de Saúde da Família.** Revista de Enfermagem da UFPE, v.2, n.1, p.9-16, 2008.

Silva, N.L.A.; Miranda, F.A.A.; Conceição, G.M. **Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão.** Scientia Plena. São Cristóvão, v. 6, n. 2, p. 1- 17, 2010.

Siqueira M. G., **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da Luehea divaricata Martus et Zuccarini**, Campinas, UNICAMP, 2006.

Siqueira, J. I. A.; Lemos, J. R. **Importancia del Rescate de la Memoria Biocultural Local: Diálogos entre la Etnobotánica y Experiencia Viva en Brasil.** En: CONGRESO COLOMBIANO DE BOTÁNICA, 2017, Tunja, Boyacá, Colombia. Revista Ciencia en Desarrollo p. 281., 2017.

Stowe, L. G. **Allelopathy and its influence on distribution of plants in Illinois old-field.** J. Ecol., v. 67, n. 4, p. 1065-1085, 1979

Tanaka, J. C. A. et al. **A new Tormentic Acid derivative from Luehea divaricata Mart, (Tiliaceae).**

Tanaka, J. C. A. et al. **Constituintes químicos de Luehea divaricata Martius, (Tiliaceae).** Química Nova, vol.28, n.5, 834-837, 2005.

Teixeira Cf, Zamunér Sr, Zuliani Jp, Fernández Cm, Cruz–Hoeling Ma, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez Jm. **Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom.** Muscle Nerve 28: 449–59, 2003.

Tidd, J., & Bessant, J. **Gestão da inovação**, Bookman. Porto Alegre, 2015.

Tribess, B. et al. **Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil.** J Ethnopharmacol, v. 164, p. 136-46, Apr 22 2015.

Vaccaro, S. et al. **Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma floresta estacional decidual, no município de Santa Tereza – RS.** Ciência Florestal, Santa Maria, v.9, n.1, p.1-18, 1999.

Vargas V. M., R. R. Guidobono, And J. A. Henriques, **Genotoxicity of plant extracts**, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 86, pp. 67–70, 1991.

Yao, L.; Jlang, Y.; Datta, N.; Singanusong, R.; Liu, X.; Duan, J., **HPLC analyses of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (Camellia sinensis) grown in Australia.** Food Chemistry, v. 84, p. 253-263, 2004.

Yunes, Rosendo A.; Pedrosa, Rozangela Curi; Cechinel Filho, Valdir. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Química nova, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. (Org.). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: Argos, 2001.

## CHEMICAL MANAGEMENT OF *Bidens pilosa* (L.) AND *Euphorbia heterophylla* (L.) AND SEED GERMINATION IN GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN

Data de aceite: 12/12/2019

### **André Luiz de Souza Lacerda**

Post Doctoral Fellow / FAPESP, Campinas, SP,  
E-mail: alslacer@yahoo.com.br.

### **Edgar Gomes Ferreira de Beauclair**

Professor Doutor do Departamento de Produção  
Vegetal ESALQ/USP

### **Daniel Andrade de Siqueira Franco**

Scientific Researcher, Weed Science Laboratory,  
Biological Institute, Campinas, SP / Brazil

### **Luis D. Honma**

Eng. Agro. Agro Experimental Station.

### **Marcus Barifouse Matallo**

Scientific Researcher, Weed Science Laboratory,  
Biological Institute, Campinas, SP / Brazil

**ABSTRACT:** The objective of this work is to propose a chemical management alternative to control *Bidens pilosa* and *Euphorbia heterophylla* in genetically modified soybean without affecting grain production and seed germination by using glyphosate applied only once and in mixture, aiming to reduce the number of applications and the amount of herbicides used. The experimental design was randomized blocks with 10 treatments and 4 replications. The soybean used was BRS-Valiosa RR. The treatments consisted of glyphosate and chlorimuron-ethyl applied once and alone (1.5; 2.0 and 80 L or g

ha<sup>-1</sup> pc), glyphosate in mixture with chlorimuron-ethyl (1.5 + 10 and 2.0 + 10 L or g ha<sup>-1</sup> pc) and sequentially applied glyphosate (1.5 / 1.5; 2.0 / 1.5 and 2.0 / 1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup> pc), plus weeded (clean) and non-weeded (dirty) witnesses. The evaluations were: herbicide efficacy in *B. pilosa* and *E. heterophylla*, phytotoxicity, density, height and grain yield (kg ha<sup>-1</sup>) in soybean. The production data obtained were subjected to analysis of variance and F test by the SANEST program ( $P < 0.05$ ). It was concluded that the studied species, *B. pilosa* and *E. heterophylla*, were controlled by glyphosate at levels above 90%. There was no visual injury in soybean and no significant decrease in grain yield and seed germination.

**KEYWORDS:** transgenic soybean, biotechnology, seeds, herbicides.

### **INTRODUCTION**

For soybeans, the methods commonly used for weed control are mechanical, crop and chemical. However, control is most effectively done by chemicals, where the main advantages are in labor economy and speed of application. Chemical control obeys the principle that certain products are capable of killing plants, and much more importantly, that many of them can kill some types of plants without injuring

others (LORENZI, 2000).

In conventional soybean, a preemergent product is generally applied and subsequently a selective action product in the postemergence of the crop. However, this type of control may present some problems. Selective products, for example, do not control some broadleaved plants and some pre-emergent plants have a prolonged residual effect and may cause phytotoxicity in crops that are planted in succession; This drawback is even more pronounced in regions where safrinha maize is cultivated (RISSI et al., 1997). Another point to be highlighted is that the cost in this type of control is high, because it is necessary to enter the field at least twice, and the operation can cause greater mechanical damage to soybean plants and soil compaction.

An alternative to weed control would be the cultivation of genetically modified soybeans, which would basically only involve the use of glyphosate herbicide, which is a non-selective product that controls large numbers of broadleaf and narrow-leaf plants by inhibiting EPSP synthetase. , an enzyme that participates in the metabolic pathway of aromatic amino acid biosynthesis (tryptophan, tyrosine and lysine), which are essential for plant growth (JESOVESK, 1997). In this production system it is possible for genetically modified soybeans to develop even after glyphosate herbicide application (JESOVESK, 1997), thus allowing chemical control to be performed when weeds reach levels of competition with soybeans, which may reduce the number and quantity of herbicides used, making production costs lower and avoiding other problems.

Therefore, due to the fact that, to date, there are few publications of research results related to genetically modified soybean cultivation in Brazil, this research aimed to propose an adequate weed management system in glyphosate tolerant soybean cultivars without affecting the yield production.

## MATERIAL AND METHODS

The field trial was installed in an experimental area of Agrocosmos Agrícola SA, in the municipality of Engenheiro Coelho (SP), in the 2006/07 agricultural year, presenting as geographic coordinates 22° 42' 9" south latitude and 47° 38' 30" west longitude and 540 m asl. The climate in the region is classified, according to Koeppen, as Cwa, characterized by a dry winter. The soil classified as Barrento, clayey lime subclass, pH 4.8 (CaCl<sub>2</sub>); M.O. : 3.9%; P: 130 mg / dm<sup>-3</sup>; K: 2.2; Ca: 29; Mg: 9; H + Al: 47; SB: 40.2; CTC: 87.2 mmolc / dm<sup>3</sup> and V: 46.1%.

The experimental design was randomized blocks with 10 treatments and 4 replications. The genetically modified soybean cultivar used was BRS-Valiosa RR, recommended for the state of São Paulo. Sowing was performed on 12/28/06, at

a density of 14 to 18 linear plants per meter and spacing of 0.5 m between rows. The treatments consisted of glyphosate Roundup Ready® commercial product containing 480 g L<sup>-1</sup> acid equivalent and chlorimuron-ethyl Classic® commercial product containing 80 g kg<sup>-1</sup> active ingredient applied once and alone (1.5; 2, 0 and 80 L or g ha<sup>-1</sup> pc), glyphosate mixed with chlorimuron-ethyl (1.5 + 10 and 2.0 + 10 L or g ha<sup>-1</sup> pc) and sequentially (1.5 / 1.5, 2.0 / 1.5 and 2.0 / 1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup> pc), in addition to weeded (clean) and non-weeded (bush) controls. For the treatment 80 g.ha<sup>-1</sup> of chlorimuron-ethyl was added to 0.05% v / v mineral oil spray solution.

Prior to the application of the treatments, weed identification and counting surveys were made within the useful area of each plot using the 0.5 m<sup>-2</sup> inventory method. Glyphosate and chlorimuron-ethyl herbicides were applied once and alone and glyphosate mixed with chlorimuron-ethyl were carried out on 01/19/07, 14 days after emergence (DAE) of soybean (01/05) at the phenological stage. V2, according to the classification of Fehr et al. (1971). The applications glyphosate sequences were performed with a 15 day interval between the applications being the second and third, carried out on 02/02 and 17/02 and soybean in V5 and V8 phenological stages, respectively.

The herbicides were always applied in the morning and without wind to prevent drift, with the aid of a constant pressure (CO<sub>2</sub>) costal sprayer, set to 300 L ha<sup>-1</sup> spray volume and bar equipped with fan spray tips (110 ° - SF - 05). The control was evaluated in *Bidens pilosa* (black prick) and *Euphorbia heterophylla* (dairy), manually sown within the useful area of each plot, with an average density of 223 and 34 individuals m<sup>-2</sup> of *Bidens pilosa* and *Euphorbia heterophylla*, respectively.

The experimental plots consisted of 6 lines of 5.0 m in length, with 4 repetitions. The useful area was the 4 central lines with 4.0 m in length, with 0.5 m at each end of the plot.

**a) Herbicide efficacy:** percentage of species control within the useful area of each plot at 7, 14, 28 and 42 days after herbicide application, obtained by the initial counting of the number of weeds and remnants. by species; **b) Phytotoxicity of herbicides in soybean:** evaluated by visually assigned grades, always comparing with control, by the EWRC (1964) scale also at 7, 14, 28 and 42 days after herbicide application; **c) Plant density and height:** the number of plants per linear meter was determined by counting plants sampled in two 1.0 meter rows within the useful area of each plot and the height of 10 plants randomly sampled at 42 DAT; **d) Grain yield:** determined by harvesting 4.0 m long central lines of soybean plants within the useful area of each plot, with moisture corrected to 13% (wet basis); **e) Seed germination:** Soybean seeds were harvested, tracked and for the germination test three subsamples of 50 seeds were collected in each treatment, totaling twelve replications. The test was performed on a Germitest paper towel roll moistened with water equivalent to

2.5 times the weight of the dried substrate and placed in plastic containers. After this procedure the plastic containers were placed in a walking germination (WG) type germinator, which were kept in a chamber at a constant temperature of 25 ° C. Evaluations were performed on the fifth day after the test installation, according to the criteria of Brazil (1992) and the result expressed as a percentage of normal seedlings.

Density, plant height and yield data were subjected to analysis of variance and F test by the SANEST program. For the significant analyzes it was performed the comparison between means by Tukey test at 5% probability

## RESULTS AND DISCUSSION

As can be seen in Figure 1, the percentage of control of the studied species was above 90% when compared to the control (Figure 22), thus being considered susceptible to treatments with chlorimuron-ethyl alone at a dose of 80 g ha<sup>-1</sup> (see Figure 15) glyphosate applied once and alone at doses 1.5 and 2.0 L ha<sup>-1</sup> pc, glyphosate mixed with chlorimuron-ethyl at doses of 1.5 + 10 and 2.0 + 10 L or g ha<sup>-1</sup> from pc and glyphosate applied sequentially at 1.5 / 1.5 doses; 2.0 / 1.5 and 2.0 / 1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup> of p.c .. See Figures 13 to 19.

Thus in conventionally cultivated soybean areas where there are failures of resistance control of *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa* biotypes to ALS inhibitor herbicides, found by researchers (VIDAL et al. 2004; RIZZARDI, 2002; CHRISTOFFOLETI, 2002; OLIVEIRA et al., 2002; VARGAS et al., 2001; CHRISTOFFOLETI, 1999; VIDAL & MEROTTO, 1999; PONCHIO, 1997), the genetically modified soybean production system, allows glyphosate to be a new alternative chemical management by rotation herbicide with another mechanism of action (EPSPs).

In the treatment with chlorimuron-ethyl at a dose of 80 g ha<sup>-1</sup> of p.c., the herbicide was not interesting because it did not control over 75% for weeds. Perhaps noting the difficulty of controlling the herbicide to these species according to research already cited (VIDAL et al. 2004; RIZZARDI, 2002; CHRISTOFFOLETI, 2002; OLIVEIRA et al., 2002; VARGAS et al., 2001; CHRISTOFFOLETI, 1999; VIDAL & MEROTTO, 1999; PONCHIO, 1997).

Table 1 shows the variance analysis data and average values of density, plant height and soybean yield. Density is within the limits recommended by EMBRAPA 2005. Herbicides did not significantly affect plant height and yield. The highest yield of treatments (1.956 kg ha<sup>-1</sup>) was found to be the mixture of glyphosate with chlorimuron-ethyl (2.0 + 10) as this has a residual effect, giving conditions for the culture to close without the presence of consequently expressing their maximum

yield potential by reducing weed competition and reinfestation in the critical period. Mixing glyphosate with chlorimuron-ethyl, ALS inhibitor, has also been shown to be effective in desiccating *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa* (CARVALHO et al., 2003; VALENTE and ORNELAS, 2000; CARVALHO and CAVAZZANA, 2000) in a planting system soybean crop.

Genetically modified soybean plants well supported the sequential glyphosate applications, as demonstrated by the average yield of 1.924 kg ha<sup>-1</sup> in the plots where 3 herbicide applications were made at doses of 2.0 / 1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup> (treatment 8). The lowest yield (760 kg ha<sup>-1</sup>) was obtained in non-weeding control (dirty), demonstrating a relative loss of 72.3% of grain loss compared to weeded control (2.175 kg ha<sup>-1</sup>) and from 57.7; 59.8; 59.4; 58.1; 61.1; 58.8; 58.9; 60.4% for treatments 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively, proving the aggressiveness of *Bidens pilosa* and *Euphorbia heterophylla* in soybean yield losses and herbicide efficacy in this system agricultural production.

The seeds obtained 74% in average of germination. As can be seen in Table 2, herbicides did not significantly influence germination, resulting in: 79.7; 79.5; 76.5; 74.5; 72.8; 72.5; 72.0; 70.5; 70.5% respectively for: control, chlorimuron ethyl (80 g ha<sup>-1</sup>), sequentially applied glyphosate (2.0 / 1.5 / 1.5; 2.0 / 1.5 and 1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup> pc), glyphosate applied once and alone (1.5 and 2.0 g ha<sup>-1</sup> pc), glyphosate mixed with chlorimuron-ethyl (1.5 + 10 and 2.0 + 10 L or g ha<sup>-1</sup> pc), see Figures 2 to 10.

However, genetically modified soybean seeds did not have sufficient germination for commercialization, as they were considered to be of low physiological quality, since the germination capacity of a seed lot under laboratory conditions must be higher than 80% to obtain a good field stand (THOMPSON, 1968; WILCOX et al. 1974; MARCOS FILHO, 1980).

## CONCLUSIONS

There were no visual injuries in soybean crop and no significant reduction in grain yield and seed germination due to the treatments tested. All glyphosate treatments had control over 90% for *Bidens pilosa* and *Euphorbia heterophylla*.

## REFERÊNCIAS

BLANCO, H.G. et al. Observações sobre o período em que as plantas daninhas competem com a soja (*Glycine max*). **O Biológico**, v. 39, p. 31-35, 1973.

BRAZ, B.A.; DURIGAN, J.C. Redução de espaçamento e subdoses de herbicidas aplicados em pós-emergência, para controle de plantas daninhas, em soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 19., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina:SBCPD, 1993. p. 96-97.

CARVALHO, F.T.; CAVAZZANA, M.A. Eficácia de herbicidas no manejo de plantas daninhas para o

plantio direto de soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, p. 167-172, 2000.

CARVALHO, F.T.; PEREIRA, F.A.R.; PERUCHI, M.; PALAZZO, R.R.B. Manejo químico das plantas daninhas *Euphorbia heterophylla* e *Bidens pilosa* em sistema de plantio direto da cultura de soja. **Planta Daninha**, v. 21, p. 145-150, 2003.

CARVALHO, F.T.; VELINI, E.D. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura da soja. I-cultivar IAC-11. **Planta Daninha**, v. 19, p. 317-322, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose - resposta de biótipos resistentes e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 513-519, 2002.

DURIGAN, J.C. et al. Períodos de matocompetição na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivares Santa Rosa e IAC-2. I-Efeitos sob parâmetro da produção. **Planta Daninha**, v. 1, p. 86-100, 1983.

EMBRAPA, 2005. [http://www.cnpsolembrapa.br/download/pdf/cultivares\\_2005.pdf](http://www.cnpsolembrapa.br/download/pdf/cultivares_2005.pdf).

EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL - EWRC. Cite of methods in weed research. **Weed Research**. v.4, p.88, 1964.

FEHR, W.E. et al. Stage of development descriptons for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-31, 1971.

GONZINI, L.C.; HART, S.E. Effect of row spacing on weed control in glyphosate-tolerant soybean. **Weed Science Society of America**, v. 37, p. 3-6, 1997.

HARPER, D.R. Roundup-Ready Soybeans. **Weed Science Society of America**, v. 36, p. 5-8, 1996.

JEZOVSEK, G.K. Uma nova proposta para o controle das ervas daninhas: o uso de plantas transgênicas. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1, Dourados, 1997. **Simpósio sobre herbicidas e plantas daninhas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. p. 62-74.

LORENZI, H.J. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 5.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 339 p.

MEDLIN, C.R.; SHAW, D.R.; SCOTT, R.C. Herbicide tank mix conmbinations for weed control in Roundup-Ready soybean. **Weed Science Society of America**, v. 37, p. 3-6, 1997.

NELSON, K.A; RENNER, K.A. Soybean growth and development as affected by glyphosate and postemergence herbicide tank mixtures. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 428-434, 2001.

OLIVEIRA, M.F. et al. Atividade da acetolactato sintase de plantas de milho e de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetíveis ao imazaquin. **Planta Daninha**, v.20, p.77-82, 2002.

PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* (L.) a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. 1997. 120 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba, 1997.

RISSI, R.; SOUZA, J.; MORO, G. Biotecnologia cria a nova agricultura. **Seed News**, n. 1, p. 30-35, set. 1997.

RIZZARDI, M.A. et al. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 20, p. 149-158, 2002.

SPADOTTO, C.A. et al. Determinação do período crítico para prevenção da interferência de plantas daninhas na cultura da soja: uso do modelo "Broken-Stick". **Planta Daninha**, v.12, p.59-62, 1994.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v.19, p.331-336, 2001.

VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr., A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima acetolactase sintase. **Planta Daninha**, v. 17, p.367-373, 1999.

VIDAL, R.A. et al. A field survey of crop management practices and distribution of ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in southern brazil. **Planta Daninha**, v. 22, p. 403-410, 2004.

WEBSTER, E.P.; SHAW, D.R.; MURPHY, G.P. The Potential of a Postemergence Weed Control Program for Roundup-Ready Soybean. **Weed Science Society of America**, v. 36, p. 5-8, 1996.

VALENTE, T.O.; ORNELAS, A. Efeito residual de chlorimuron-ethyl aplicado em mistura com glyphosate na dessecação em condições de cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 22., 2000, Foz de Iguaçu-PR. **Resumos...** Londrina:SBCPD, 2000. p.117.

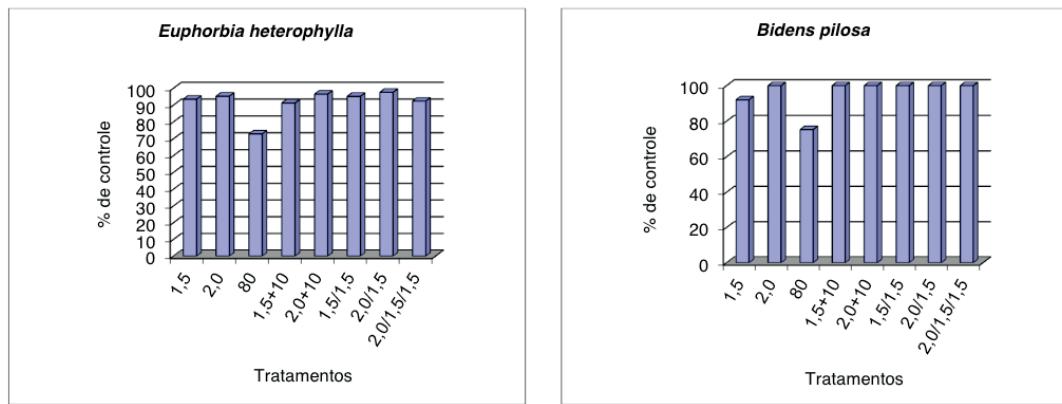


Figure 1 - Control percentage of *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa* as a function of glyphosate and chlorimuron-ethyl application at 7 DAT.

Tratamentos (Doses L ou g.ha <sup>-1</sup> )	Densidade (pl/m)	Altura de plantas (cm)	Produção (kg.ha <sup>-1</sup> )
1 - glyphosate (1,5)	18 a	76,8 a	1796 a
2 - glyphosate (2,0)	15 a	68,9 a	1893 a
3 - chlorimuron-ethyl (80)	17 a	72,5 a	1875 a
4 - glyphosate + chlorimuron-ethyl (1,5+10)	15 a	74,9 a	1814 a
5 - glyphosate + chlorimuron-ethyl (2,0+10)	18 a	71,0 a	1956 a
6 - glyphosate / glyphosate (1,5/1,5)	14 a	71,0 a	1956 a
7 - glyphosate / glyphosate (2,0/1,5)	14 a	73,0 a	1846 a
8 - glyphosate / glyphosate / glyphosate (2,0/1,5/1,5)	14 a	69,0 a	1853 a
9 - Witness in the clean (weeding)	17 a	71,6 a	2175 a
10 - Witness in the dirty (no weeding)	16 a	69,4 a	760 b
Teste F		0,29543 <sup>ns</sup>	0,6371 <sup>ns</sup>
DMS Tukey (5%)		7	15,50
C.V. (%)		17,2	8,9

Table 1. Analysis of variance data and average values of density, plant height and soybean yield<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by Tukey test at 5% probability

Tratamentos (Rates L ou g.ha <sup>-1</sup> )	Germination (%)
1 - glyphosate (1,5)	72,5 a
2 - glyphosate (2,0)	72,0 a
3 - chlorimuron-ethyl (80)	79,5 a
4 - glyphosate + chlorimuron-ethyl (1,5+10)	70,5 a
5 - glyphosate + chlorimuron-ethyl (2,0+10)	70,5 a
6 - glyphosate / glyphosate (1,5/1,5)	72,8 a
7 - glyphosate / glyphosate (2,0/1,5)	74,5 a
8 - glyphosate / glyphosate / glyphosate (2,0/1,5/1,5)	76,5 a
9 - Witness in the clean (weeding)	79,7 a
Teste F	12,1
DMS Duncan (5%)	0,0051
C.V. (%)	8,9

Table 2. Herbicide treatments and seed germination average values.

<sup>1</sup>Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Duncan Test at the 5% probability level.



Figure 2 - Glyphosate (1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 3 - Glyphosate (2,0 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 4 - Chlorimuron-ethyl (80 g. ha<sup>-1</sup>).



Figure 5 - Glyphosate +chlorimuron-ethyl (1,5 +10 L ou g. ha<sup>-1</sup>).



Figure 6 – Glyphosate +chlorimuron-ethyl (2,0 +10 L ou g.ha<sup>-1</sup>).



Figure 7 – Sequential glyphosate application (1,5 / 1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 8 – Sequential glyphosate application (2,0 / 1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 9 – Glyphosate (2,0 / 1,5 / 1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 10 – Witness, no weeding



Figure 11 – Results of single application of glyphosate ( $1,5 \text{ L.ha}^{-1}$ ).



Figure 12 - Results of single application of glyphosate ( $2.0 \text{ L ha}^{-1}$ ).



Figure 13 - Results of chlorimuron-ethyl application (80 g ha<sup>-1</sup>).



Figure 14 - Results of glyphosate + chlorimuron-ethyl mixture (1.5 + 10 L or g ha<sup>-1</sup>).



Figure 15 - Results of glyphosate + chlorimuron-ethyl mixture (2.0 +10 L or g ha<sup>-1</sup>).



Figure 16 - Results of sequential glyphosate application (1.5 / 1.5 L ha<sup>-1</sup>).



Figure 17 – Results of sequential glyphosate application (2,0 / 1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 18 – Results of sequential glyphosate application (2,0 / 1,5 / 1,5 L.ha<sup>-1</sup>).



Figure 19 – Witness weeding



Figure 20 – Witness no weeding

## CITOQUÍMICA E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Theobroma speciosum* WILLD. EX Spreng (Malvaceae)

Data de aceite: 12/12/2019

### **Uéliton Alves de Oliveira**

Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal -  
LMGV  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro - UENF  
Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

### **Alex Souza Rodrigues**

Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal -  
LMGV  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro – UENF  
Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

### **Elisa dos Santos Cardoso**

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular - GenBioMol  
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Programa  
de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia (PPG-Bionorte), Alta Floresta, Mato  
Grosso.

### **Eliane Cristina Moreno de Pedri**

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular - GenBioMol  
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Programa  
de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia (PPG-Bionorte), Alta Floresta, Mato  
Grosso.

### **Juliana de Freitas Encinas Dardengo**

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular - GenBioMol  
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Programa  
de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia (PPG-Bionorte), Alta Floresta, Mato  
Grosso.

### **Patrícia Ana de Souza Fagundes**

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular - GenBioMol  
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Faculdade  
de Ciências Biológicas e Agrárias, Curso de  
Ciências Biológicas, Alta Floresta, Mato Grosso.

### **Rosimeire Barboza Bispo**

Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal -  
LMGV  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro - UENF  
Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

### **Ana Aparecida Bandini Rossi**

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular - GenBioMol  
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), Faculdade  
de Ciências Biológicas e Agrárias, Curso de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação  
em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-  
Bionorte), Programa de Pós-Graduação em  
Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos  
(PPGBioAgro) e Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP).

**RESUMO:** O gênero *Theobroma* é tipicamente neotropical, sendo que no Brasil são encontradas 13 espécies, das quais cinco são endêmicas. Nesse gênero destaca-se a espécie *Theobroma speciosum*, popularmente denominada como cacaú, uma espécie nativa encontrada na região amazônica, pouco conhecida e estudada, cuja variabilidade genética tem sido afetada devido aos impactos ambientais resultantes da fragmentação florestal. Estudos de citoquímica e viabilidade polínica são importantes para o melhoramento de plantas, pois refletem a potencialidade do gameta masculino e assim a eficiência da fecundação e posterior fertilização. Neste contexto, objetivou-se, com esta pesquisa, estimar a citoquímica e a viabilidade polínica em espécimes de uma população nativa de *T. speciosum* utilizando testes colorimétricos. Para tanto, foram coletados botões florais em pré antese e antese em diferentes pontos amostrais, em um fragmento florestal no perímetro urbano do município de Alta Floresta-MT. A estimativa da viabilidade polínica foi analisada utilizando o reativo de Alexander e carmim acético 2% e para a citoquímica, os corantes sudan IV e lugol. Os dados da viabilidade foram submetidos a análise de variância utilizando o modelo linear generalizado (GLM) indicado para dados de distribuição binomial, com auxílio do programa R. Os corantes e reagentes utilizados na análise citoquímica e da viabilidade foram eficientes na identificação das substâncias de reserva e na distinção de polens viáveis e inviáveis, apresentando alta taxa de viabilidade e elevada percentagem de amido e lipídios como substâncias de reserva dos grãos de pólen de *T. speciosum*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cacaú, Fertilidade, Melhoramento genético.

## CYTOCHEMISTRY AND POLLEN VIABILITY OF *Theobroma speciosum* WILLD. EX SPRENG (MALVACEAE)

**ABSTRACT:** The genus *Theobroma* is typically neotropical, and in Brazil there are 13 species, of which five are endemic. In this genus stands out the species *Theobroma speciosum*, popularly termed as cacaú, a native species found in the Amazon region, little known and studied, whose genetic variability has been affected due to environmental impacts resulting from forest fragmentation. Studies of cytochemistry and pollen viability are important for plant breeding, as they reflect the potentiality of male gamete, fertilization efficiency and subsequent fertilization. In this context, this research aimed to estimate the cytochemistry and pollen viability of a native population of *T. speciosum* using stains tests. For this purpose, pre-anthesis flower buds were collected at different sampling points, located in a forest fragment in the urban perimeter of Alta Floresta-MT. An estimate of pollen viability was analyzed using reactive Alexander's stain and acetocarmine 2% stain and for cytochemistry, the stains sudan IV and lugol. The viability data were subjected to analysis of variance using the generalized linear model (GLM) indicated for binomial distribution data, with the aid of the R program. The stains and reagents used in the cytochemical and viability analysis were efficient in identifying the reserve substances and in distinguishing viable and unfeasible pollens, presenting high viability rate and high percentage of starch and lipids as pollen grain reserve substances of *T. speciosum*.

## 1 | INTRODUÇÃO

A família Malvaceae apresenta uma distribuição predominantemente pantropical e abrange cerca de 243 gêneros e 4.225 espécies (MOBOT, 2019). Dentro dessa família, encontra-se o gênero *Theobroma*, tipicamente neotropical, representado no Brasil por 13 espécies, das quais cinco são endêmicas (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019). Nesse gênero destaca-se a espécie *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., conhecida popularmente como cacauí.

O *T. speciosum* é uma espécie nativa da floresta Amazônica (DUCKE, 1953), sendo uma árvore de porte ereto, troncos cilíndricos e lenhosos, onde, desde a base, se inserem as densas e aglomeradas inflorescências multifloras, de coloração vermelho-púrpura, que se destacam na paisagem florestal. É uma planta nativa, pouco conhecida e estudada, encontrada principalmente na região amazônica e que sofre erosão genética em decorrência da mudança no uso da terra, principalmente, devido à substituição de parte da floresta por pastagem (SILVA et al., 2004; RONDÓN, 2005; CUMANA CAMPOS, 2005).

É uma espécie importante para animais selvagens e também para as populações humanas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; BALÉE, 1994; DEWALT et al., 1999), uma vez que, seus frutos são comestíveis, sendo fonte de nutrientes principalmente para as populações da região amazônica (BALÉE, 1994; DEWALT et al., 1999). Trata-se também de uma espécie com grande potencial para o melhoramento genético, uma vez que podem servir como fonte de variabilidade genética de espécies relacionadas, tais como *Theobroma cacau* que são explorados economicamente (DARDENGO et al., 2016).

A viabilidade do grão de pólen pode ser determinada por várias técnicas, sendo estas agrupadas em métodos diretos, tais como, a germinação *in vitro* (KUMARI et al., 2015; SOUZA et al., 2015) e em germinação *in vivo* (SOUZA et al., 2015), ou em métodos indiretos, baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (KEARNS; INOUYE, 1993; KUMARI et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Os métodos indiretos são constantemente utilizados por serem simples, rápidos e baratos.

Espécies nativas constituem uma possível fonte de alelos desejáveis para programas de melhoramento genético e o estudo da citoquímica e viabilidade polínica das mesmas são importantes por refletir a potencialidade do gameta masculino, eficiência da fecundação e posterior fertilização (BIONDO; BATTISTIN, 2001).

A avaliação citoquímica evidencia qual ou quais são os componentes das substâncias de reserva nos grãos de pólen, sendo de extrema importância para o entendimento dos aspectos ecológicos relacionados a mecanismos de polinização

(OLIVEIRA; PIERRE, 2018). Estudos de citoquímica aliados aos de viabilidade dos grãos de pólen podem fornecer informações necessárias para o entendimento a respeito da propagação da espécie, portanto, auxiliando programas de melhoramento e conservação dos seus recursos genéticos. Neste contexto, objetivou-se, com esta pesquisa, estimar a citoquímica e a viabilidade polínica de uma população nativa de *T. speciosum* por meio de testes colorimétricos.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os botões florais em pré-antese e antese (Figura 1), foram coletados de oito indivíduos de uma população nativa, localizada em fragmento florestal no perímetro urbano no município de Alta Floresta, Mato Grosso, nas coordenadas 9°52'43.0"S 56°05'58.5"W. O material coletado foi levado ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) do CEPTAM (Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional) na Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Campus Universitário de Alta Floresta, onde foram realizados os testes de viabilidade polínica e citoquímica dos grãos de pólen. Para tanto, o material coletado foi imerso em solução fixadora de álcool absoluto: ácido acético na proporção de 3:1 por 24 horas e logo após transferidos para álcool 70% e mantidos a 4° C, até o uso.



Figura 1. Características da espécie *Theobroma speciosum*, indivíduo adulto: caule (A); copa (B) e inflorescência (C), onde os botões florais em pré-antese estão indicados pela seta pontilhada e em antese, pela seta inteira.

Foi feito um *Bulk* com os botões florais coletados dos oito indivíduos e, para estes, foram preparadas oito lâminas para a realização de cada teste colorimétrico. Para cada lâmina preparada foi utilizado um botão floral, cujo comprimento foi mensurado em (mm), com auxílio de paquímetro digital de precisão (Mitutoyo).

Para o preparo das lâminas foi utilizada a técnica de coloração seguida de

esmagamento, descrito por Guerra e Souza (2002). A estimativa da viabilidade polínica dos grãos de pólen foi comparada com base na reação de coloração dos corantes reativo de Alexander (ALEXANDER, 1980) e carmim acético 2% (PAGLIARINI; POZZOBON, 2004).

A observação dos grãos de pólen foi realizada por meio do método de varredura, onde, em cada lâmina foram contabilizados 250 grãos de pólen, perfazendo um total de 2000 grãos de pólen para cada corante. Assim a viabilidade polínica foi estimada por meio da percentagem de grãos de pólen viáveis obtidos pela equação (1):

$$Viabilidade\ do\ pólen\ (%) = \left( \frac{n^{\circ}\ de\ grãos\ corados}{n^{\circ}\ de\ grãos\ contados} \right) \times 100 \quad (1)$$

Para a avaliação da presença das substâncias de reserva dos grãos de pólen, foram empregadas técnicas citoquímicas (BAKER; BAKER, 1979). Com a utilização do corante lugol 2% é possível identificar no grão de pólen a presença ou ausência de amido e para o corante sudan IV é possível observar a presença e ausência de lipídios (DAFNI, 1992), sendo os grãos de pólen classificados como positivo (+) ou negativo (-) para estas substâncias. O modo de preparo das lâminas e observação dos grãos de pólen segue o mesmo procedimento da viabilidade polínica.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R, versão 3.5.3 (R\_Core Team, 2019), e os gráficos foram gerados no pacote de software ggplot2R (WICKHAM, 2009). Os dados da viabilidade e citoquímica foram avaliados utilizando o modelo linear generalizado (GLM) indicado para dados de distribuição binomial, sendo testados quanto a normalidade e homocedasticidade e submetidos a análise de variância, sendo significativos a 5% de probabilidade pelo teste do Qui-Quadrado.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os botões florais que apresentaram grãos de pólen maduros, mediram entre 9,64 e 10,99 mm, com uma média de 10,34 mm de comprimento. Os corantes e reagentes utilizados para a análise da viabilidade, assim como a análise citoquímica dos grãos de pólen de *T. speciosum* foram eficientes na distinção dos grãos de pólen viáveis e inviáveis, bem como para detecção da substância de reserva (Figura 2).

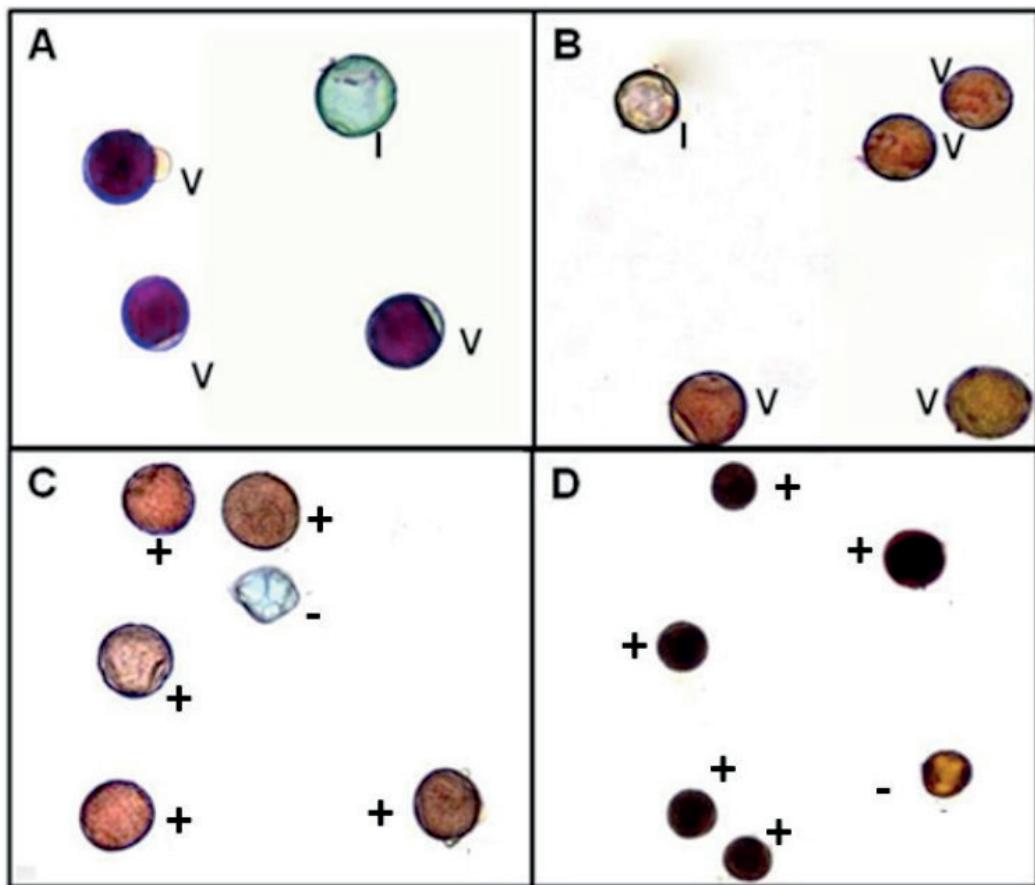


Figura 2. Polens viáveis (V) e inviáveis (I) de *Theobroma speciosum*. A: reativo de Alexander; B: carmim acético 2%; C: sudan IV - Polens lipídio (+) e lipídio (-); D: lugol - Polens amido (+) e amido (-)

A média de viabilidade polínica encontrada neste estudo foi superior a 97%, evidenciando que a espécie *T. speciosum* apresenta um padrão reprodutivo eficiente, uma vez que para a viabilidade polínica ser considerada alta seu valor deve estar  $\geq$  a 70% (SOUZA et al., 2002), enquanto os valores menores que 70% são considerados baixos e, consequentemente, resultam na infertilidade da espécie (BIONE et al., 2005).

Os corantes, carmim acético 2% e reativo de Alexander, utilizados para estimar a viabilidade polínica, apresentaram médias de polens viáveis de 98,65 e 97,7% respectivamente. A figura 3 representa a distribuição das viabilidade polínica, sendo que para o carmin acético, a viabilidade de sete das oito lâminas observadas variou entre 98,4% e 100%, com distribuição negativamente assimétrica e apresentando um *outlier*, cuja viabilidade foi de 97,6%; para o reativo de Alexander, a viabilidade variou entre 97,2% e 98,8%, com distribuição simétrica e um *outlier* onde a viabilidade foi de apenas 96%.

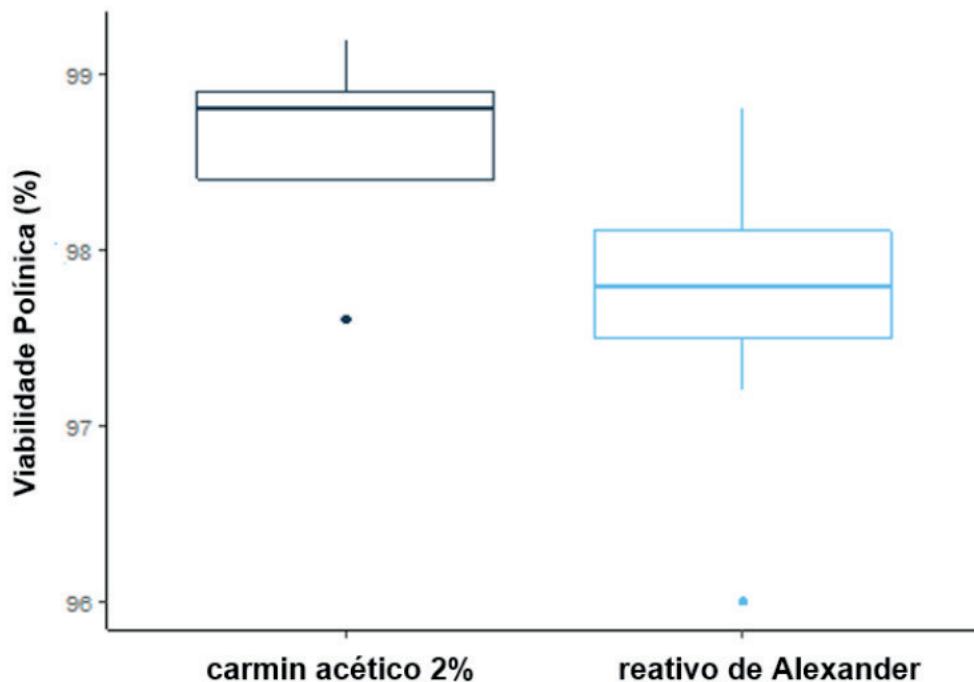


Figura 3. Boxplots da viabilidade dos grãos de pólen de *Theobroma speciosum*.

Estes dados indicam que a espécie *T. speciosum* possui um processo de microsporogênese regular e, consequentemente, ser utilizada em programas de melhoramento genético, visando a transmissão de possíveis alelos desejáveis, para as espécies comerciais, tais como o cacau e o cupuaçu, uma vez que se trata de uma espécie nativa adaptada a região (DARDENGO et al., 2016). O estudo da viabilidade polínica por horário para a espécie *T. speciosum*, realizado por Tramontin et al. (2019), concluiu que em todos os 24 horários avaliados, a espécie manteve uma alta taxa de viabilidade. Esse resultado permite inferir que a viabilidade não sofre com a mudança de temperatura em seu ambiente natural, logo, o horário de coleta dos botões florais não interfere no resultado da viabilidade polínica para espécie analisada.

O teste citoquímico indicou que grãos de pólen de *T. speciosum* apresentam tanto lipídios quanto amido como substâncias de reserva (Figura 2C e 2D). Os corantes utilizados, sudan IV e lugol, apresentaram valores médios de 99,65 e 98,60% respectivamente. A figura 4 representa a distribuição dos grãos de pólen que apresentam lipídios e amido como substância de reserva, sendo que grãos de pólen lipídio positivo variam entre 99,2% e 100%, com distribuição positivamente assimétrica enquanto os grãos de pólen amido positivo variaram entre 98% e 99,2%, com distribuição simétrica.

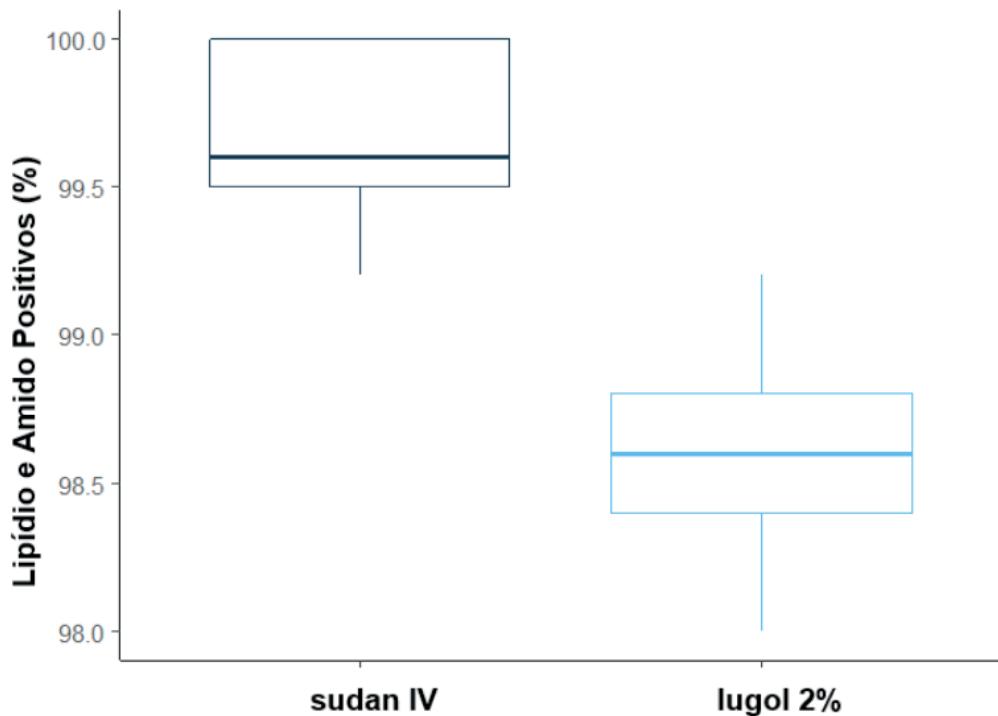


Figura 4. Boxplots da avaliação citoquímica dos grãos de pólen de *Theobroma speciosum*.

A presença de lipídios no grão de pólen é extremamente importante, pois este é um atrativo aos polinizadores, evitando a perda de água e mantendo os grãos de pólen unidos durante o transporte (WANG et al., 2004).

Estudos de viabilidade polínica são fundamentais, pois quanto maior a viabilidade, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, promovendo aumento da variabilidade genética que é imprescindível para a seleção de novos cultivares com características desejáveis. Os resultados encontrados nesta pesquisa são importantes para programas de melhoramento genético, considerando que o sucesso dos cruzamentos depende, dentre outros fatores, da escolha de acessos doadores de grão de pólen com alta fertilidade (SOUZA et al., 2002).

#### 4 | CONCLUSÃO

A avaliação da viabilidade polínica e os testes citoquímicos realizados neste estudo indicam que populações nativas de *Theobroma speciosum*, apresentam alta taxa de viabilidade e elevada percentagem de amido e lipídeos como substâncias de reserva.

#### REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, n. 1, p. 13–18, 1980.

BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 66, n. 5, p. 591–600, 1979.

BALÉE, W. **Footprints of the Forest – Ka'apor ethnobotany – the historical ecology of Plant Utilization by an Amazonian people**. Columbia University Press, 1994, 420p.

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas da região sul do Brasil. **Bioikos**, v. 15, n. 1, p. 39-44, 2001.

BIONE, N. C. P.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, L. A. A male-sterile mutation in soybean (*Glycine max*) affecting chromosome arrangement in metaphase plate and cytokinesis. **Biocell**, v. 29, n. 2, p.177-181, 2005.

DAFNI, A. **Pollination Ecology: A Practical Approach**. Oxford University Press. 1992, 250p.

DARDENGO, F. E. J.; ROSSI, A. A.; MEZZALIRA DA SILVA, B.; VIEIRA DA SILVA, I.; DA SILVA, C. J.; MAGNO, S. A. Diversity and spatial genetic structure of a natural population of *T. speciosum* (Malvaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biología Tropical**, v. 64, p. 1091-1099, 2016.

DEWALT, S. J.; BOURDY, G.; MICHEL, L. R. C.; QUENEVO, C. Ethnobotany of the Tacana: quantitative inventories of two permanent plots of northwestern Bolivia. **Economic Botany**, v. 53, n. 237-260, 1999.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Medicinal plants in the Amazon and Atlantic Forest**. UNESP, 2002, 604p.

DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. **Boletim Técnico Instituto Agronômico**, Campinas, v. 28, p. 1-20, 1953.

FLORA DO BRASIL. Malvaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB156>>. Acesso em: 03 out. 2019.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC, 2002, 131p.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado. 1993, 583p.

KUMARI, A.; PAPENFUS, H. B.; KULKARNI, M. G.; POŠTA, M.; VAN STADEN, J. Effect of smoke derivatives on in vitro pollen germination and pollen tube elongation of species from different plant families. **Plant Biology**, v. 17, p. 825-830, 2015. DOI: 10.1111/plb.12300.

MOBOT. **Malvaceae**. Disponível em: <[www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/)>. Acesso em: 06 ago. 2019.

OLIVEIRA, L. B. P.; PIERRE, P. M. O. Índice meiótico e palinologia de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC-Myrtaceae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 4, p. 481-490, 2018.DOI: 10.5965/223811711732018481

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília. **Anais**. Brasília, p. 24-41, 2004.

R Core Team (2019). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RONDÓN, J. B.; CUMANA CAMPOS, L. J. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculiaceae) en Venezuela. **Acta Botánica Venezolana**, v. 28, n. 1, p. 113-134, 2005.

SILVA, C. R. S.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma L.* collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. **Acta botanica brasiliaca**, v. 18, n. 2, p. 333-341, 2004. DOI: 10.1590/S0102-33062004000200012

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; LEDO CAS; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015. DOI 10.1007/s10681-014-1273-3

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

TRAMONTIN, M. J.; SANTOS, L. L.; PEDRI, E. C. M.; DARDENGO, J. F. E.; ROSSI, A. A. B. Biologia floral de *Theobroma speciosum* Willd ex Spreng., uma Malvaceae nativa da Amazônia Brasileira. **Encyclopédia Biosfera**, v. 16, n.9, p. 1911-1923, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio\_2019A137

WANG, Y. Q.; ZHANG, D. X.; CHEN, Z. Y. Pollen Histochemistry and Pollen: Ovule Ratios in Zingiberaceae. **Annals of Botany**, v. 94, p. 583-591. 2004.

WICKHAM, H. **Gráficos elegantes para análise de dados**. Nova York: Springer (ggplot2), 2009.

## COMO ISOLAR PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS: UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 28/10/2019

### Ivina Barbosa de Oliveira

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-  
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1876790483636590>

### Carlos Priminho Pirovani

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-  
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9615448923708075>

### Karina Peres Gramacho

Centro de Pesquisa do Cacau, Ceplac/Cepec  
Itabuna- Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2851798514812201>

### Juliano Oliveira Santana

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-  
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0727141351971158>

a defesa contra estresses bióticos e abióticos a transporte de hormônios e água. O fluido apoplástico (FA), o líquido do apoplasto, possui substâncias essenciais para o desenvolvimento do vegetal. A obtenção do FA é desafiadora, porém sua investigação poderá ajudar a compreender as respostas de defesas da planta e por outro lado, as respostas do patógeno em sobrepor estas defesas na interação planta-patógeno. Para tanto, faz-se necessário o uso de protocolos específicos que evitem acúmulo de contaminantes e favoreça rendimentos consideráveis para seu estudo. Sendo assim, neste capítulo descrevemos uma metodologia para obtenção de FA de folhas de cacau livre de contaminação citoplasmática por meio de infiltração a vácuo seguida de centrifugação e, extração de proteínas a partir do FA, por meio de SDS-denso e fenol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Folha, proteômica, cacau, espaço intercelular

### HOW TO ISOLATE APOPLASTIC PROTEINS: A RESEARCH STRATEGY OF THE PLANT-PATHOGEN INTERACTION

**ABSTRACT:** The apoplast is a vegetal compartment that comprises the intercellular spaces and the cell wall. This space is of great importance to the plant from defense against biotic and abiotic stresses to transport

**RESUMO:** O apoplasto é um compartimento vegetal que compreende os espaços intercelulares e a parede celular. Este espaço possui grande importância para a planta desde

of hormones and water. Apoplastic fluid (FA) has essential substances for plant development. Obtaining FA is challenging, but your research may help to understand plant defense responses and pathogen responses to override these defenses in plant-pathogen interaction. Therefore, it is necessary to use specific protocols that avoid contaminant accumulation and favour considerable yields for its study. Thus, in this chapter we describe a methodology for obtaining FA from cocoa leaves without cytoplasmic contamination by vacuum infiltration followed by centrifugation and protein extraction from FA by dense SDS-phenol.

**KEYWORDS:** Leaf, proteomics, cocoa, intercellular space.

## 1 | INTRODUÇÃO

O apoplasto é um compartimento de extrema importância para o vegetal, que compreende os espaços extracelulares, incluindo a parede celular (DIETZ, 1997; DANI et. al., 2005; SADAVA, et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010). Este compartimento desempenha diferentes funções desde transporte de hormônios relacionados ao desenvolvimento e crescimento a reconhecimento de invasores patogênicos, por meio de proteínas presentes neste espaço (AGRAWAL et. al., 2010; DELANOIS et al., 2014). O apoplasto está envolvido em diversas respostas do ambiente, como na sinalização e reconhecimento de patógenos, assim faz deste espaço um sistema dinâmico, sendo essencial na indução de uma cascata de respostas contra importantes fitopatógenos (ZHANG et. al., 2009; LI et al., 2016).

O líquido que circunda o apoplasto é rico em substâncias como açucares, água, íons, proteínas dentre outras, formando o fluido apoplástico (FA) e sua obtenção ainda é desafiadora. Para extrair e investigar o conteúdo apoplástico exige evitar a contaminação citoplasmática, ou seja, um protocolo ideal para que a contaminação com produtos intracelulares, devido o rompimento foliar parcial, seja insignificante. Sendo assim, as proteínas apoplásticas ainda são poucos caracterizadas (LEE et al., 2004; DELANOIS et. al., 2014). Além do mais, a concentração de proteínas no apoplasto é inferior a presente intracelularmente e, consequentemente torna o processo de identificação ainda mais desafiador (QUIRINO et al., 2010).

O protocolo de infiltração-centrifugação para folhas de cacau (*Theobroma cacao*) foi testado e otimizado por Pirovani et al. (2008). É uma metodologia, de uma forma geral, simples, porém exige boas condições experimentais para o sucesso da obtenção de FA com contaminação citoplasmática insignificante.

*Theobroma cacao* é uma planta lenhosa que originou-se na América do Sul (MOTAMAYOR et al., 2002; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018) e pode ser dividida em três grandes grupos de acordo com características morfológicas, genéticas e localização geográfica (FERREIRA et al., 2014).

Suas amêndoas são a principal matéria-prima para a produção do chocolate e, com isso possui grande importância econômica e social, principalmente, para o sul da Bahia, onde esta cultura teve seu ápice no final do século XIX (COSTA; SOARES, 2016). Em contrapartida, a produção das amêndoas de cacau sofreu um declínio drástico com a chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa (ROCHA, 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

Entendendo a importância e o papel do apoplastro para planta e conhecendo as dificuldades em obter conteúdo de um espaço subcelular, este trabalho tem como finalidade entender como é feita a investigação do conteúdo apoplástico, mais precisamente como obter proteínas presentes neste espaço. Sendo assim, propomos de forma simples e reproduzível, uma metodologia testada e validada para folhas maduras de cacau.

## 2 | O APOPLASTO

O termo apoplastro foi criado pelo cientista alemão Ernst Münch em 1930 para descrever o compartimento de transporte de água no interior do vegetal (SAKURAI, 1998). Mais tarde, descobriu-se que o apoplastro, além de transportar água, desempenha um importante papel na fisiologia e desenvolvimento do vegetal por conter produtos relacionados ao desenvolvimento e à tolerância a estresses ambientais (AGRAWAL et. al., 2010).

De uma forma geral, a planta pode ser dividida basicamente em um compartimento intracelular ou simplasto e extracelular ou apoplastro (De ALMEIDA, 2001) que constitui os espaços intercelulares e a parede celular (Figura 01) (DIETZ, 1997; DANI et. al., 2005; SADAVA, et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O apoplastro desempenha um papel importante e crítico na interação da planta com o ambiente, pois a planta libera produtos essenciais neste compartimento como proteínas, enzimas, metabólitos e outras substâncias constituindo assim, o fluido apoplástico (FA) (ZHANG et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O FA flui constantemente no apoplastro facilitando o transporte de substâncias, as quais podem ser constitutivamente expressas ou induzidas, como algumas proteínas que são produzidas somente como parte da imunidade inata da planta (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et. al., 2014). As proteínas extracelulares podem estar solúveis no FA ou ligadas à matriz celular da planta (RAMANJULU et al., 1999; SOARES et al., 2007).

Assim, o apoplastro está envolvido em outras funções importantes para o vegetal como regulação de crescimento, manutenção da parede celular, rota de transporte, homeostase, adesão célula a célula, trocas gasosas e em processos envolvidos na defesa a estresse biótico e abiótico e contra a dessecação (SAKURAI, 1998;

SATTELMACHER, 2001; DELANOIS et al., 2014). Diante disto, a importância do apoplastro para a planta pode ser comparada com a importância do interior do nosso corpo, que consiste em sangue, linfa e fluido de tecido tonando um compartimento especial para o funcionamento das células (SACURAI, 1998).

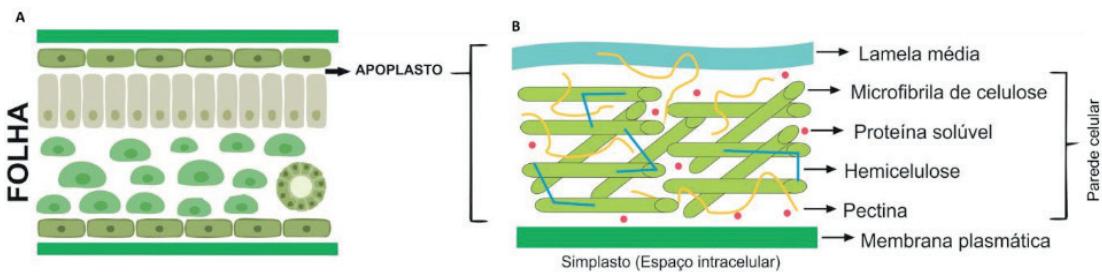


Figura 01: **Representação esquemática do apoplastro.** A: Folha vegetal destacando os espaços intercelulares ou apoplastro. B: O apoplastro compreende o espaço externo à membrana plasmática até a lamela média.

### 3 | APOPLASTO E O RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS

As plantas estão expostas a vários fatores bióticos na natureza, como a diversas classes de microrganismos fitopatogênicos, tais como, nematoides, fungos, bactérias e insetos. Assim, em função da incapacidade de locomoção, as plantas evoluíram mecanismos de defesa para driblar e evitar a entrada de invasores, contornando situações desfavoráveis e, com isso, garantindo a sua sobrevivência (AGRIOS, 1997; PIETERSE et al., 2005; MELLO; SILVA-FILHO, 2002; MENOSSI et al., 2008). Apesar das plantas serem incapazes de esconder ou escapar de ataques de patógenos e não possuírem um sistema de defesa imune como os animais, elas podem reconhecer a presença de patógenos e preparar respostas de defesa que garanta o crescimento vegetativo diminuindo os danos causados pelo invasor (OSBOURN, 2001; NÜRNBERGER et al., 2004; CHISHOLM et al., 2006; DALIO, 2013).

O patógeno ao conseguir penetrar nos tecidos da planta estará sujeito ao reconhecimento na membrana plasmática (NÜRNBERGER et al., 2004) e para o seu estabelecimento é preciso atravessar o apoplastro local onde, importantes reações e processos regulatórios ocorrem de forma natural ou são induzidas devido ao reconhecimento do patógeno (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Esse reconhecimento ocorre por meio de sensores apoplásticos chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são proteínas transmembranas conservadas com domínio extracelular rica em leucina (LRRs) ou motivo de lisina (Lysm) e um domínio de quinase intracelular (JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). As PRRs se localizam geralmente na superfície da membrana celular e reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (MAMPs ou

PAMPs), conhecidos como elicitores, tais como a quitina, um componente da parede celular dos fungos ou flagelina bacteriana. Após esse reconhecimento inicial, leva à imunidade desencadeada pelo MAMP (PTI) acionando as defesas basais da planta (BOLLER; FELIX, 2009; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018), como mudanças na composição da parede celular e acúmulo de compostos antimicrobianos (DOEHELMANN; HEMETSBERGER, 2013). Algumas moléculas provenientes da própria planta também podem ser reconhecidas pelas PRRs desencadeando respostas imunes, as chamadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como moléculas liberadas devido a danos na parede celular. Patógenos mais adaptados podem inibir a interação MAMP-PRR, secretando proteínas efetoras e suprimindo ou comprometendo o PTI e com isso, facilitando suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Por outro lado, essas moléculas efetoras também podem estimular a imunidade desencadeada por efetor (ETI) em plantas que possuem proteínas de resistência (R) resultando no segundo nível de defesa da planta (Figura 02) (DALIO, 2013; DOEHELMANN; HEMETSBERGER, 2013; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI et al., 2015; BOLLER; FELIX, 2009).

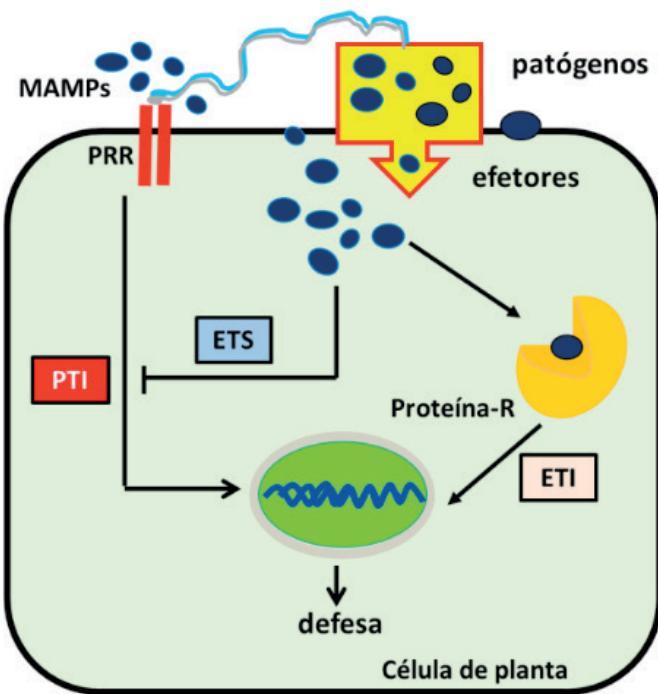


Figura 02: Reconhecimento do patógeno por meio de sensores apoplásticos do vegetal. PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões; MAMPs: Padrões Molecularmente Associados ao Patógeno; PTI: Imunidade Desencadeada pelo PAMP; ETS: Susceptibilidade Desencadeada por Efetores; ETI: Imunidade Desencadeada por Efetor. Adaptado de Kazan e Lyons (2014).

## 4 | PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS

As proteínas presentes no apoplasto são difíceis de ser isoladas, pois é necessário evitar a contaminação com compostos citoplasmáticos e a ruptura da parede celular. Sendo assim, ainda são proteínas pouco caracterizadas em comparação com as

intracelulares (DELANOIS et. al., 2014). A abordagem proteômica entra como uma ferramenta chave para caracterizar as proteínas presentes no FA e fornece maior entendimento nos processos de percepção e regulação que ocorrem na interação entre planta-patógeno (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et al., 2014).

A proteômica possibilita, além de caracterizar proteínas numa amostra, obter informações sobre processos ou respostas celulares envolvidas em determinado fenômeno ou condição biológica, incluindo a identificação simultânea de um grande número de proteínas e, consequentemente de novos genes e vias metabólicas, as quais são importantes para o entendimento da interação planta-patógeno, por exemplo (GUIMARÃES; RICARDO, 2015).

Para isolar o FA várias metodologias foram desenvolvidas: perfusão a vácuo em discos de folhas de mamona, girassol e repolho (BERNSTEIN, 1971); aplicação de pressão em folhas de algodão utilizando uma câmara de pressão umidificada (HARTUNG et al., 1987); o método de eluição em ervilha (LONG; WIDDER, 1990); método de infiltração-centrifugação em folhas de tabaco por Klement, em 1965 (RATHMELL; SEQUEIRA, 1974). Este último tem sido utilizado em alguns trabalhos, como em folhas de *Medicago truncatula* (SOARES et al., 2007), *Nicotiana tabacum* (DELANNOY et al., 2008) e em *Populus deltoides* (PECHANNOVA et al, 2010).

A infiltração é realizada a vácuo com uma solução apropriada, por isso o método é também conhecido como VIC (infiltração a vácuo). É importante realizá-lo em boas condições experimentais para evitar acúmulos de interferentes intracelulares e/ou não proteicos, como a força centrífuga baixa que resulta em contaminação insignificante e o tipo de solução de infiltração que melhore a solubilização das proteínas. Além disso, o correto manuseio e armazenamento pós recuperação do fluido, são procedimentos essenciais e adaptáveis para os diferentes tecidos e espécies de plantas (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Como foi testado por Lohausa et al. (2001) em diferentes espécies de planta (*Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* e *Zea mays*) e concluído que as condições de infiltração e centrifugação devem ser adaptadas para cada espécie, como o tipo de solução e o tempo utilizado para a infiltração e também a força de centrifugação, para evitar a contaminação citoplasmática (LOHAUSA et al., 2001).

É importante destacar que normalmente muitas proteínas que são secretadas para o espaço extracelular por meio do sistema Retículo Endoplasmático-Golgi, possuem peptídeo sinal (PS). Porém, sabe-se que muitas proteínas não dependem de um PS para ser transportadas na via secretora. Esse transporte é conhecido como secreção proteica não convencional (UPS: *Unconventional Protein Secretion*) (DING et al., 2012). Acredita-se que mais de 50% de proteínas sem PS são secretadas e possivelmente muitas delas que estão relacionadas a defesa/estresse no vegetal,

possuem atividade tanto intracelulares quanto extracelulares. Portanto, trabalhos que visam a extração de proteínas do apoplasto podem apresentar uma falsa contaminação citoplasmática (AGRAWAL et al., 2010). Diante disto, a extração de FA exige protocolos otimizados e cuidados metodológicos para cada espécie vegetal a ser estudada. Além disso, torna-se muito importante conciliar a técnica da biologia molecular com a bioinformática por meio da predição de localização das proteínas para verificar a credibilidade dos resultados obtidos pós extração.

## 5 | *Theobroma cacao X Moniliophthora perniciosa*

*Theobroma cacao* é uma planta lenhosa tropical que se originou na América do Sul (MOTAMAYOR et al., 2002; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). É uma espécie preferencialmente alógama (ALMEIDA; VALLE, 2007; FERREIRA et al., 2013) classificada na família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999).

A cultura do cacau possui grande importância econômica e social para o Brasil e para o mundo. As amêndoas de cacau são utilizadas para a produção do chocolate e uma gama de produtos, como o cacau em pó, manteiga de cacau, licor de chocolate, sorvetes e produtos de panificação (FERREIRA et al., 2013; BEG et al., 2017; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2008). O cacau também possui aplicações cosméticas e farmacêuticas (BEG et al., 2017). Além disso, na República Dominicana, bebidas de chocolate são utilizadas no tratamento de dores de garganta, anemia e doenças gastrointestinais; no Panamá alguns índios acreditam que a utilização de bebidas de chocolate evita a incidência de doenças cardíacas e de câncer (BEG et al., 2017). Além disso, sua casca é uma fonte rica de vitamina D. Por isso, a ingestão de chocolate (principalmente amargo) é recomendada de forma balanceada (BEG et al., 2017; GOYA et al., 2016; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018).

No Brasil, o cultivo de cacau impulsionou no século XVII, tendo o ápice no século XX quando liderou a produção mundial. No sul da Bahia, local de uma importante faixa de Mata Atlântica, o cacaueiro encontrou condições climáticas e solos ideais para a expansão do cultivo. O plantio de cacau no sul Bahia ocorre em um sistema denominado Cabruca, cultivo de cacau implantado no sub-bosque de forma descontínua e circundado por vegetação natural possibilitando o sombreamento por diferentes árvores da Mata Atlântica original (ROCHA, 2008; LOBÃO et al., 2004).

No final do século XIX, a cacauicultura foi considerada uma importante atividade econômica que proporcionou o desenvolvimento e riqueza para região e o crescimento do Estado baiano por mais de um século (COSTA; SOARES, 2016).

Embora o estado da Bahia seja ainda considerado o maior produtor de cacau do Brasil, essa cultura enfrentou diversos ciclos críticos desde a década de 1930 quando o país passou por uma série de crise econômica (CALDAS; PERZ, 2013).

Apesar do sul da Bahia ter liderado o cultivo de cacau nos anos de 1976 a 1987 (BENJAMIN, 2016), sua produção caiu drasticamente quando iniciou a principal crise enfrentada pelo cacau no estado com a chegada da vassoura-de-bruxa (VB), registrada pela primeira vez em 1989 no município de Uruçuca. A doença, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, acarretou uma queda chegando a causar perdas de até 90% na produção de amêndoas e também ameaçando a estabilidade ecológica devido à substituição de cacauais por pastagens e, consequentemente perda de árvores nativas presentes no sistema cabruca (ROCHA, 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

A chegada da VB ao sul da Bahia caracterizou-se por uma rápida disseminação, já que o fungo encontrou condições ambientais favoráveis tornando-se responsável pela maior doença ocorrida na cacaicultura do estado (PURDY, et al. 1996; OLIVEIRA; LUZ, 2005; ROCHA, 2008). Em pouco tempo, a doença se espalhou para região causando importantes danos, como detectado no município de Uruçuca que enfrentou uma queda em 1990 equivalente a 75% de área cultivada e 70% de produção. Danos estes, que contribuíram para transformar o Brasil de exportador para importador de cacau (MEINHARDT et al., 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

*M. perniciosa* possui um potencial destrutivo, atacando o equilíbrio hormonal do cacau e causando sintomas como hipertrofia e hiperplasia. O início da infecção se dá pelos basidiósporos que são produzidos pelos basidiocarpos, que possuem forma de cogumelos rosados (Fig. 3A). Os basidiósporos dispersam pela ação do vento, principalmente em períodos com umidade alta. Em contato com tecidos da planta, principalmente tecidos jovens, os basidiósporos penetram por aberturas naturais, como os estômatos e inicia o processo de infecção e instalação da doença (MEINHARDT et al., 2008). Caracterizado como hemibiotrófico, o fungo *M. perniciosa* possui duas fases em seu ciclo de vida. A fase inicial (biotrófica) apresenta a formação de hifas monocarióticas com ausência de grampos de conexão e crescimento no apoplasto (Fig. 3B) do hospedeiro, consequentemente causando alterações como hipertrofia e hiperplasia, perda de dominância apical e formação de hastas anormais com aparência de “vassoura verde” (Figura 3C). A segunda fase, chamada de necrotrófica ou saprofítica, é caracterizada por micélio dicariótico e hifas com grampos de conexão o qual invade o meio intracelular levando a morte dos tecidos e formando uma estrutura denominada de “vassoura seca” (Figura 3D), onde se alimenta da matéria orgânica morta (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008).

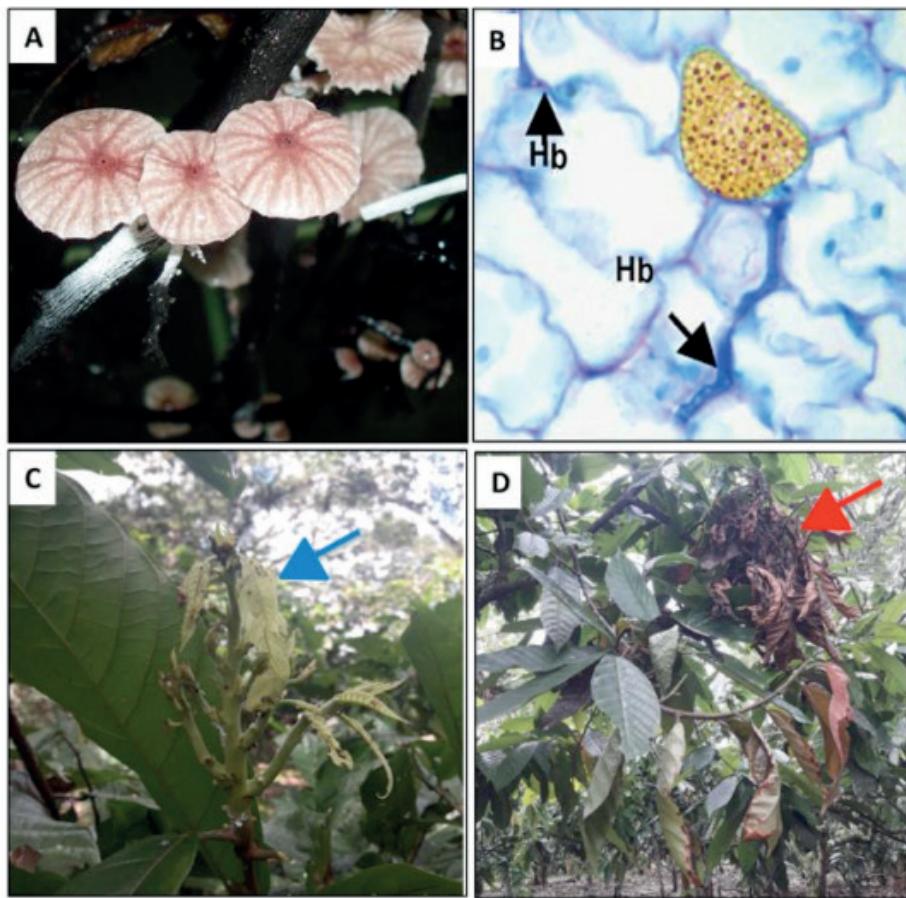


Figura 03: **Fases de desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*.** A: Basidiocarpos (Acervo do autor). B: Hb: Hifa biotrófica no apoplasto de meristema de cacauzeiro representando a fase biotrófica (Adaptado de Ceita et al., 2007). C: Seta azul: estágio de vassoura verde da doença representando a fase biotrófica (Acervo do autor). D: Seta vermelha: necrose dos tecidos (vassoura-de-bruxa-seca) representando a fase necrotrófica (Acervo do autor).

## 6 | APOPLASTO DE *Theobroma cacao*

O apoplasto é o local interno onde ocorre o contato inicial entre planta e patógenos, sendo determinante para a colonização ou não de seu hospedeiro (SPERSCHNEIDER et al., 2018). O fungo *M. perniciosa* ramifica no apoplasto de *T. cacao* no primeiro estágio da doença, ou vassoura verde, caracterizando a fase biotrófica ou parasítica (PURDY; SCHMIDT, 1996). Isso acarreta alterações bioquímicas, como o aumento de alcaloides, compostos fenólicos e taninos para tentar eliminar o fungo (SCARPARI et al., 2005). O fungo *M. perniciosa* permanece em sua fase parasítica no apoplasto por cerca de 40 a 60 dias (CEITA et al., 2007), sendo assim, pode-se considerar este espaço como um campo de batalha molecular devido às interações entre cacau- *M. perniciosa* e, portanto, a fase biotrófica do fungo é um período determinante para o avanço ou não da instalação da doença (PIROVANI et al., 2008).

Para um maior entendimento da interação *M. perniciosa*- *T. cacao*, muitos estudos têm sido realizados, os quais envolvem a fase biotrófica da doença. Por

outro lado, o conhecimento sobre o apoplasto do cacau continua escasso. O primeiro mapa proteômico de *M. perniciosa* foi realizado em resposta ao FA de cacau. Dois isolados do fungo (553, menos agressivo e 565, mais agressivo) e duas variedades de cacau contrastantes para doença VB (Catongo, genótipo suscetível e TSH1188, genótipo resistente) foram utilizados. As análises mostraram que constituintes do FA induziram o remodelamento proteico de *M. perniciosa* de acordo com o seu grau de agressividade (CAMILLO, 2013). Pirovani (2008), em sua tese de doutorado, avaliou a germinação de esporos do fungo *M. perniciosa* na presença do FA de cacau de dois genótipos contrastantes para doença VB (Catongo e TSH1188) de plantas controle (inoculados em água) e de plantas infectadas pelo fungo às 72 horas após a inoculação. A inibição da germinação para o fluido das plantas da variedade Catongo controle foi de 23% e das plantas elicitadas foi de 1%. Por outro lado, para o fluido da variedade resistente (TSH1188) houve uma inibição de 13% e 50% da germinação em plantas controle e elicitadas, respectivamente, indicando acúmulo de compostos de defesa presentes no apoplasto do genótipo resistente sob interação com o patógeno (PIROVANI, 2008).

## 7 | EXTRAÇÃO DE FLUIDO APOPLÁSTICO DE FOLHAS DE *Theobroma cacao*

A extração de FA de folhas de cacau por meio do método VIC é feita através do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008). Folhas maduras de cacau devem ser coletadas, mantidas em câmara fria em caixa térmica para evitar a dessecação e diminuir o estresse e assim, manter suas condições fisiológicas e, logo após serem utilizadas para a extração do FA.

As folhas deverão ser lavadas com água destilada e as nervuras centrais retiradas com ajuda de um bisturi ou outro material cortante para facilitar a infiltração. Após isto, as folhas então deverão ser reunidas com as partes cortadas voltadas para cima imersas em um becker contendo fosfato de potássio 10 mmol L<sup>-1</sup> de pH 5,5 ajustado com ácido ascórbico para evitar oxidação e levadas a um dessecador para infiltração à vácuo, onde o ar do interior da folha será retirado e substituído pela solução de infiltração e, com isso facilitará a solubilização das proteínas.

O vácuo aplicado deverá ser de -100 kPa (1 bar) durante 3 minutos, alternando com 2 minutos de pressão atmosférica. Esse procedimento precisará ser repetido 9 vezes, aproximadamente 27 minutos, ou até a emissão total das bolhas.

Após a infiltração total das folhas, um aparato de suporte coletor deverá ser montado e o FA recolhido após centrifugação. Para preparar o suporte coletor, cada parte da folha terá de ser enrolada em um anteparo cilíndrico de borracha de 0,8 cm de diâmetro x 9 cm de comprimento, presas com uma fita adesiva plástica e inseridas em um tubo falcon de 15 mL com a parte cortada voltada para baixo (Fig.

04). Vários aparelhos poderão ser feitos; é preciso sempre mantê-los imersos em gelo logo após cada montagem.

Durante a construção do suporte coletor, um botão de plástico de 20 mm de diâmetro deverá ser encaixado dentro de cada tubo para impedir o deslocamento do anteparo de borracha para o fundo do mesmo (ver Fig. 04). Após montados, os tubos deverão ser levados à centrífuga para coleta do FA. A força centrífuga ideal a ser utilizada em folhas de cacau é de 3.000 a 3.500 g por 25 minutos, a 4°C, pois com esta força centrífuga a contaminação intracelular é considerada insignificante e, portanto ideal para uso.

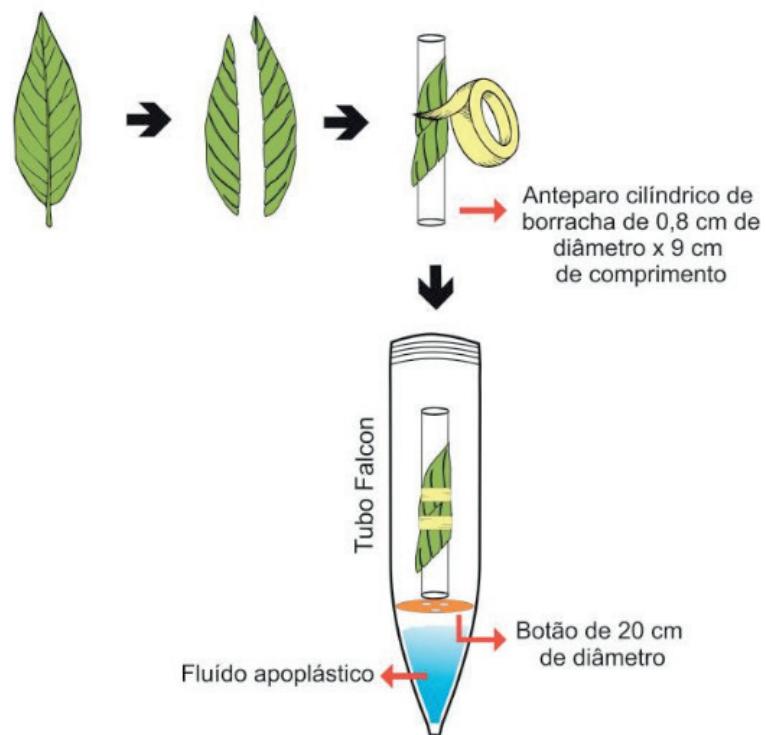


Figura 04: **Aparato coletor do FA.** Montagem do suporte coletor para centrifugação e coleta do FA.

Diferentes forças centrífugas (1.000 g a 4.500 g) foram utilizadas para testar o volume do FA coletado, o rendimento proteico e os níveis de contaminação intracelular, os quais foram demonstrados por Pirovani et al. (2008) um aumento linear à medida que a força centrífuga aumentava, concluindo assim, que a força ideal para folhas de cacau foi de 3000 a 3.500 g.

Além disso, é preciso a obtenção de um bom rendimento de FA que seja suficiente para as etapas seguintes (Tabela 01). Após a coleta, o FA poderá ser utilizado para extração proteica em análise proteômica ou diretamente para análise de atividade enzimática e bioensaio de germinação de esporos fúngicos (Fig. 05); estas duas últimas análises, o FA deverá ser coletado com a substituição do tampão fosfato de potássio por água destilada, para não interferir nos resultados finais.

Quantidade de folha (g)	Força Centrífuga (xg)	Quantidade de FA (mL)	Quantidade de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
500	3500	100	4

Tabela 1: Influência da força centrífuga na quantidade de FA e proteínas presentes no FA.

Valores aproximados.

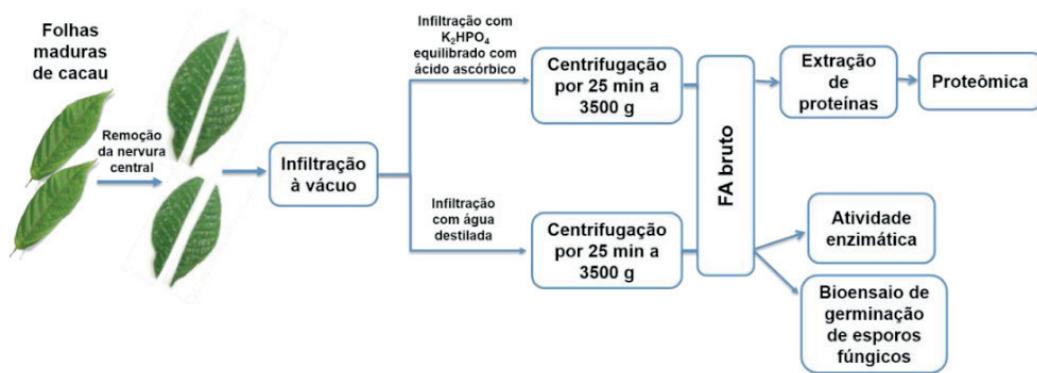


Figura 05: Diagrama resumindo a extração de FA e o uso em análises.

## 7.1 Extração proteica do fluido apoplástico de *T. cacao*

Alíquotas com um volume de 15 mL de FA foliar de cacau deverão ser concentradas por liofilização e ressuspensas em 0,8 mL de tampão de extração SDS-Denso (sacarose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCL 100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 8,0, 2-mercaptopetanol 5 %). As amostras precisarão ser submetidas à sonicação (3 pulsos de 8 s cada, com 10 s de intervalo entre pulsos) com amplitude de 50 % no processador ultrassônico (Gex 130, 130 W) para facilitar na solubilização dos polissacarídeos e assim, melhorar a qualidade e o rendimento proteico. Logo após a sonicação, as amostras deverão ser incubadas no gelo por 10 min. Logo em seguida, 0,8 mL de fenol saturado, pH 8,0, deverão ser adicionado nas amostras e mantidas por 30 min de incubação sob agitação à temperatura ambiente. As amostras deverão ser centrifugadas a 5.000 g por 10 min a 4 °C. A adição do fenol propiciará a separação das proteínas de outros conteúdos interferentes. As proteínas concentrarão na fase fenólica (fase superior) e deverá ser extraída novamente com igual volume de tampão SDS-Denso. As fases fenólicas de duas extrações deverão ser agrupadas e incubadas por 14 h com 5 vezes o volume de acetato de amônio a 100  $\text{mmol L}^{-1}$  em metanol a -20 °C para precipitação das proteínas.

Para recuperar as proteínas precipitadas, as amostras deverão ser centrifugadas a 20.000 g por 5 min. a 4 °C. O precipitado proteico deverá ser lavado três vezes

com acetato de amônio a 100 mmol L<sup>-1</sup> em metanol e duas vezes com acetona 100%. Por fim, o precipitado deverá ser seco à temperatura ambiente e ressuspenso em aproximadamente 600 µL de tampão de reidratação (ureia 7 mol L<sup>-1</sup>, tioureia 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) e estocado a -20 °C até o uso (WANG et al., 2003 com modificações de PIROVANI et al., 2008).

As proteínas podem ser quantificadas pelo método 2D-Quant Kit (GeHealthCare), conforme as recomendações do fabricante, utilizando BSA (soro de albumina bovina) como padrão. Após a obtenção de uma quantidade ideal de proteínas, elas deverão ser resolvidas em eletroforese 1D e 2D.

### 7.1.1 SDS-PAGE 1D

As proteínas de FA deverão ser separadas pelo peso molecular por meio de uma corrida eletroforética em SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecilssulfato de Sódio) para a visualização das bandas e comprovação da eficiência da etapa de extração.

Uma massa de cerca de 20 µg de proteína de FA de cacau deverão ser tratadas com β-Mercaptoetanol para quebrar as pontes dissulfeto e eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos. Após o tratamento, as proteínas deverão ser submetidas a uma corrente elétrica para separação eletroforética em um gel de 8 x 10 cm a 12,5 % de acrilamida. Juntamente com as proteínas, um marcador de peso molecular deverá ser adicionado (cerca de 10 µL). Este marcador possui proteínas com pesos moleculares de vários polipeptídeos conhecidos, onde deverá ser utilizado como padrão para comparar com as subunidades visualizadas das proteínas de interesse.

Após cerca de 3h de corrida, o gel deverá ser inserido em tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1h, corado durante 24 h em Coomassie coloidal G-250 a 0,08 % (NEUHOFF et al., 1988) e, por fim, descorado em água destilada autoclavada por aproximadamente 2 dias. Após descorado, a imagem do gel deverá ser obtida por meio de um digitalizador próprio, como o ImageScanner II (Amersham, GE Healthcare). As bandas visualizadas (Fig. 06) correspondem a diversas proteínas de acordo com seu peso molecular, onde as proteínas de menores pesos migrarão mais rapidamente e as maiores mais lentamente, devido a maior dificuldade em atravessar a malha do gel.

No exemplo da figura 06, ao comparar as proteínas de FA e de extrato total (ET) de folhas de cacau infectadas e não infectadas, é possível observar bandas diferenciais e banda (seta preta) representando a subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), uma proteína citoplasmática abundante em extratos foliares. Isto demonstra a eficiência do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008).

e utilizado desde a extração de FA à extração proteica.

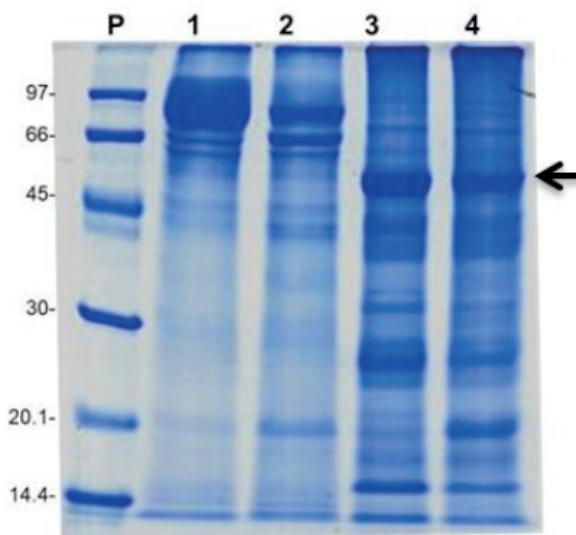


Figura 06: **SDS-PAGE.** 1: Proteínas de FA de cacau saudável; 2: Proteínas de FA de cacau infectado por *M. perniciosa* (estágio de vassoura verde); 3: Proteínas do ET de folhas de cacau saudáveis; 4: Proteínas do ET de folhas de cacau infectadas por *M. perniciosa* (estágio de vassoura verde). P: Marcador de peso molecular: Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare). Seta preta: banda proeminente de aproximadamente 55 KDa representando a subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco) características em extratos foliares. Adaptado de Pirovani et al., (2008).

### 7.1.2 Eletroforese Bidimensional

Após comprovação da eficiência de extração proteica, as proteínas de FA precisarão ser resolvidas em gel bidimensional (SDS-PAGE 2-D). Para tanto, as proteínas deverão ser focalizadas, onde há separação de acordo com os seus pontos isoelétricos (pl) num gradiente de pH imobilizado e, logo após separadas de acordo com seus pesos moleculares.

Um tampão de reidratação 2-DE (ureia 7 mol L<sup>-1</sup>, tioureia 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) contendo Ditiotreitol (DTT) com concentração 50 mmol L<sup>-1</sup> e 0,5% de anfólito deverá ser adicionado em cerca de 350 µg de proteína de FA de cacau e o volume final deverá ser ajustado para 250 µL utilizando tampão de reidratação 2-DE. As amostras deverão ser pipetadas em triplicata em suportes (*strip holder*) para tiras de gel (*strips*) com gradiente de pH imobilizado. Em seguida, as três *strip holder* deverão ser levadas para focalização isoelétrica em *Ettan IPGphor III* (GE Healthcare) com as seguintes condições de corrida: 12 h a 20 °C de reidratação, 500 V por 1 h, 1000 V por 1:04 h, 8000 V por 2:30 h e 8000 V por 40 min. Após a focalização, as *strips* deverão ser tratadas com 7 mL de tampão de equilíbrio (ureia 6 mol L<sup>-1</sup>, SDS 2 %, glicerol 30 %, Tris-HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 8.8 e azul de bromofenol a 0,002 %) contendo 10 mg mL<sup>-1</sup> de DTT e mantidas sob agitação leve por 15 min. Em seguida, esse procedimento deverá ser repetido mais duas vezes, onde as *strips*

precisarão ser tratadas por 15 min com tampão de equilíbrio contendo 25 mg mL<sup>-1</sup> de iodoacetamida e lavadas por 15 min com tampão de corrida (Tris 25 mmol L<sup>-1</sup> pH 8.3, glicina 0,19 mol L<sup>-1</sup>, SDS 0,1 %).

Após os tratamentos, as *strips* deverão ser dispostas na parte superior de géis de poliacrilamida a 12,5 % para segunda separação de acordo com os pesos moleculares das proteínas (Figura 07). Juntamente com as *strips*, cerca de 10 µL de marcador de peso molecular Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare) deverá ser adicionado num pedaço de papel filtro e selado com 1 % de agarose (TRIS Base a 25 mmol L<sup>-1</sup>, glicina a 192 mmol L<sup>-1</sup>, SDS a 0,1 %, agarose a 0,5 % e *bromophenol blue* a 0,002 %) para a corrida eletroforética. Deverão ser aplicadas as seguintes condições de corrida: 15 mA/gel por 15 min, 40 mA/gel por 30 min e 50 mA/gel por 4 h.

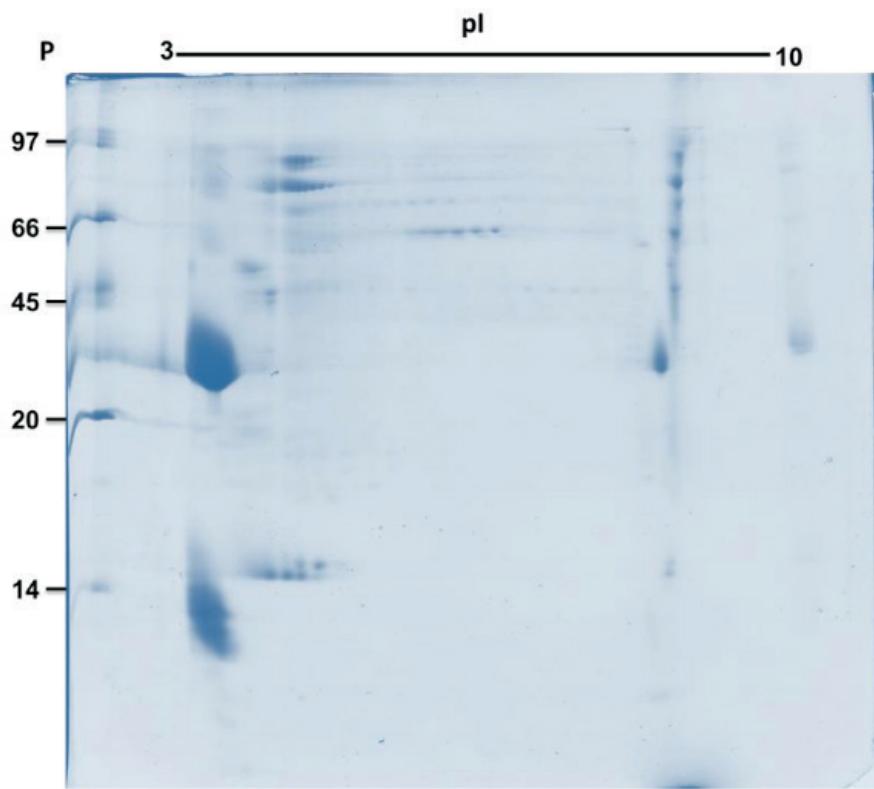


Figura 07: **Perfil proteico bidimensional de FA cacau.** A: Proteínas de FA do genótipo Catongo de cacau em condições de campo. Ponto isoelétrico (pl) de 3-10 Não linear. P: Marcador de peso molecular 14-220 KDa. Acervo do autor.

Após concluir a corrida eletroforética, os géis deverão ser transferidos para o tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1 h e em corados em Coomassie coloidal (sulfato de amônio 8 %, ácido fosfórico 0.8 %, azul de coomassie G-250 0.08 % e metanol 20 %) (NEUHOFF et al., 1988) por 7 dias sob agitação suave. Depois de obter os géis corados, eles deverão ser descorados, por aproximadamente o mesmo período, com sucessivas lavagens utilizando água destilada autoclavada e

conservá-los em ácido acético a 7 %.

Assim como os géis 1D, as imagens dos géis 2D deverão ser digitalizadas. Em seguida, as imagens deverão ser levadas para um analisador como *software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE healthcare)*, onde serão detectados a quantidade dos *spots* (pontos pretos), as massas moleculares e os pontos isoelétricos de cada *spot*. Além disso, este *software* permite uma análise comparativa de níveis de expressão entre materiais genéticos contrastantes para ajudar selecionar os *spots* que serão tratados e identificados, além de outras ferramentas que ajudam a melhorar a qualidade da imagem.

No exemplo da figura 07, pode ser observado uma boa separação das proteínas demonstrado pela ampla distribuição dos *spots* em uma faixa de pH 3 a 10 e peso molecular de 14 a 97 KDa.

### 7.1.3 Identificação das proteínas de FA de cacau

Para obter o mapa proteômico do FA de cacau por meio da identificação por espectrometria de massas, os *spots* de interesse deverão ser excisados com auxílio de um bisturi e tratados por meio da digestão tríptica. A princípio, os pedaços de géis deverão ser tratados com 200  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 25 mmol L<sup>-1</sup>, contendo acetonitrila 50% pH 8, por 24 h para descorar o gel. O sobrenadante deverá ser descartados e os fragmentos dos géis deverão ser lavados com 200  $\mu$ L de água Milli-Q. O sobrenadante deverá ser novamente descartado seguindo da desidratação do gel por meio da adição de 100  $\mu$ L de acetonitrila a 100 % por 5 min em temperatura ambiente e deverão ser levados para o secador centrífugo por, aproximadamente 20 min ou até completa secagem dos géis. Em seguida, os fragmentos dos géis deverão ser reidratados com a adição de 4  $\mu$ L de tripsina Gold (Promega) a 25 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> e incubados por 10 min a 4° C. Uma solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 25 mmol L<sup>-1</sup> deverá ser adicionado até cobrir os fragmentos e incubados novamente, por 16 h à 37° C para a ação da tripsina. Em seguida, o sobrenadante deverá ser transferido para novos tubos de Eppendorf e realizado duas lavagens com 50  $\mu$ L de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 5 %, sob agitação em vortex durante 30 min. Os sobrenadantes referentes às duas lavagens deverão ser reunidos aos novos tubos. Por fim, as amostras deverão ser concentradas atingindo um volume de 15 a 20  $\mu$ L em um secador centrífugo. As amostras então, deverão ser transferidas para “Vials” (Waters) e analisadas em um cromatógrafo nanoAcquity (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas Q-Tof micro (Waters) para a identificação dos peptídeos (VILLELA-DIAS et al., 2014).

Os espectros gerados após análise no espectrômetro de massas, deverão ser analisados por meio do *software ProteinLynx Global Server 4.2 (WATERS)* e

comparados com bancos de dados para busca da identidade das proteínas.

## 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foi demonstrado a importância do apoplasto para planta e como investigar o conteúdo do mesmo, a partir do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008). Protocolo este, ideal para folhas de cacau, porém pode ser adaptável para outras espécies vegetais. Também foi demonstrado possíveis análises a partir do FA, como a análise proteômica. A obtenção das proteínas apoplásticas, ainda é desafiadora e, portanto, pouco caracterizadas, pois exige amostra livre de contaminação de materiais intracelulares. Assim, é preciso entender a importância do tempo e da força de centrifugação no momento de extração, sendo este um dos principais requisitos para minimizar a contaminação citoplasmática. Por fim, a metodologia discutida neste trabalho, possibilita a compreensão do conteúdo apoplástico de cacau e pode favorecer um maior entendimento sobre as respostas moleculares do cacau frente a estresses bióticos e/ou abióticos e em condições normais.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K.; JWA, N.S.; LEBRUN, M.H.; JOB, D.; RAKWAL, R. **Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins.** *Proteomics*, v.10, p.799-827, 2010.
- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. New York: Academic Press, p. 635, 2005.
- ALMEIDA, A-A. F. and VALLE, R. R. **Ecophysiology of the cacao tree.** *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(4):425-448, 2007.
- ALVERSON, W. S., WHITLOCK, B. A., NYFFELER, R., BAYER, C. and BAUM, D. A. **Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data.** *Am. J. Botany*. 86:1474-1486, 1999.
- BEG, M. S., AHMAD, S., JAN, K. and BASHIR, K. **Status, supply chain and processing of cocoa- A review.** *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116, 2017.
- BENJAMIN, C. S., LUZ, E. D. M. N., SANTOS, W. O. e PIRES, J. L. **Cacao families and parents selected as resistant to natural infection of *Moniliophthora perniciosa*.** *Crop Breed. Appl. Biotechnol. SciElo*, vol.16 no.2 Viçosa Apr./June 2016.
- BERNSTEIN, L. **Method for determining solutes in the cell walls of leaves.** *Plant Physiology*, 47(3), 361-365, 1971.
- BOLLER, T., & FELIX, G. **A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.** *Annual review of plant biology*, 60, 379-406, 2009.
- CALDAS, M. M. & PERZ, S. **Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch's broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil.** *Geoforum*, 47, 147-157, 2013.

CAMILLO, L. R. **Análise do perfil proteômico de *Moniliophthora perniciosa* em resposta ao fluido apoplástico de cacau e caracterização de uma ascorbato peroxidase de *Theobroma cacao*.** (Tese de doutorado da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2013).

CEITA, G. O., MACÊDO, J. N. A., SANTOS, T. B., ALEMANNO, L., DA SILVA GESTEIRA, A., MICHELI, F., ... & MAZZAFERA, P. **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*.** *Plant Science*, v. 173: 106-117, 2007.

CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B. and STASKAWICZ, B. J. **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.** *Cell*, 124(4): 803-814, 2006.

COSTA, F. M., SOARES, N. S. (Org.). **Cacau, riqueza de pobres.** Ilhéus, BA: *Editus*, p. 286, 2016.

DALIO, R. J. D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.).** *Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM)*, Freising, Germany, 2013.

DANI, V., WILLIAM, J., DURANTI, M. and CROY, R. **Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress.** *Proteomics*, 5, 737-745, 2005.

De ALMEIDA, S. M., Do AMARAL, D., DEL-BEM, D. O. J., SANTOS, L. E., E. B., SILVA, S., JOSÉ, R. and MICHELI, F. **Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease.** *PloS One*, 12 (10): 23 p., 2017.

DELAUNOIS, B., COLBY, T., BELLOY, N., CONREUX, A., HARZEN, A., BAILLIEUL, F., CLÉMENT, C., SCHMIDT, J., JEANDET, P. and CORDELIER, S. **Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes.** *BMC Plant Biol.* 13: 24, 2013.

DELAUNOIS, B., JEANDET, P., CLÉMENT, C., BAILLIEUL, F., DOREY, S., & CORDELIER, S. **Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies.** *Frontiers in plant science*, 5, 249, 2014.

DIETZ, K. J. **Functions and responses of the leaf apoplast under stress.** *Progress in Botany*. Volume 58, pp 221-254, 1997.

DING, Y., WANG, J., WANG, J., STIERHOF, Y. D., ROBINSON, D. G., & JIANG, L. **Unconventional protein secretion.** *Trends in plant science*, 17(10), 606-615, 2012.

DOEHELMANN, G., & HEMETSBERGER, C. **Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens.** *New Phytologist*, 198(4), 1001-1016, 2013.

EVANS, H. C. **Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa.** *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 515-523, 1980.

FERREIRA, A. C. R., AHNERT, D., NETO, B. A. M. e MELLO, D. L. N. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade Instituto Cabruca.** Ilhéus, Bahia: 2013.

FIGUEIREDO, A., MONTEIRO, F., & SEBASTIANA, M. **Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective.** *Frontiers in plant science*, 5, 739, 2014.

GOYA, L., MARTÍN, M. Á., SARRIÁ, B., RAMOS, S., MATEOS, R. and BRAVO, L. **Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans.** *Nutrients*, 8(4), 212, 2016.

GUERRA-GUIMARÃES, L., TENENTE, R. E. R., PINHEIRO, C. C., CHAVES, I. I., SILVA, M. D. C. M. L., CARDOSO, F. F., and RICARDO, C. P. C. **Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*.** *Frontiers in plant science*, 6, 478, 2015.

HARTUNG, W. J., RADIN, W. and HENDRIX, D. L. **Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water stressed cotton leaves: Role of apoplastic pH.** *Plant Physiol.* 86: 908–913, 1987.

JASHNI, M. K., MEHRABI, R., COLLEMARE, J., MESARICH, C. H., & De WIT, P. J. **The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions.** *Frontiers in plant science*, 6, 584, 2015.

KAZAN, K., & LYONS, R. **Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors.** *The Plant Cell*, 26(6), 2285-2309, 2014.

LEE, S. J., SARAVANAN, R. S., DAMASCENO, C. M., YAMANE, H., KIM, B. D., & ROSE, J. K. **Digging deeper into the plant cell wall proteome.** *Plant physiology and Biochemistry*, 42(12), 979-988, 2004.

LI, Y. B., HAN, L. B., WANG, H. Y., ZHANG, J., SUN, S. T., FENG, D. Q., YANG, C. L., SUN, Y. D., ZHONG, N. Q. and XIA, G. X. **The Thioredoxin GbNRX1 Plays a Crucial Role in Homeostasis of Apoplastic Reactive Oxygen Species in Response to *Verticillium dahliae* Infection in Cotton.** *Plant Physiol.* 170(4): 2392–2406, 2016.

LOBÃO, D. E., SETENTA, W. C. and VALLE, R. R. **Sistema agrossilvicultural cacauero-metodo de agricultura sustentável.** *Agrossilvicultura*, 1(2), 163-173, 2004.

LOHAUSA, G., PENNEWISSB, K., SATTELMACHERB, B., HUSSMANNA, M. and MUEHLING, K. **Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species.** *Physiologia Plantarum* 111: 457–465, 2001.

LONG, J. M., & WIDDERS, I. E. **Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv Argenteum).** *Plant physiology*, 94(3), 1040-1047, 1990.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, A. P., ARDILA, H. D., MARTÍNEZ-PERALTA, S. T., MELGAREJO-MUÑOZ, L. M., CASTILLEJO-SÁNCHEZ, M. A., & JORRÍN-NOVO, J. V. **What proteomic analysis of the apoplast tells us about plant–pathogen interactions.** *Plant Pathology*, 67(8), 1647-1668, 2018.

MEINHARDT, L. W., RINCONES, J., BAILEY, B. A., AIME, M. C., GRIFFITH, G. W., ZHANG, D., & Pereira, G. A. *et al.* ***Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?** *Molecular Plant Pathology*, Londres, v. 9, n. 5, p. 577-588, set. 2008.

MELLO, M. O. and SILVA-FILHO, M. C. **Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*. vol.14 no.2, Londrina May/Aug., 2002.

MENOSSI, M., SILVA-FILHO, M. C., VINCENTZ, M., VAN-SLUYS, M. A. and SOUZA, G. M. **Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development.** *Int J Plant Genomics*, 2008.

MOTAMAYOR, J. C., MOCKAITIS, K., SCHMUTZ, J., HAIMINEN, N., LIVINGSTONE III, D., CORNEJO, O. & SASKI, C. **The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color.** *Genome biology*, 14(6), r53, 2013.

MOTAMAYOR, J. C., RISTERUCCI, A. M., LOPEZ, P. A., ORTIZ, C. F., MORENO, A. and LANAUD, C. **. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas.** *Heredity*. 89:380-386,

2002.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., and EHRHARDT, W. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis* 9, 255–262; 1988.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., & PIATER, L. **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences.** *Immunological reviews*, 198(1), 249-266, 2004.

OLIVEIRA, M. D., & LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil.** Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005.

OSBOURN, A. E. **Plant mechanisms that give defense against soilborne diseases.** *Australas Plant Pathol*, 30, 99–102, 2001.

PECHANOVÁ, O., HSU, C. Y., ADAMS, J. P., PECHAN, T., VANDERVELDE, L., DRNEVICH, J. & TSCHAPLINSKI, T. J. **Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar.** *BMC genomics*, 11(1), 674, 2010.

PIETERSE, C. M.J., VAN PELT, J. A., VAN WEES, S. C. M., TON, J., VERHAGEN, B. W. M., LÉON-KLOOSTERZIEL, K., HASE, S., DE VOS, M., OOSTEN, V. V., POZO, M., SPOEL, S., VAN DER ENT, S., KOORNNEEF, A., CHALFUN-JUNIOR, A., RESENDE, M. L. V. e VAN LOON, L.C. **Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada.** *Revista Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

PIROVANI, C. P. et al. **Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease.** *Electrophoresis*, v. 29, n. 11, p. 2391–401, 2008.

PURDY, L. H. and SCHMIDT, R. A. **Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management.** *Annual Review of Phytopathology*. 34, 573–594, 1996.

QUIRINO, B. F., CANDIDO, E. S., CAMPOS, P. F., FRANCO, O. L., & KRÜGER, R. H. **Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions.** *Phytochemistry*, 71(4), 351-362, 2010.

RAMANJULU, S., KAISER, W. and DIETZ, K. J. **Salt and Drought Stress Differentially Affect the Accumulation of Extracellular Proteins in Barley.** *Z. Naturforsch.* 54c, 337-347, 1999.

RATHMELL, W. and SEQUEIRA, L. Soluble Peroxidase in Fluid from the Intercellular Spaces of Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318, 1974.

ROCHA, L. B. **A região cacaueira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação** / Lurdes Bertol Rocha. Ilhéus: Editus. 255p., 2008.

ROCHA, L. B. **A região cacaueira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação** / Lurdes Bertol Rocha. Ilhéus: Editus. 255p., 2008.

SADAVA, D.- H., GRAIG – ORIANS, H., GORDON, H. – P., K. – HILLIS, William, DAVID, M. **Vida: A Ciência da Biologia** - 8.ed.: Volume 3: Plantas e Animais, 2009.

SAKURAI, N. **Dynamic Function and Regulation of Apoplast in the Plant Body.** *J. Plant Res.* 111: 133-148, 1998.

SATTELMACHER, B. **The apoplast and its significance for plant mineral nutrition.** Institute for Plant Nutrition and Soil Science. *New Phytologist*. 149: 167–192, 2001.

SCARPARI, L. M., MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W.V., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C. M. and PEREIRA, G. A. G. **Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*.** *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 413, p. 865-877, 2005.

SOARES, N. C., FRANCISCO, R., RICARDO C. P. and JACKSON, P. A. **Proteomics of ionically bound and soluble extracellular proteins in *Medicago truncatula* leaves.** *Proteomics*. Jun; 7 (12): 2070-82, 2007.

SPERSCHNEIDER, J., DODDS, P. N., SINGH, K. B., & TAYLOR, J. M. **ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning.** *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778, 2018.

VILLELA-DIAS, C., CAMILLO, L. R., DE OLIVEIRA, G. A., SENA, J. A., SANTIAGO, A. S., DE SOUSA, S. T. and COSTA, M. G. **Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*.** *Physiologia plantarum*, 150(1), 1-17, 2014.

WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., SENSI, E., MAZZUCA, S., & CRESTI, M. **Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds.** *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375, 2003.

WICKRAMASURIYA, A. M. and DUNWELL, J. M. **Cacao biotechnology: current status and future prospects.** *Plant Biotechnology Journal*. Jan.; 16; pp 4-17, 2018.

ZHANG, L., TIAN, L. H., ZHAO, J. F., SONG, Y., ZHANG, C. J., & GUO, Y. **Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis.** *Plant Physiology*, 149(2), 916-928, 2009.

## DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS DE *Theobroma speciosum* WILLD. Ex Spreng (Malvaceae) EM PARQUE URBANO FLORESTAL

Data de aceite: 12/12/2019

### **Juliana de Freitas Encinas Dardengo**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT)

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Agroecossistemas Amazônicos (PPG-BioAgro)

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular – GenBioMol  
Alta Floresta – Mato Grosso

### **Uéliton Alves de Oliveira**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Vegetal

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro - UENF  
Campos dos Goytacazes - RJ

### **Tatiane Lemos Varella**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT)

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular – GenBioMol  
Alta Floresta – MT

### **Greiciele Farias da Silveira**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT)

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular – GenBioMol  
Alta Floresta – MT

### **Maicon Douglas Arenas de Souza**

Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (Botânica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Rio de Janeiro - RJ

### **Kelli Évelin Muller Zortea**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT)

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular – GenBioMol

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia (PPG-Bionorte)  
Alta Floresta – MT

### **Ana Aparecida Bandini Rossi**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos  
Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT)

Laboratório de Genética Vegetal e Biologia  
Molecular – GenBioMol  
Alta Floresta – Mato Grosso

**RESUMO:** Informações sobre a variação genética de espécies nativas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a domesticação e incorporação dessas espécies nos sistemas produtivos regionais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em uma população de *T. speciosum*, com ocorrência natural, em um fragmento florestal urbano, localizado na cidade de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites. A pesquisa foi desenvolvida em um fragmento urbano, o Parque Municipal Zoobotânico no município de Alta Floresta, estado de Mato

Grosso. Para a caracterização da diversidade genética, foram amostrados 25 indivíduos de *T. speciosum* no fragmento. Os fragmentos de SSR foram analisados no programa GelQuantPro®. O programa Power Marker V.3.25, foi utilizado para a determinação da frequência alélica, diversidade gênica, heterozigosidade observada e esperada e PIC. Todos os locos apresentaram um elevado conteúdo de informação polimórfica (PIC), demonstrando a qualidade dos marcadores. A média da heterozigosidade observada foi de 0,30, apresentando o valor mais alto de 0,88. O dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei pelo método UPGMA, possibilitou a formação de 3 grupos distintos, sendo mais dissimilar o indivíduo 51, podendo servir como planta matriz em um programa de melhoramento genético. Todos os primers utilizados no estudo apresentaram polimorfismo, sendo que o maior número de alelos identificado foi pelo primer mTcCIR22. A qualidade dos marcadores foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, com média acima do esperado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cacauí, Melhoramento genético, SSR.

#### GENETIC DIVERSITY AMONG *Theobroma speciosum* WILLD. Ex Spreng (Malvaceae) IN URBAN FOREST PARK

**ABSTRACT:** Information on the genetic variation of native species is fundamental for the development of strategies that allow the domestication and incorporation of these species in regional productive systems. In this context, the objective of this work was to evaluate the genetic diversity in a naturally occurring *T. speciosum* population in an urban forest fragment located in Alta Floresta, MT, using microsatellite markers. The study was carried out in an urban fragment, called Zoobotanical Municipal Park in Alta Floresta, northern Mato Grosso state. To characterize the genetic diversity, 25 *T. speciosum* individuals were sampled from the fragment. SSR fragments were analyzed using the GelQuantPro® program. The Power Marker V.3.25 program was used to determine allele frequency, gene diversity, observed and expected heterozygosity and PIC. All loci had a high polymorphic information content (PIC), demonstrating the quality of the markers. The average heterozygosity observed was 0.30, with the highest value being 0.88. The dendrogram generated from the genetic distance of Nei by the UPGMA method, allowed the formation of 3 distinct groups, being more dissimilar the individual 51, and can serve as a matrix plant in a breeding program. All primers used in the study showed polymorphism, and the largest number of alleles identified was the mTcCIR22 primer. The quality of the markers was confirmed by the polymorphic information content, with a higher than expected average.

**KEYWORDS:** Cacauhy, Genetic improvement, SSR.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma vasta diversidade de tipos de solos e climas, favorecendo o cultivo de diversas frutíferas tropicais, elevando o seu potencial na fruticultura (SIMÃO, 1998). Na Amazônia essa potencialidade é encontrada nas mais diversas

espécies das famílias botânicas, como por exemplo, Fabaceae, Bignoniaceae, Lauraceae, Lecythidaceae, Rubiaceae, Anacardiaceae, Malvaceae, Asteracee, Araceae, Arecaceae, Poaceae, entre outras (CARVALHO e DOMINGUES, 2016).

As espécies do gênero *Theobroma* (Malvaceae) são endêmicas da região Amazônica (DARDENGO et al, 2018) e demandam pesquisas para sua integração aos programas de melhoramento, pois, representam recursos genéticos com potencialidade para a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a pragas e doenças (ALMEIDA et al, 2009).

De acordo com Silva et al. (2015), a espécie silvestre *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., apresentam uma possível fonte de genes de resistência a doenças, que poderá servir de base para programas de melhoramento genético das espécies mais relevantes economicamente como *T. cacao* (cacau) e *T. grandiflorum* (cupuaçu).

Em áreas florestais amazônicas do estado de Mato Grosso, principalmente nas cidades de Aripuanã e Alta Floresta, seus frutos são consumidos *in natura* ou preparados como sucos (NETO, 2011). Corrêa, (1926) relata que no norte do país os frutos são frequentemente encontrados à venda nos mercados, principalmente no estado do Pará, onde segundo Ferrão, (2001) são utilizados na produção de sucos, geleias, doces e sorvetes.

No entanto, as espécies nativas remanescentes do gênero *Theobroma*, estão sofrendo forte erosão genética em função da ação antrópica (ALVES et al, 2013), levando ao isolamento das populações em pequenos fragmentos reduzindo o número de indivíduos reprodutivos e a densidade populacional, afetando os processos genéticos como deriva genética, fluxo de genes, seleção e sistema de reprodução (DARDENGO et al, 2018).

Segundo Costa et al (2011), informações sobre a variação genética de espécies nativas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a domesticação e incorporação dessas espécies nos sistemas produtivos regionais, bem como minimizar os impactos ambientais e estabelecer um plano de conservação efetiva.

Avaliar a variabilidade genética é uma estratégia fundamental, principalmente para espécies nativas pouco estudadas, cuja magnitude da diversidade ainda não é totalmente conhecida (SILVA et al, 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética em uma população de *T. speciosum*, com ocorrência natural, em um fragmento florestal urbano, localizado na cidade de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em um fragmento urbano, denominado de Parque Municipal Zoobotânico que possui uma área de 17,6 ha. O fragmento está localizado no município de Alta Floresta, região norte do estado de Mato Grosso (Figura 1). Na região, predomina a vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta. O clima é do tipo AW segundo a classificação de Koopen, sendo verão tropical chuvoso com nítida estação seca no inverno (IBGE, 2010).

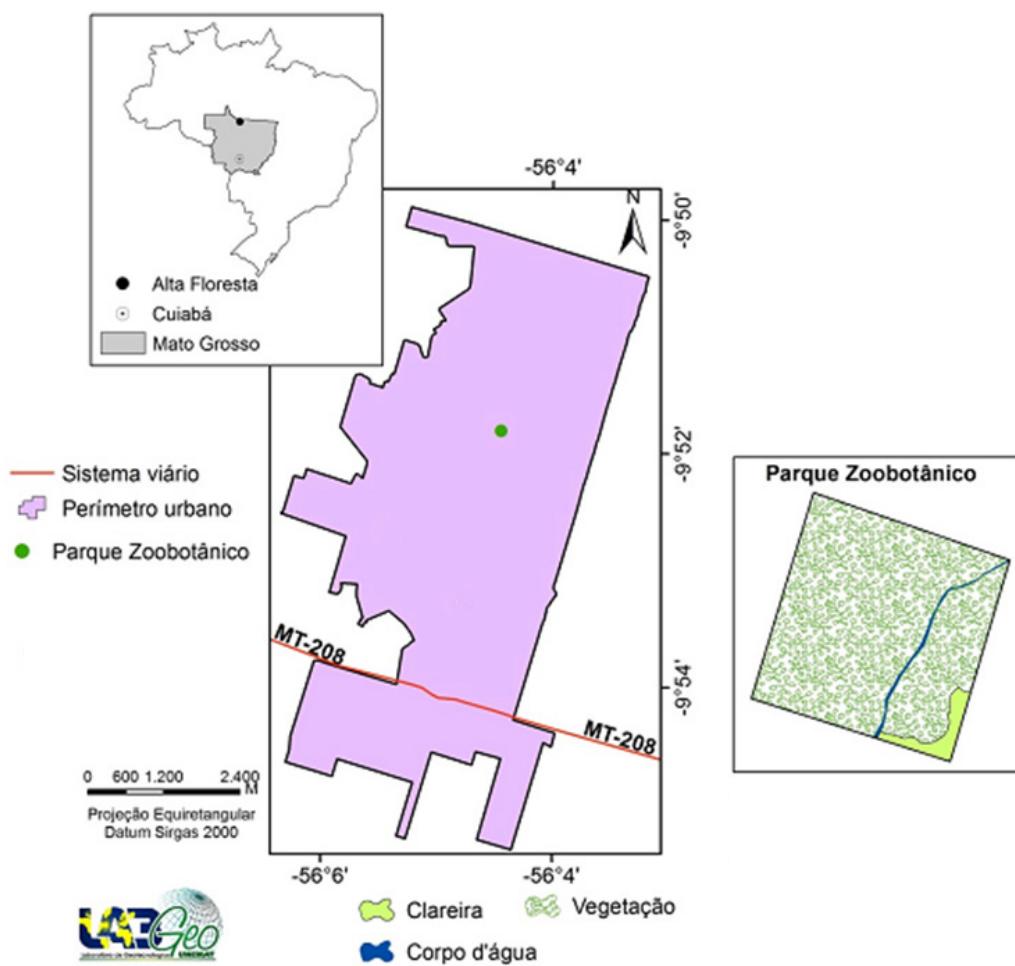


Figura 1. Localização do município de Alta Floresta – MT e do fragmento urbano em estudo.

### Material Vegetal

Para a caracterização da diversidade genética, foram amostrados 25 indivíduos de *T. speciosum* (Figura 2) no fragmento. Todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados com um receptor de **GPS Garmin Etrex®**.

Com o auxílio de um podão foram coletadas amostras de material foliar em cada um dos indivíduos, preferencialmente as que se encontravam em estágio juvenil, sem danos mecânicos ou sinais de doença.

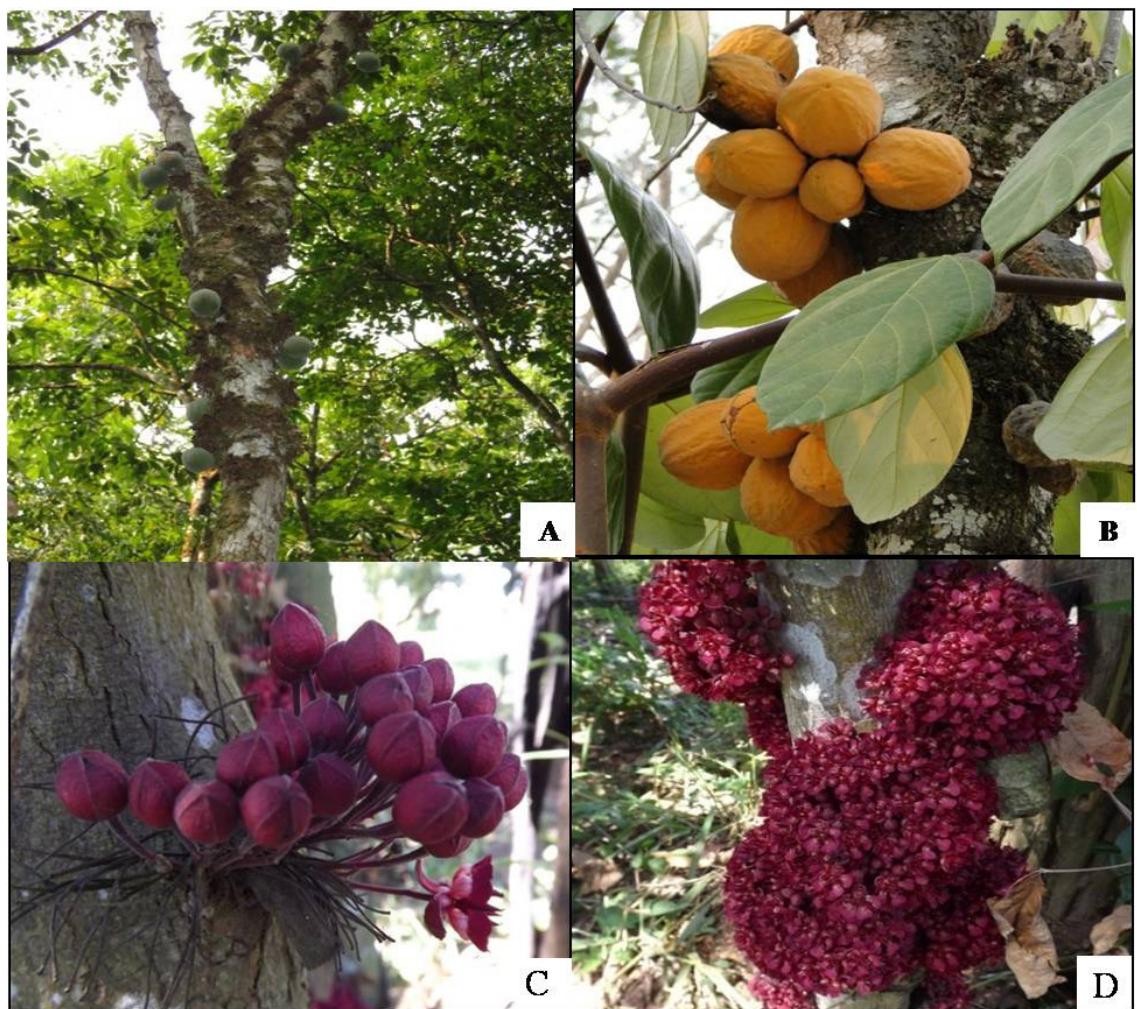


FIGURA 2. Aspectos morfológicos de *Theobroma speciosum*. A) Árvore com frutos jovens. B) Fruto em estágio de maturação. C) Inflorescência com botões florais. D) Inflorescências com flores abertas.

O material coletado foi devidamente identificado e acondicionado ainda em campo em recipientes contendo sílica gel e posteriormente, armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Universitário de Alta Floresta – MT.

### Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas, usando o método de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações: aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2% e de  $\beta$ -mercaptoetanol de 0,2% para 3% no tampão de extração.

A confirmação da quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão ( $\lambda$ ) com amplitude de variação de 10, 20, 50 e 100 ng/ $\mu\text{L}$ . O DNA quantificado foi diluído para a obtenção das soluções de trabalho a 2ng/ $\mu\text{L}$ .

## Amplificação e genotipagem de locos microssatélites

Foi testada a transferibilidade dos vinte e três pares de *primers* microssatélites (SSR) isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999), para a espécie *T. cacao*, utilizando três indivíduos de *T. speciosum* para amplificação inicial via PCR. Dos vinte e três *primers* testados, nove foram selecionados para análise da diversidade genética de *T. speciosum* (Tabela 1).

Nome	Sequência (5'-3')	Ta(°C)	Tamanho esperado (pb)
mTcCIR7	ATCGAATGACAACCTGGT GCTTCAGTCCTTGCTT	51	160
mTcCIR9	ACCATGCTCCTCCTCA ACATTATACCCCCAACCA	51	274
mTcCIR10	ACAGATGGCCTACACACT CAAGCAAGCCTCATACTC	46	208
mTcCIR11	TTTGGTGATTATTAGCAG GATTGATTGATGTGAG	46	298
mTcCIR17	AAGGATGAAGGATGTAAGAG CCCATACGAGCTGTGAGT	51	271
mTcCIR19	CACAACCCGTGCTGATTA GTTGTTGAGGTTGTTAGGAG	46	376
mTcCIR22	ATTCTCGCAAAACTTAG GATGGAAGGAGTGAAATAG	46	289
mTcCIR26	GCATTCATCAATACATTC GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	298
mTcCIR28	GATCAATCAGAAGCAAACACAT TAAAGCAGCCTACCAAGAAAAG	46	336

Tabela 1. Características de 09 *primers* SSR isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) selecionados para o estudo da diversidade genética em *T. speciosum*. (Ta) Temperatura de anelamento; (pb) pares de bases

As reações de amplificação via PCR foram realizadas em termociclador Biocycler com um volume final de 13 µL, sendo 0,12µL de Taq DNA polimerase (Phoneutria); 1,5µL Tampão 10x [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 50mM KCl, 0,1% de tween, 10mM MgCl<sub>2</sub>]; 0,5µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2µL de *primer* F; 2µL de *primer* R; 3µL de dNTPs; 1µL de DNA; 2,88 µL de água destilada e autoclavada.

O programa de amplificação utilizado foi de acordo com o descrito por Lanaud et al. (1999), com modificações: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 46°C – 51°C (dependendo do *primer* utilizado) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% (m.v<sup>-1</sup>) em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem constante de 85V por aproximadamente quatro horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ngmL<sup>-1</sup>). Em seguida os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com câmera digital.

### Análise dos dados

Os fragmentos de SSR (produtos de amplificação) foram analisados no programa GelQuantPro® (DNR, 2006). O programa Power Marker V.3.25 (LIU e MOUSE, 2005), foi utilizado para a determinação da frequência alélica, diversidade gênica, heterozigosidade observada e esperada e PIC (Conteúdo de informação de polimorfismo). A matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre os indivíduos, gerada pelo programa Power Marker V.3.25, foi importada para o MEGA 6.5 (KUMAR et al, 2004) para a construção do dendrograma utilizando o método UPGMA.

O programa “Structure” (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, 250.000 “burn-ins” e 750.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios de Pritchard e Wen (2004) e também o critério de Evano et al. (2005), sendo os resultados enviados para o site Structure Harvester.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nove locos microssatélites utilizados na genotipagem dos 25 indivíduos de *T. speciosum* foram todos polimórficos e amplificaram 36 alelos, com variação de dois a oito alelos por loco, com média de 4 por primer. O número máximo de alelos (8) foi encontrado no primer (mTcCIR22) e o mínimo (2) nos primers (mTcCIR7, mTcCIR11) (Tabela 2).

Todos os locos apresentaram um elevado conteúdo de informação polimórfica (PIC), (Tabela 2), demonstrando a qualidade dos marcadores, pois segundo Botstein et al. (1980), marcadores que apresentam PIC acima de 0,50 são considerados muito informativos. De acordo com Boza et al (2013), marcadores altamente polimórficos, são úteis na identificação da diversidade genética.

A média da heterozigosidade observada foi de 0,30, apresentando o valor mais alto de 0,88 para os primers mTcCIR22 e mTcCIR19, e não foi observado

heterozigosidade (0) em quatro primers (mTcCIR7, mTcCIR9, mTcCIR17 e mTcCIR2 (Tabela 2).

Loco	Na	He	Ho	PIC
mTcCIR7	2	0,5	0	0,37
mTcCIR9	3	0,44	0	0,39
mTcCIR10	5	0,66	0,4	0,61
mTcCIR11	2	0,21	0,24	0,18
mTcCIR17	3	0,63	0	0,55
mTcCIR19	7	0,84	0,88	0,82
mTcCIR22	8	0,82	0,88	0,79
mTcCIR26	3	0,56	0,32	0,49
mTcCIR28	4	0,66	0	0,58
<b>Total</b>	36	-	-	-
<b>Média</b>	4	0,59	0,30	0,54

Tabela 2. Número de alelos (Na), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e PIC para os 9 primers SSR, com base na amplificação de 25 indivíduos de *Theobroma speciosum* da população amostrada no município de Alta Floresta, MT

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,59, estando sempre acima da observada para a maioria dos marcadores (Tabela 2). Todos os marcadores com exceção do mTcCIR22 e mTcCIR19 apresentaram nível reduzido de heterozigosidade, com valores inferiores a 50%.

Corroborando com esses resultados, Zhang et al. (2012), em estudo com populações de *T. cacao*, utilizando 15 locos microssatélites obtiveram também valores superiores para He (0,56) em comparação com Ho (0,38). Da mesma forma ocorreu para a espécie *T. grandiflorum*, em um estudo com 21 marcadores microssatélites, onde He (0,41) e Ho com (0,35) (Alves et al., 2007). Motamayor et al. (2002) e Sereno et al. (2006) em pesquisas com *T. cacao*, obtiveram valores equivalentes, He = 0,54 e 0,56; Ho = 0,34 e 0,41, respectivamente.

Segundo Dardengo et al. (2018), a baixa taxa de heterozigosidade está associada ao isolamento reprodutivo causado pela fragmentação florestal, pois a redução continua no tamanho das populações as submetem a perda de variabilidade genética por deriva gênica (SEBBENN e ETTORI, 2001). A perda de variabilidade genética no fragmento florestal em estudo pode levar a população de *T. speciosum* a apresentar altos índices de endogamia.

O alto índice de endogamia pode ser explicado pela ação dos dispersores que deixam as sementes perto dos seus parentais, levando a espécie a apresentar um padrão de distribuição agregado. A dispersão de sementes perto da árvore materna

favorece a formação de uma estrutura genética espacial (SILVA et al, 2015), que aumenta a possibilidade de cruzamento entre indivíduos da mesma família, gerando endogamia biparental e consequentemente, depressão por endogamia biparental. Sebbenn et al. (2011), em um estudo com *Copaifera langsdorffii*, relatam que um fragmento urbano pequeno, pode influenciar a distância de dispersão de sementes, pois limita as áreas disponíveis para o estabelecimento das plântulas.

O dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1983) pelo método UPGMA, possibilitou a formação de 2 grupos distintos (Figura 3). O coeficiente de correlação cofenética foi alto (0,87), o que demonstra a confiabilidade do dendrograma ao expressar o agrupamento dos indivíduos, já que a correlação cofenética é uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade ou dissimilaridade com o dendrograma gerado através desta, ou seja, compara as reais distâncias obtidas entre os acessos com as distâncias representadas graficamente sujeitas ao acúmulo de erro (Koop et al, 2007).

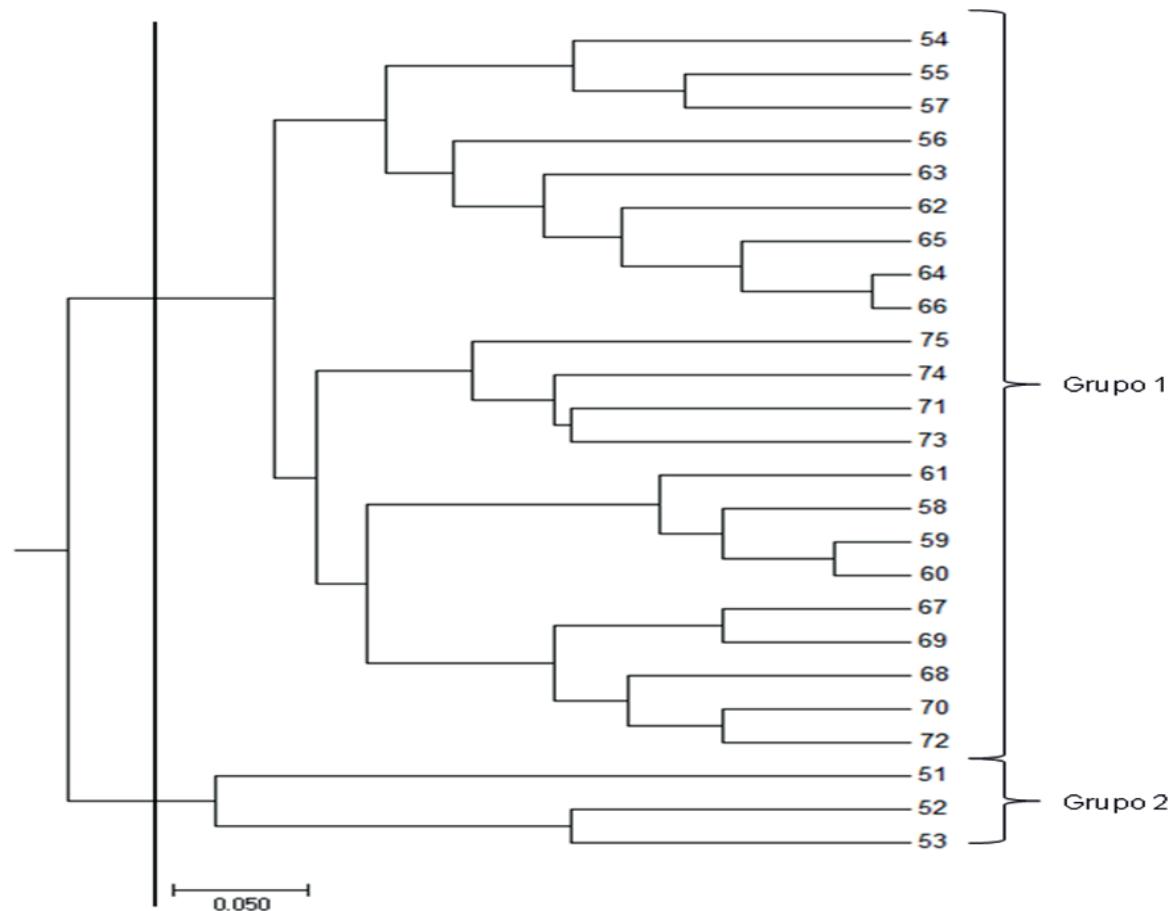


Figura 3. Dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1983), pelo método UPGMA dos indivíduos de *T. speciosum* da população amostrada. Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC): 0,87.

Com base na análise bayesiana determinada pelo “Structure”, verifica-se que os indivíduos estão distribuídos em dois grupos (Figura 4), onde todos alocaram 25 indivíduos respectivamente. Observa-se uma correspondência entre o dendrograma

UPGMA e o agrupamento gerado pelo “Structure”, pois os indivíduos ficaram alocados devidamente dentro de suas populações, entretanto a correspondência não foi completa entre os tipos de subgrupos gerados, isto porque segundo Romão et al. (2011) o agrupamento feito pelo “Structure” tende a gerar uma diferenciação mais profunda de subgrupos.

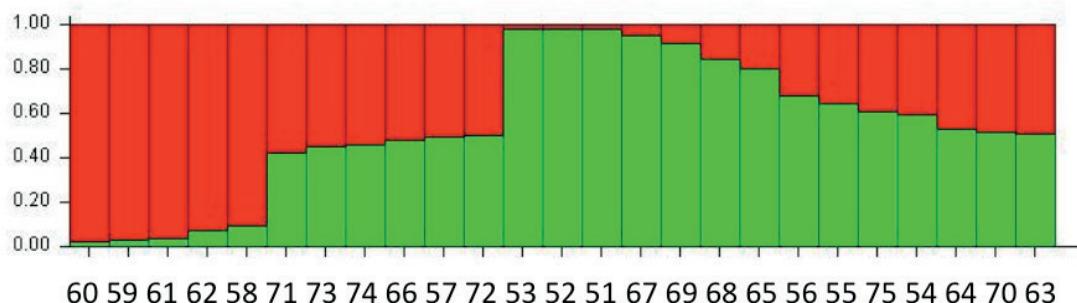


Figura 4. Representação da distribuição dos 25 indivíduos de *T. speciosum* em grupos segundo dados moleculares de 9 primers SSR, utilizando o programa “Structure”. Os indivíduos estão representados por barras verticais com colorações de acordo com o grupo ao qual pertencem (dois grupos,  $K = 2$ ).

## 4 | CONCLUSÃO

A informação genética obtida com os nove locos microssatélites revelou que o processo de fragmentação, até o momento, causou poucas alterações nos níveis de diversidade e na estrutura genética das populações de *T. speciosum*. Entretanto, a redução do número de indivíduos na população aptos à reprodução resultou em alterações nas possibilidades de acasalamentos, promovendo uma diminuição da heterozigosidade observada.

Embora os efeitos tenham sido pequenos, a persistência do processo de fragmentação, poderá reduzir ainda mais a heterozigosidade e favorecer a ação da deriva genética. No decorrer de várias gerações, esses efeitos poderão levar a espécie à depressão por endogamia, perdas de diversidade e alteração da estrutura genética da população.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. M. V. C.; DIAS, L. A. S.; SILVA, A. P. Caracterização agronômica de acessos de cacau. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 44: 368-373, 2009.
- ALVES, R. M.; SILVA, C. R. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, D. C. S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35: 818-828, 2013.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, 32: 314-331, 1980.

BOZA, E. J.; IRISH, B. M.; MEEROW, A. W.; TONDO, C. L.; RODRIGUEZ, O. A.; VENTURA-LÓPEZ, M.; GOMEZ, J. A.; MOORE, J. M.; ZHANG, D.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R. J. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 60: 605-619, 2013.

CARVALHO, T. S.; DOMINGUES, E. P. Projeção de um cenário econômico e de desmatamento para a Amazônia Legal brasileira entre 2006 e 2030. **Nova Economia**, 26 (2): 585-621, 2016.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, Imprensa Nacional, Vol. I, 747p, 1926.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LEDÓ, A. S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 46: 499-508, 2011.

DARDENGO, J. F. E.; ROSSI, A. A. B.; VARELLA, T. L. The effects of fragmentation on the genetic structure of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) populations in Mato Grosso, Brazil. **Revista de Biologia Tropical** 66(1): 218-226, 2018.

DNR Bio-Imaging Systems, **GelQuantPro**. 2006. Disponível em: <http://www.dnr-is.com/Product.asp?Par=3.19&id=81>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 1315, 1990.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14: 2611-2620, 2005.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 652p, 2001.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE**. 2010. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/dtbs/matogrosso/altafloresta.pdf>>, Acesso em: 11/10/2019 às 13:20.

KOOP, M. M.; SOUZA, V. Q.; COIMBRA, J. L. M.; LUZ, V. K.; MARINI, N. OLIVEIRA, A. C. Melhoria da correlação cofenética pela exclusão de unidades experimentais na construção de dendrogramas. **Revista da FZVA**, 14(2): 46-53, 2007

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequencea lignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5: 150-163, 2004.

LANAUD C.; RISTERUCCI A. M.; PIERETTI I.; FALQUE M.; BOUET A.; LAGODA P. J. L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, 8: 2141–2143, 1999.

LIU K.; MUSE S. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, 21: 2128-2129, 2005.

MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication In: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, 89: 308-386, 2002.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, 19: 153-170, 1983.

NETO, G. G.; SILVA, F. H. B. Plantas da Amazônia Mato-Grossense: o cacauí – *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (Malvaceae). **Floret**, 3, 2011.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. Disponível em:

<http://pritch.bsd.uchicago.edu/>, 2004. Acesso em: 11 de outubro de 2019.

PRITCHARD, J; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945–959, 2000.

ROMAO, L. R. C; PERSEGUINI, J. M. K. C.; RUBIANO, L. B.; GONÇALVES, P. S.; MONDEGOM, J. C. M. **Divergência Genética de Seringueira Baseado em Marcadores EST-SSRs**. 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011 9 a 11 de agosto de 2011 – Campinas, SP, 2011.

SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruron urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progêneres misto. **Revista do Instituto Florestal**, 13: 201-211, 2001.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of Heredity**, 106: 134-145, 2011.

SERENO M. L.; ALBUQUERQUE P. S. B.; VENCOVSKY R.; FIGUEIRA A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, 6: 13-24, 2006.

SILVA, B. M., ROSSI, A. A. B., DARDENGO, J. F. E., SILVA, C. R., SILVA, I. V., SILVA, M. L., & SILVA, C. J. Genetic structure of natural populations of *Theobroma* in the Juruena National Park, Mato Grosso State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 14(3), 10365-10375, 2015.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 762p. 1998.

ZHANG, D.; MARTÍNEZ, W. J.; JOHNSON, E. S.; SOMARRIBA, E.; PHILLIPS- MORA, W.; ASTORGA, C.; MISCHKE, S.; MEINHARDT, L. W. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 59: 239-252, 2012.

## EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGO DA ANTRACNOSE – *Colletotrichum acutatum*

Data de aceite: 12/12/2019

**Gabriela Gonçalves Nunes**

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB  
Brasília – DF

**Guilherme Feitosa do Nascimento**

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB  
Brasília – DF

**Lélia Cristina Tenório Leoí Romeiro**

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB  
Brasília – DF

**RESUMO:** Das diversas doenças do moranguero encontra-se a Antracnose, causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum* spp. Essa doença manifesta-se principalmente pelo sintoma denominado flor-preta, causando sérios prejuízos, pois ataca diretamente flores e frutos. Atualmente a principal estratégia de controle deste fungo, é o uso de produtos químicos sobre a cultura. O objetivo do presente estudo foi extrair e avaliar o efeito de cinco óleos essenciais em diferentes concentrações das plantas capim limão (*Cymbopogon citratus*), citronela (*Cymbopogon nardus*), manjericão (*Ocimum basilicum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e sálvia (*Salvia officinalis*). A metodologia utilizada para extração foi por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger, e para a contagem de conídios foi utilizada a Câmara

de Neubauer. Para avaliar o efeito dos óleos no crescimento micelial e germinação de esporos do fungo foram utilizadas alíquotas de 5, 10, 15, 20 e 25  $\mu$ L do óleo essencial, as quais foram distribuídas na superfície da placa com o meio de cultura BDA. Das cinco espécies de plantas utilizadas, em apenas capim-limão e citronela, as quantidades de óleo extraídas foram suficientes para os experimentos delineados. As alíquotas a partir de 15  $\mu$ L inibiram em mais de 60% a germinação e a produção dos esporos isolados quando comparados com a testemunha e com o fungicida. Portanto, o óleo essencial do capim-limão mostrou-se mais efetivo do que o óleo de citronela. Diante disso, os óleos essenciais revelam-se uma propícia alternativa para o desenvolvimento de tratamentos fitossanitários para o uso de doenças em plantas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antracnose. Morango. *Colletotrichum acutatum*. Óleo essencial.

**EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON  
CONDITION GERMINATION AND  
ANTHRACNOSIS FUNGAL MICELIAL  
GROWTH – *Colletotrichum acutatum***

**ABSTRACT:** Among the various diseases of strawberry is anthracnose, caused by the fungus of the genus *Colletotrichum* spp. This disease manifests itself mainly by the symptom called black flower, causing serious damage, as

it directly attacks flowers and fruits. Currently the main control strategy of this fungus is the use of chemicals on the crop. The aim of the present study was to extract and evaluate the effect of five essential oils on different concentrations of lemongrass (*Cymbopogon citratus*), citronella (*Cymbopogon nardus*), basil (*Ocimum basilicum*), thyme (*Thymus vulgaris*) and sage (*Salvia officinalis*) plants. The methodology used for extraction was by hydrodistillation using Clevenger apparatus, and for the counting of conidia the Neubauer Chamber was used. To evaluate the effect of oils on mycelial growth and fungal spore germination, aliquots of 5, 10, 15, 20 and 25  $\mu\text{L}$  of the essential oil were used and distributed on the surface of the plate with BDA culture medium. Of the five plant species used, in lemongrass and citronella only, the amounts of oil extracted were sufficient for the outlined experiments. Aliquots from 15  $\mu\text{L}$  inhibited germination and spore production by more than 60% when compared to the control and fungicide. Therefore, lemongrass essential oil was more effective than citronella oil. Given this, essential oils are a suitable alternative for the development of phytosanitary treatments for the use of diseases in plants.

**KEYWORDS:** Anthracnose. Strawberry. *Colletotrichum acutatum*. Essential oil.

## 1 | INTRODUÇÃO

Entre os maiores países produtores de frutas, destacam-se respectivamente a China, a Índia e o Brasil, juntos geram o equivalente a 43,6% da produção mundial, sendo as suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos (BRASIL, 2015).

Em 2015, o Brasil colheu aproximadamente 41,0 milhões de toneladas de frutas, destas, apenas 2% eram destinadas ao mercado externo, o restante voltado para o mercado interno para consumo in-natura ou processada (TREICHEL et al, 2016).

Dentre as frutas produzidas no Brasil, encontram-se o morango (*Fragaria sp.*), um pseudofruto com produção anual estimada em 105 mil toneladas, sendo as Minas Gerais, o Rio Grande do Sul e São Paulo, os principais estados produtores. Nas últimas décadas, o cultivo expandiu para diferentes tipos de climas e solos até sua chegada ao Distrito Federal (DF) (VIGNOLO et al. 2014).

Segundo o pesquisador Henz (2010), no Distrito Federal a inserção da cultura de morango obteve sucesso em razão da altitude da região e das condições climáticas. Ainda de acordo com ele, as altas temperaturas que ocorrem no verão seguido de um inverno ameno e seco, favorecem de forma positiva para floração, a frutificação e a qualidade dos frutos.

Dentre as cidades-satélites que compõem o Distrito Federal, destaca-se Brazlândia como grande produtora desse cultivar, desempenhando um importante papel na agricultura familiar dessa região (GOMES et al., 2013).

Um dos problemas determinantes na cultura de morango e de outras cultivares

de importância no DF é a ocorrência de doenças que variam na sua forma e fases em que aparecem no ciclo do vegetal, podendo atacar desde as sementes até os frutos. As infestações mais recorrentes são causadas por fungos (TANAKA et al., 2005; SIMON et al., 2005).

Das diversas doenças do moranguero encontra-se a Antracnose, causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum* spp. Essa doença típica e agressiva manifesta-se principalmente pelo sintoma denominado flor-preta, causando sérios prejuízos para a localidades produtoras de morango, pois ataca diretamente as flores e frutos, provocando grande queda na produção. É a doença de maior incidência nos cultivos de moranguero no Brasil e no DF, causando danos durante todo o ciclo, com perdas de até 50% da produção (FRANCO e BETTIOL, 2000).

A antracnose é uma doença que se inicia por meio da germinação dos conídios seguida da produção de apressórios, estruturas que liberam enzimas como cutinases, celulases, pectinases, para viabilizar a entrada das hifas nos tecidos intactos. Dessa maneira, as hifas podem penetrar os tecidos por meio dos estômatos, ferimentos que foram causados por insetos, lesão com deformação superficial sem ruptura da epiderme ou por fatores climáticos. A disseminação pode ocorrer, se a curtas distâncias através do transporte de conídios por meio do vento e chuva; a longa distância a doença pode ser carregada pelas sementes ou por órgãos da planta infectada (SILVA et al., 2014).

Atualmente a principal estratégia de controle deste fungo pelos produtores é o uso químico de substância com efeito fungicida sobre a cultura. Indo na direção oposta, temos um aumento na procura de produtos naturais e orgânicos pela sociedade brasileira, seguindo inclusive uma tendência mundial (CRUZ et al., 2015). Diante disso, várias pesquisas estão tendo como foco principal o desenvolvimento de metodologias de controle de doenças que sejam menos agressivos ao meio ambiente, e nesta circunstância o estudo do uso de óleos essenciais tem se mostrado como uma boa alternativa. Diversas pesquisas apontam a atividade fungitóxica de óleos essenciais extraídos de plantas por meio de diversas técnicas, tais como arraste e hidrodestilação (MORAIS et al., 2009; CRUZ et al., 2015).

Óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos secundários de baixo peso molecular. São sintetizados pelos vegetais para sua proteção e sobrevivência, sendo alguns altamente voláteis em temperatura ambiente. Não se misturam com a água, apresentam um aspecto oleoso e geralmente são extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, folhas ou de plantas inteiras (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais dependem diretamente das concentrações utilizadas, porém as concentrações mínimas inibitórias (CMI) variam conforme alguns fatores, tais como o potencial do óleo extraído da planta;

pela variação no quimiótipo causada por diferenças geográficas entre as plantas coletadas; idade da planta; método de extração do óleo essencial; método utilizado para acessar a atividade antifúngica; local da extração na planta; entre outros fatores (MAIA et al,2015).

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo extraer e avaliar o efeito de cinco óleos essenciais em diferentes concentrações, com propriedades antimicrobianas sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum spp*, das plantas capim limão (*Cymbopogon citratus* Staph), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios LABOCIEN do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB, Brasília, DF, no período de agosto de 2017 a agosto de 2018. Foram utilizadas para a extração de óleo essencial cinco tipos de plantas (capim-limão, citronela, sálvia, tomilho e manjericão), e dos óleos essenciais obtidos em quantidade e qualidade suficiente foram os utilizados para realizar os experimentos. Os diferentes isolados do fungo *Colletotrichum spp.* foram obtidos por meio da coleção da Embrapa (HORTALIÇAS).

### 2.1 Obtenção de óleos essenciais

As plantas utilizadas na obtenção dos óleos essenciais foram cultivadas no espaço destinado à pesquisa do UniCEUB. O critério utilizado para a escolha das espécies foi baseado no potencial de controle que os seus óleos essenciais apresentaram em outros patossistemas. (Tabela 1).

Nome comum	Nome científico
Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i> L.
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i> Staph
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> L.
Citronela	<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle

Tabela 1. Nome comum e científico das plantas avaliadas para a extração dos óleos essenciais.

Para o procedimento da extração dos óleos essenciais foram utilizados material foliar (jovem e maduro), todos frescos de cada espécie. As folhas foram coletadas no período do final da tarde até a noite (entre 18h e 19h), posteriormente as mesmas

foram cortadas em pequenos pedaços e pesadas 150 g de material foliar em um béquer.

Para cada extração foram utilizadas todas as folhas da planta, ou seja, conforme a produção foliar de cada espécie, por isso foi estabelecido um padrão de 150 g, a amostra de material vegetal fresco foi adicionada 500 mL de água destilada dentro do balão de fundo redondo (1000 L), posteriormente o material foi submetido ao processo de hidrodestilação, no aparelho graduado de Clevenger, todo o procedimento durou em média 3 horas. Os óleos essenciais foram extraídos e na sequência separados do hidrolato por decantação e secos por meio de percolação em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Foi realizado o cálculo de rendimento dos óleos essenciais a partir da massa do material (fresco) e a massa do óleo extraído. Ao final foram identificados, protegidos da luz e armazenados à 4°C em vidro âmbar até sua utilização.

Das cinco plantas (capim-limão, citronela, sálvia, tomilho e manjericão) que foram usadas para a extração do óleo essencial, em apenas duas obteve êxito em quantidade e qualidade de óleo para a realização de todos os experimentos propostos, sendo elas: capim-limão e a citronela. Diante disso, as demais plantas foram desconsideradas dos experimentos de propriedades antimicrobianas no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

## 2.2 Obtenção do inóculo de *Colletotrichum acutatum*

Os isolados do fungo *Colletotrichum acutatum* mais comum em morango foram obtidos por meio da coleção da Embrapa, dois deles, isolado 645 e isolado 754 foram selecionados aleatoriamente para o experimento. Para a recuperação do isolado realizou-se repicagem do mesmo em placas de Petri com meio de cultura Agar Batata Dextrose - BDA. As placas foram acondicionadas em estufa a 25°C, com fotoperíodo.

## 2.3 Efeito in vitro dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*

Para avaliação do efeito dos óleos sobre a germinação dos conídios foram testados dois óleos essenciais: citronela e capim-limão nas seguintes concentrações (em  $\mu\text{L}$ ) 5; 10; 15; 20 e 25.

Após o crescimento dos dois isolados em placas BDA, adicionou-se 10 mL de água destilada autoclavada em cada placa, em seguida a superfície de cada colônia foi raspada utilizando-se a alça de drigalski. Após a raspagem, cada amostra foi filtrada com auxílio de gazes e com auxílio de um funil pequeno, o filtrado foi depositado em um béquer identificado, limpo e autoclavado.

Para cada delineamento experimental foram preparados sete tubos de microcentrífuga de 2 mL (tipo eppendorf), sendo assim distribuídos: tubo 01

testemunha, tubos 02 a 06 com óleo essencial distribuídos em concentrações diferentes, e no tubo 07 o fungicida sulfato de cobre (dimy).

Ao total foram dois isolados (645 e 754) e dois óleos essenciais (capim-limão e citronela). Portanto, foram usados o isolado 645 com os óleos essenciais capim-limão e citronela, e isolado 754 com os óleos essenciais capim-limão e citronela. Em cada combinação (isolado x óleo essencial) foram utilizados sete tubos de microcentrífuga com 2 mL de filtrado obtido de cada isolado. O tubo 01 de cada delineamento foi marcado como testemunha, os tubos de 2 a 6 foram adicionados os respectivos óleo-essenciais nas concentrações (5; 10; 15; 20 e 25  $\mu$ L), e no tubo 07 foi adicionado o fungicida (10%). Foram realizadas três repetições para cada delineamento.

Após homogeneização, os tubos foram colocados em incubação por 24h, à temperatura de 25,  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação iniciou a quantificação dos conídios. A quantificação da germinação dos conídios foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer (hemacitômetro). Foram considerados como germinados os conídios com tubos germinativos apresentando comprimento igual ou superior à dimensão do esporo.

### *2.3.1 Avaliação do crescimento micelial*

Foi utilizado o meio de cultura BDA, o qual foi preparado, autoclavado e, após o resfriamento deste para temperatura ambiente, foi vertido cerca de 25 ml em placas de petri até solidificar o meio. Sobre a superfície do meio foram adicionadas as concentrações de 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, 20  $\mu$ L e 25  $\mu$ L dos óleos de citronela e capim limão para cada isolado do fungo, além de adicionados 20  $\mu$ L do fungicida comercial (sulfato de cobre) para comparação do efeito fungicida em relação ao tratamento com os óleos. Para a preparação da solução com o fungicida adicionou-se 0,1 g em 1 mL de água destilada (10%). Já as testemunhas continham apenas o meio de cultura e o fungo, o experimento foi realizado em triplicatas para cada concentração e isolado, ou seja, totalizando vinte uma placa para cada isolado. Em seguida as placas foram riscadas, dividindo-as em quatro quadrantes. Foi depositado um disco de micélio (aproximadamente 1 cm de diâmetro) do patógeno para o centro de cada placa, após isso, as placas foram vedadas com papel filme e mantidas a 25,  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Ocorreram avaliações diárias, sendo que as medições correspondem à média de duas medidas diametralmente com a utilização de um paquímetro, isto foi realizado até que o micélio da testemunha ocupasse toda a superfície da placa. Então se calculou o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), determinado pela adaptação da fórmula proposta por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \Sigma (\text{D}-\text{Da}) /$$

N Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Em seguida, foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação a testemunha e ao fungicida.

Todo o experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições sendo cada parcela constituída por uma placa de Petri. Os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5%. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção das plantas para a extração dos óleos essenciais foi baseada na literatura especializada. Devido à especificidade de algumas espécies de plantas selecionadas (sálvia, tomilho e manjericão), o rendimento do óleo essencial obtido foi abaixo do esperado, sendo necessário maior massa de folhas e a obtenção de mais matrizes, o que aumentaria muito o tempo de realização do experimento. Alguns autores citam as dificuldades de obtenção do óleo essencial para algumas espécies devido à fatores ambientais, morfológicos e metodológicos.

De acordo com Costa e colaboradores (2011), um dos vários fatores que afetam o rendimento do óleo essencial correlaciona-se com os fatores ambientais, tais como a temperatura, intensidade da radiação solar, solo e outros. Ainda de acordo com os autores, também devem ser considerados fatores experimentais, como: a matriz utilizada, a extração realizada pelo destilador, a etapa de extração com solvente e os cuidados com o armazenamento.

Indo nesta mesma direção, Mesquita e colaboradores (2016) cita que as espécies selecionadas para a extração do óleo essencial podem apresentar diferenças em suas estruturas secretoras desse óleo, bem como suas respectivas localizações na planta. Ainda de acordo com eles, a composição química do óleo pode apresentar certa resistência à degradação térmica, gerando então uma grande variabilidade na obtenção e na perda desses metabólitos.

Das plantas citronela e capim-limão obtiveram-se óleos essenciais em quantidades suficientes para o delineamento experimental. O rendimento desses óleos essenciais de foram bem parecidos. Ambos foram calculados em relação à massa fresca, sendo em média de 0,44% ( $\text{mL.g}^{-1} \cdot \%$ ) para o capim-limão e de 0,55% ( $\text{mL.g}^{-1} \cdot \%$ ) para citronela. A extração do óleo essencial foi realizada em quadruplicata e os resultados apresentados foram a média dos valores obtidos para cada um dos óleos.

Com relação à coloração e ao cheiro característico, os óleos essenciais

extraídos da citronela apresentaram uma coloração amarela parda e aroma forte peculiar, semelhante ao óleo comercial. Já para o capim-limão, a coloração foi mais clara, também com aroma característico da planta.

Quanto à atividade do óleo essencial contra o fungo *Colletotrichum acutatum* houve redução do crescimento micelial dos dois isolados (645 e 754) em função das alíquotas crescentes do óleo estudado (Figura 01 e 02). Observa-se nos resultados obtidos, que o óleo essencial de capim limão foi mais eficiente na redução do crescimento micelial quando comparado com o de citronela e estes com a testemunha.

Os resultados corroboram com os achados da pesquisa de Lorenzetti e colaboradores (2011), quando em seus achados os óleos de capim limão e de canela mostram-se ser mais efetivos em seus isolados resistentes quando comparados com outros óleos essenciais utilizados no experimento, dentre eles os de citronela.

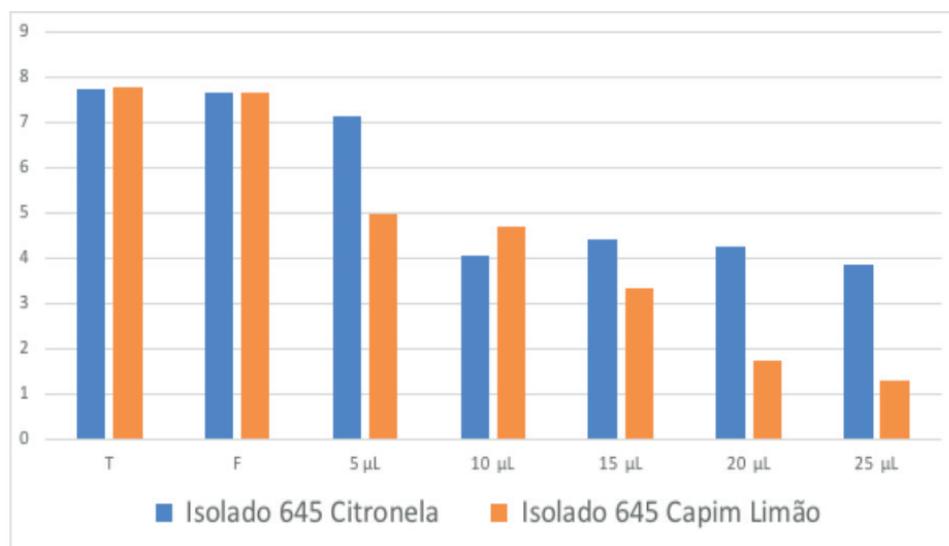


Figura 01. Crescimento micelial (cm) "in vitro" do isolado 645 de *C. acutatum* submetido a diferentes alíquotas (T, F, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 20 $\mu$ L e 25 $\mu$ L) do óleo essencial de citronela e capim-limão. T= testemunha (alíquota sem óleo essencial) e F = fungicida comercial vendido em comércios para jardinagem ornamental - Sulfato de cobre.

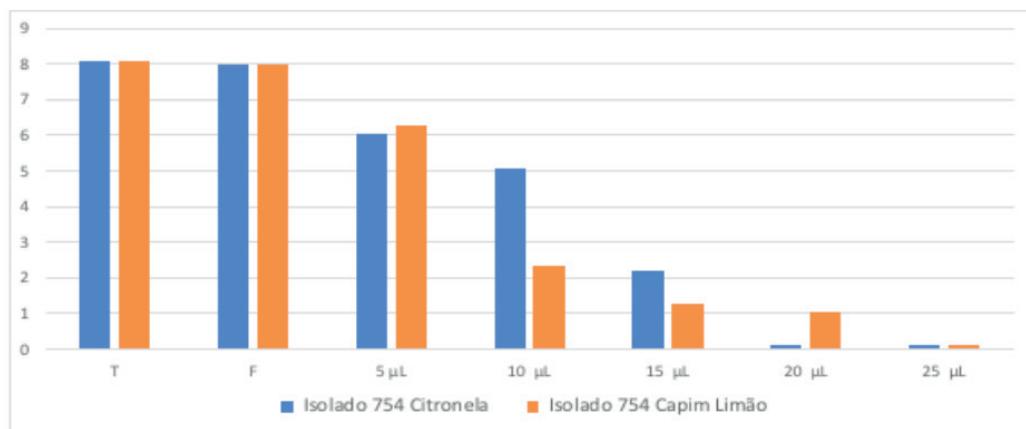


Figura 02. Crescimento micelial (cm) "in vitro" do isolado 754 de *C. acutatum* submetido a diferentes alíquotas (T, F, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 20 $\mu$ L e 25 $\mu$ L) do óleo essencial de citronela e capim-limão. T= testemunha (alíquota sem óleo essencial) e F = fungicida comercial vendido em comércios para jardinagem ornamental - Sulfato de cobre.

Sobre a inibição da germinação de conídios e de formação dos apressórios, o óleo essencial de capim limão se mostrou mais eficiente que a citronela. No tratamento a partir de 15  $\mu$ L de óleo essencial capim limão, ocorreu uma taxa de inibição de 60% da germinação de conídios e de formação dos apressórios, chegando a mais de 90% quando comparados com os tratamentos acima de 20  $\mu$ L de óleo essencial e a testemunha. O sulfato de cobre, fungicida comercial, obteve taxa de inibição de 65% da germinação de conídios e de formação dos apressórios.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cruz e colaboradores (2015), que observaram inibição de modo crescente em seus isolados utilizando o óleo de citronela. Eles verificaram uma redução de mais de 90% de germinação em alíquotas com 15  $\mu$ L de óleo, chegando a praticamente 99% na alíquota com 30  $\mu$ L.

Ainda corroborando com Cruz e colaboradores (2015), os nossos achados (figura 03 e 04), de óleo essencial de citronela se mostrou eficiente na redução do crescimento micelial contra três isolados do fungo fitopatógeno *Fusarium solani* e em relação a germinação dos conídios, houve redução em mais de 90% na menor concentração (Figura 05). Estes resultados corroboram aos obtidos no presente trabalho.

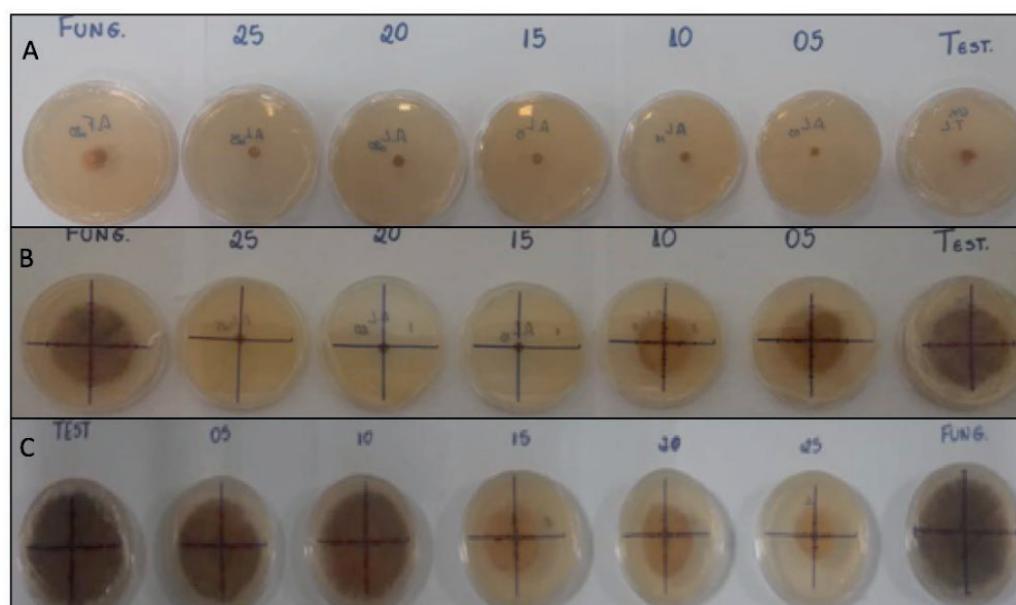


Figura 03: Fotos do crescimento Crescimento micelial obtidas no (A) 1º, (B) 7º e (C) 15º dias após 24h da inoculação com o isolado 645 e o óleo essencial capim-limão. Fung= placa com fungicida; 05 a 25 = quantidade em  $\mu$ L de óleo essencial usada em cada placa e Test = testemunha, placa de Petri apenas com o inóculo.

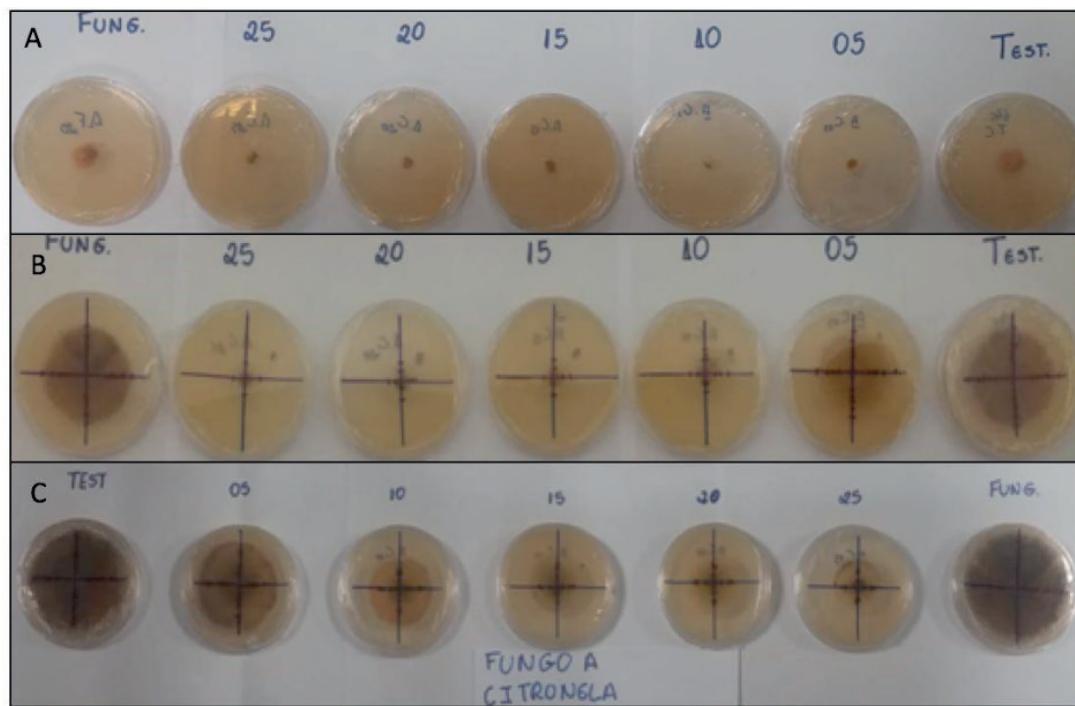


Figura 04: Fotos do crescimento Crescimento micelial obtidas no (A) 1°, (B) 7° e (C) 15° dias após 24h da inoculação com o isolado 645 e o óleo essencial citronela. Fung= placa com fungicida; 05 a 25 = quantidade em  $\mu\text{L}$  de óleo essencial usada em cada placa e Test = testemunha, placa de Petri apenas com o inóculo.

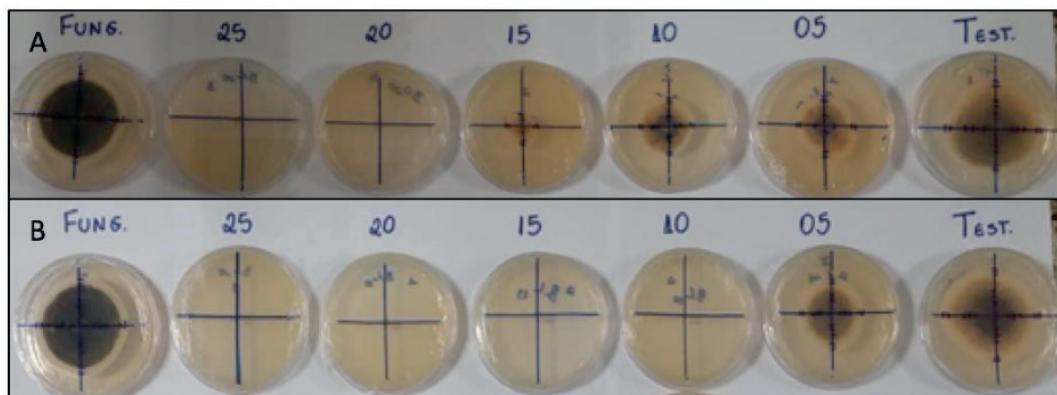


Figura 05: Fotos do crescimento Crescimento micelial obtidas no 15° dia após 24h da inoculação com os isolados 754 e em A) óleo essencial capim-limão e em B) óleo essencial citronela. Fung= placa com fungicida; 05 a 25 = quantidade em  $\mu\text{L}$  de óleo essencial usada em cada placa e Test = testemunha, placa de Petri apenas com o inóculo.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim sendo, os óleos essenciais de *C. winterianus* e *C. citratus* se mostraram eficientes tanto na avaliação do crescimento micelial quanto na germinação de conídios, porém o efeito inibidor do óleo de Citronela se mostrou mais promissor no tratamento do isolado Coll 645 (fungo A) na avaliação do crescimento micelial. Se faz necessário maiores estudos para se obter a concentração de óleo essencial ideal que reduza 100% a atividade do patógeno, conclui-se então que é preciso ser

feito mais testes com esses dois óleos em concentrações maiores que 25  $\mu$ L para se obter melhores resultados.

Dessa forma, observa-se que os óleos essenciais apresentam uma nova alternativa para o manejo de doenças relacionadas à fungos.

A identificação de componentes presentes nos óleos essenciais que exercem efeito no controle de doenças, torna-se uma ferramenta importantíssima para a indústria química quanto ao desenvolvimento de novos produtos.

No mesmo rumo temos o avanço da agricultura orgânica, aliadas ao mercado consumidor mais consciente e exigente por produtos desenvolvidos em práticas agrícolas menos agressivas, o uso de óleos essenciais podem ser uma boa escolha, pois além de aliar as características de controle de doenças, é de baixa toxicidade e fácil de manusear e aplicar.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL- Departamento de Economia Rural. 2015.

COSTA, A. R. T., et al. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais. v.13, n. 2, p. 240-245, 2011.

COSTA, O. B.; MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. **Rendimento do óleo essencial de duas espécies do cerrado: *Myracrodroon urundeava* (Allemão) e *Blepharocalyx salicifolius* (kunt) o. berg em diferentes horários de coleta.** In: V Congresso Florestal Latinoamericano, 2011, Lima. El futuro del mundo depende de los bosques. Lima: UNALM, 2011. v. 1. p. 1-8.

CRUZ, T. P., et al. **Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* jowit (citronela) contra *Fusarium solani*.** Biosci. J. Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 1-8, jan/fev. 2015.

FRANCO, D. A.; BETTIOL, W. **Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos.** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, p. 602-606, 2000.

GILLES, M., et al. **Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species.** Food Chemistry. v.119, p. 731-737, 2010.

GOMES, K. B. P, et al. **Diagnóstico da cadeia produtiva do morango dos agricultores familiares do Distrito Federal.** Revista EIXO, Brasília - DF, v. 2 n. 2, 2013.

HENZ, G. P. **Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal.** Horticultura Brasileira, v. 28, n. 3, p. 260-265, 2010.

KOSOSKI, R. M, et al. **Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro.** Fitopatol. bras. [online]. 2001, v. 26, n. 3, p. 662-666.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. **Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de plantas.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MESQUITA, T.J. B, et al. **Influência da temperatura e tempo de secagem na obtenção de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*).** In: Anais do Congresso Brasileiro de

MORAIS, L; GONÇALVES, G.; BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**- v. 17, 2009.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – **Escola Superior de Agricultura de Lavras**, Lavras, 1999.

ROCHA, R. P. et al. **Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho**. **Rev. Ceres**. v. 59. n. 5. Viçosa Sept./Oct. 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034737X2012000500021&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034737X2012000500021&lang=pt). Acesso em: 27 de abril de 2017.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., et al. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos**. Seminário de Atualidades em Proteção Florestal. 2000.

SILVA, M. R. L. et al. **Antracnose no café: doença emergente. Cultivar grandes culturas**. n. 177. ISSN. 1516-358X. fev. 2014. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/doenca-emergente>>. Acesso em: 01 de maio de 2017.

SIMON, N.; MENEGUZZO, A; CALGARO, A. **Doenças causadas por fungos e bactérias**. In: SANHUEZA, R.M.V.; HOFFMANN, H.; ANTUNES, L.E.C.; FREIRE, J. M. Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do Nordeste. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 26 de abril de 2017.

TANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. Doenças do morango. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. v. 2, p. 489-499.

TREICHEL, M. et al. Anuário brasileiro da fruticultura 2016. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 88p. 2016. Disponível em: <[http://www.grupogaz.com.br/tratadas/edicao/4/2016/04/20160414\\_0d40a2e2a/pdf/5149\\_2016fruticultura.pdf](http://www.grupogaz.com.br/tratadas/edicao/4/2016/04/20160414_0d40a2e2a/pdf/5149_2016fruticultura.pdf)> Acesso em 01 de maio de 2017.

VIGNOLO, G., REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C.; ALDRIGHI, M.; **Panorama do cultivo dos morangos no Brasil. Campo e Negócio – Hortifruti**. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/116016/1/CampoNegocio-DEZ-2014-Panorama.pdf>> Acesso em 02 de maio de 2017.

WOLFFENBÜTTEL, A.N. **Óleos Essenciais**, 2007. Disponível em: [http://www.oleoessencial.com.br/artigo\\_Adriana.pdf](http://www.oleoessencial.com.br/artigo_Adriana.pdf). Acesso em: 27 de abril de 2017.

## ESTRUTURA GENÉTICA DE MANDIOCAS CULTIVADAS NA AMAZÔNIA NORTE MATO-GROSSENSE

Data de aceite: 12/12/2019

### **Auana Vicente Tiago**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - PPGBionorte, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Ana Aparecida Bandini Rossi**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado. Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, PGMP, PPGBioAgro e PPGBionorte, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Eliane Cristina Moreno de Pedri**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - PPGBionorte, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Fernando Saragosa Rossi**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos – PPGBioAgro, Alta Floresta, Mato Grosso.

### **Vinicius Delgado da Rocha**

Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento – PPGGM, Viçosa, Minas Gerais.

### **Joameson Antunes Lima**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – PGMP, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide**

Pesquisadora da Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop, Mato Grosso.

### **Larissa Lemes dos Santos**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Graduanda do curso de Ciências Biológicas, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Elisa dos Santos Cardoso**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - PPGBionorte, Alta Floresta – Mato Grosso.

### **Sérgio Alessandro Machado Souza**

Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Reyes Maldonado. Professor Adjunta da Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, PGMP, PPGBioAgro, Alta Floresta – Mato Grosso.

**RESUMO:** Os marcadores genéticos têm aplicação importante na caracterização da diversidade dos recursos genéticos, pois permitem quantificar a diversidade genética, estimar a endogamia e caracterizar novas espécies. Portanto, o objetivo deste estudo foi

avaliar a estrutura genética de etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites. Um total de 29 etnovariedades de mandioca foram coletadas. A extração do DNA seguiu protocolo de CTAB. As reações de amplificação foram realizadas com 15 *primers* SSR marcados com fluorescência. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Structure e GenAIEx. O número mais provável de grupos que contribuíram para a composição genética dos cultivos de mandioca foi verificado pelo  $\Delta K$ , indicando a formação de dois grupos genéticos distintos entre as etnovariedades. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou 99% de variação dentro dos grupos obtidos com a análise do Structure (K1 e K2). A baixa variação entre os grupos (1%) também foi confirmada pelo Fst, com valor de 0,009. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) contribuiu com os resultados encontrados na análise de estrutura populacional. A PCoA1 explicou 8,13% da variação genética, seguido da PCoA2 com 6,38%. Juntas explicaram 14,51% da variação genética. As etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, Mato Grosso apresentam estruturação genética. Há variabilidade genética intragrupo, indicando que as etnovariedades cultivadas em roças constituem uma forma de recurso genético que deve ser conservada, pois apresentam potencial para serem utilizadas em programas de melhoramento.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Manihot esculenta*; Microssatélites; Recursos genéticos.

## GENETIC STRUCTURE OF CASSAVA CULTIVATED IN THE AMAZON NORTHERN MATO GROSSO

**ABSTRACT:** The genetic markers have important application for characterization of the genetic resources diversity. They are used for estimation genetic diversity, inbreeding and characterization of new species. In this study, we analyzed the genetic structure of cassava landraces that are cultivated in Alta Floresta, Mato Grosso State (MT). We collected 29 landraces. The DNA extraction followed CTAB protocol. The amplification reaction were performed using 15 SSR primers labeled by fluorescence. Date were analyzed using Structure and GenAIEx programs. The landraces were clustered into two genetic group, such as it was indicated by  $\Delta K$  (the more probable number of groups). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed 99% of variation are within groups (K1 e K2), which were obtained by analysis of Structure. The low variation between groups (1%) was supported by Fst (0.009). The principal coordinates analysis (PCoA) contributed with findings in population structure analysis. The PCoA1 and PCoA2 explicated 8.13% and 6.38% of the genetic variation, respectively; they together explicated 14.51% of the genetic variation. The cassava landraces, that are cultivated in Alta Floresta, MT, have genetic structure. There is genetic variability intragroup, thus the landraces, which grown on farms, are a kind genetic resources that should be conserved because they have potential for use in breeding program.

**KEYWORDS:** *Manihot esculenta*, Microsatellites, Genetic Resources.

## 1 | INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae, sendo a única espécie cultivada dentro do gênero *Manihot* com 98 espécies já identificadas, seu centro de domesticação inclui as regiões de Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre (NASSAR et al., 2008; OLSEN & SCHAAAL, 1999; ALLEN, 1987).

A mandioca é cultivada em praticamente todas as regiões e representa a segunda mais importante fonte de amido no Brasil (FIORDA et al., 2013). Atualmente, o Brasil encontra-se em quarto lugar entre os maiores produtores mundial de mandioca, ficando atrás da Nigéria, Tailândia e Indonésia (FAO, 2016).

A alta produtividade de mandioca está atrelada a disponibilidade de inúmeras etnovariedades, que em sua maioria, são cultivadas por agricultores familiares em suas roças (EMBRAPA, 2014). As roças, sob o ponto de vista genético, constituem uma importante fonte de diversidade genética, além de serem fontes de novos materiais genéticos, conhecidas como variedades tradicionais ou etnovariedades principalmente para características específicas não encontradas nos materiais melhorados (FARALDO et al., 2000).

O número de variedades com diferentes características morfológicas é dado pela sua heterozigosidade, favorecida pelos cruzamentos naturais intra-específicos e propagação vegetativa (LORENZI, 2003). Pela significativa diversidade que se encontra neste sistema de cultivo, diversos trabalhos têm sido realizados, apresentando resultados com valores consideráveis de diversidade genética (GONÇALVES et al., 2017; SOUZA SILVA et al., 2016; COSTA et al., 2013).

Os marcadores genéticos têm importante aplicação na caracterização da diversidade dos recursos genéticos, pois permitem quantificar a diversidade genética, estimar a endogamia, caracterizar novas espécies e avaliar o histórico de dispersão (FREELAND, 2005). Dentre os marcadores disponíveis, destaca-se os microssatélites que são densamente encontrados nos genomas dos eucariotos, os quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, além de sua natureza codominante que permite a separação de indivíduos homozigotos de heterozigotos (BORÉM & CAIXETA, 2016).

Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar a estrutura genética entre 29 etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Durante o desenvolvimento do trabalho realizou-se visitas a campo nas

propriedades rurais no município de Alta Floresta-MT, para um levantamento das etnovariedades de mandioca cultivadas nas roças dos agricultores. No decorrer da pesquisa foi selecionado o maior número possível de etnovariedades, desconsiderando os indivíduos denominados pelo mesmo nome, ou seja, as etnovariedades duplicadas. Foram coletadas folhas jovens das 29 etnovariedades de mandioca selecionadas nas roças dos agricultores (Tabela 1). O material coletado foi inserido em tubos de polipropileno de 2,0 mL, contendo tampão de carregamento (1 mL de solução saturada de NaCL-CTAB, 70g de NaCL, 3g de CTAB dissolvido em 200 mL de água destilada) (Figura 1A e 1B) e armazenado em geladeira (4°C) no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) do Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional (CEPTAM), Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus de Alta Floresta, MT para posterior extração de DNA.

Para extração do DNA (Figura 1C e 1D) utilizou-se de aproximadamente 100 mg de tecido foliar, de acordo com o método de CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio), descrito por DOYLE & DOYLE (1990), com modificações: Tampão STE (130 g de sacarose, 4,5 mL de Tris HCl 1M, 15 mL de EDTA 0,5M, completando o volume com água destilada para 1500 mL) (BHATTACHARJEE et al., 2009) para macerar as folhas ao invés de nitrogênio líquido, aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2% e de  $\beta$ -mercaptoetanol de 0,2% para 2% no tampão de extração, além da redução do tempo de incubação a 65°C de 60 min. para 30 min. A verificação do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com gel Red (Figura 1E e 1F), após a quantificação do DNA extraído em um Nanodrop 2000 (Figura 1G) procedeu-se uma diluição de todas as amostras a uma concentração de 100 ng/ $\mu$ L.

Código	Etnovariedade	Origem/Localidade
AFCR1	Cacau Roxa	Alta Floresta
AFCA2	Cacau Arara	Alta Floresta
AFMC3	Mandioca Cenoura	Alta Floresta
AFCB4	Cacau Branca	Alta Floresta
AFCP5	Cacau Pinheiro	Alta Floresta
AFMP6	Mandioca Pão	Alta Floresta
AFMV7	Mandioca Vassourinha	Alta Floresta
AFBC8	Branca Comum	Alta Floresta
AFMA9	Mandioca de Ano	Alta Floresta
AFME10	Mandioca Eucalipta	Alta Floresta
AFBBA11	Branca do Baiano	Alta Floresta

AFBBB11	Branca do Baiano	Alta Floresta
AFCA12	Cacau Amarela	Alta Floresta
AFMAI13	Mandioca Amarela I	Alta Floresta
CAMAI14	Mandioca Amarela II	Carlinda
AFMFSC16	Mandioca de Fritar sem Cozinhar	Alta Floresta
PRMAIII17	Amarela III	Paraná
BAAB18	Amarela da Bahia	Bahia
AFMFR19	Mandioca da Folha Roxa	Alta Floresta
AFM3M20	Mandioca 3 meses	Alta Floresta
AFCC21	Cacau Copinha	Alta Floresta
AFMFII22	Mand.fritar s/cozinhar II	Alta Floresta
AFMAFF23	Mandioca Amarela Folha Fina	Alta Floresta
AFMP24	Mandioca Pêssego	Alta Floresta
AFMB25	Mandioca Batatinha	Alta Floresta
AFMP26	Mandioca Pramuquem	Alta Floresta
BAMBPB27	Mandioca da Bahia (polpa branca)	Bahia
AFA28	Antena	Alta Floresta
AFP29	Paraguaia	Alta Floresta

Tabela 1. Etnovariedades de mandioca coletadas no município de Alta Floresta, MT.

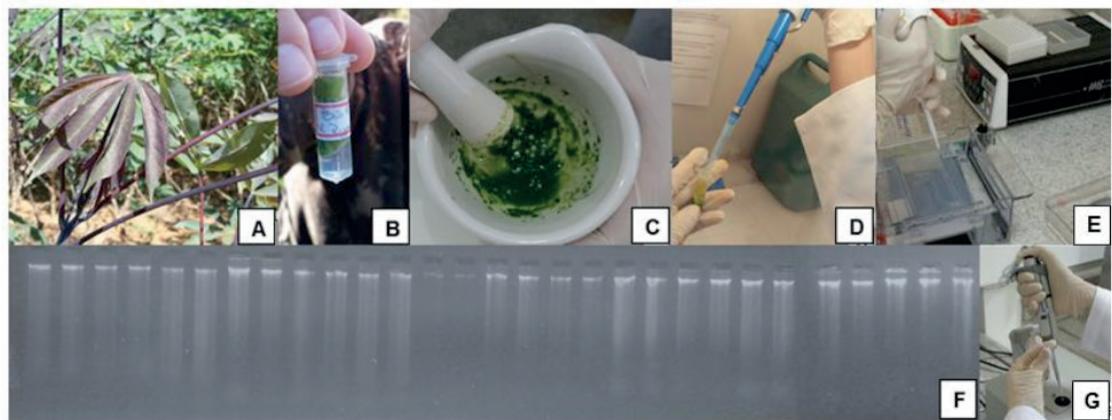


Figura 1. Extração de DNA e amplificação via PCR das etnovariedades de mandioca. A e B) Coleta de material foliar nas roças dos agricultores em tampão de carregamento; C e D) Extração de DNA; E) Quantificação do DNA extraído; F e G) Eletroforese em gel de agarose 1% e DNA extraído.

As reações de amplificação foram realizadas das 29 amostras com 15 *primers* SSR (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1998; MBA et al., 2001), marcados com as fluorescências 6-FAM e HEX, em um volume final de 10  $\mu$ L (Figura 2A). Em seguida as amostras foram colocadas em placas, identificadas e enviadas ao Centro de Estudo do Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo (USP).

As genotipagens dos microssatélites foram realizadas em eletroforese capilar no Analisador Automático de DNA ABI 3130XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA).

Posteriormente, o tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um DNA de tamanho conhecido Rox 500 (APPLIED BIOSYSTEMS) utilizando o programa GeneMarker (v. 2. 6. 3) (Figura 2B e 2C).

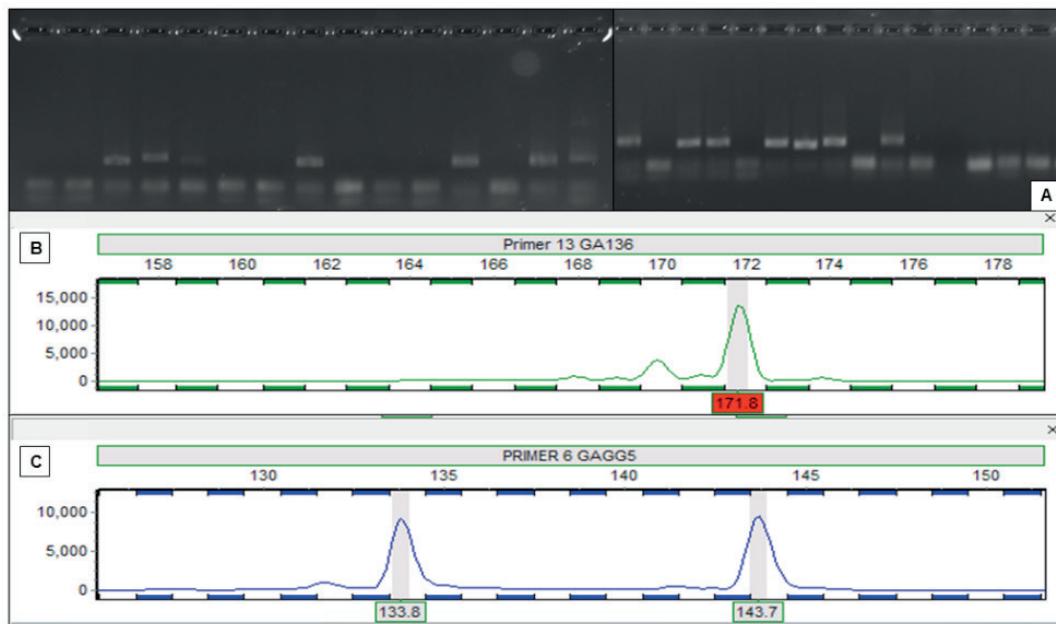


Figura 2. Amplificação via PCR utilizando *primers* microssatélites. A) Visualização da qualidade das amostras amplificadas para genotipagem em gel de agarose 1,5%; B e C) Picos de fluorescência emitidos pela marcação HEX (verde), indivíduo homozigoto, loco GA136 e FAM (azul), indivíduo heterozigoto, loco GAGG5.

O programa “Structure” versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), baseado no modelo de agrupamento Bayesiano, foi utilizado para inferir número de grupos (K), usando Markov chain Monte Carlo (MCMC). Para determinar o melhor K encontrado na população utilizou-se do arquivo de saída do “Structure” baseado no STRUCTURE HARVEST (EARL & VONHOLDT, 2012) determinado pelo  $\Delta K$ .

Com os dados particionados em dois grupos (K=2), conforme obtido pelo programa Structure, foi possível realizar uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) para revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre os grupos de etnovariedades de mandioca. A Análise da Coordenadas Principais (PCoA), foi utilizada para demonstrar a distância genética entre os indivíduos da população pela representação gráfica, permitindo a visualização da estruturação genética entre os indivíduos e populações amostradas. Tanto a Amova quanto a PCoA foram realizadas com o auxílio do programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número mais provável de grupos que contribuíram para a composição genética dos cultivos de mandioca foi verificado pelo  $\Delta K$ , indicando a formação de dois grupos genéticos distintos entre as amostras avaliadas (Figura 3). O grupo I constituiu-se de dezoito etnovariedades e o grupo II de onze etnovariedades de mandioca.

Gonçalves et al. (2017) estudando a diversidade genética de cinquenta e um acessos tradicionais de mandioca doce em quatro municípios do estado de Minas Gerais, revelou a formação de quatro grupos distintos, de acordo com o  $\Delta K$ , sendo observada mistura entre as quatro subpopulações formadas. Assim como também constatado neste estudo, onde o grupo verde teve uma mistura do grupo vermelho e vice-versa. Apesar de todos os 29 indivíduos terem sido coletados no município de Alta Floresta, quatro amostras têm como procedência o município de Carlinda-MT (CAMALI14) e os estados do Paraná (PRMALI17) e Bahia (BAAB18 e BAMBPB27), sendo que três das quatro ficaram alocadas no grupo II (verde).

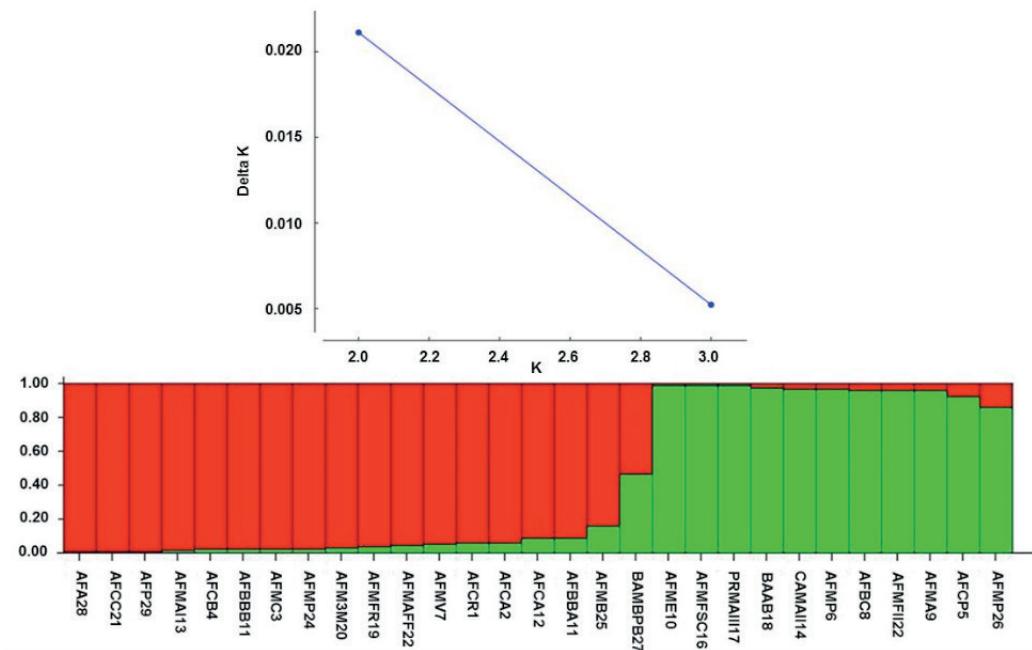


Figura 3. Agrupamento das 29 etnovariedades de mandioca obtidos por meio do programa “Structure” utilizando 15 *primers* SSR, assumindo K=2 (grupos).

O resultado da AMOVA revelou que a maior diversidade genética ocorre dentro dos grupos obtidos com a análise do Structure (99%) (Tabela 2), sugerindo que há variabilidade a ser explorada em cada um dos referidos grupos, ou seja nas roças dos agricultores pesquisados.

Costa et al. (2013), avaliando a diversidade genética e estrutura populacional de mandioca doce encontrou valor de 77% de variação dentro dos grupos. A baixa variação entre os grupos (1%) também pode ser confirmada pelo  $F_{ST}$ , que estima a diferenciação genética entre os grupos (WRIGHT, 1978). Neste estudo o valor

de Fst foi de 0,009, que de acordo com a classificação de Hartl & Clarck (2010) é considerada como pequena diferenciação genética.

Fonte de Variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup>	VT (%) <sup>4</sup>	Valor de P <sup>5</sup>	Fst <sup>6</sup>
Entre grupos	1	22.315	0,183	1%	<0,098	0,009
Dentro de grupos	27	532.858	19,735	99%		
Total	28	555.172	19.919	100%		

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os 29 indivíduos de etnovariedades de mandioca divididos em duas populações de acordo com o resultado obtido pelo programa “Structure”.

<sup>1</sup>GL, grau de liberdade; <sup>2</sup>SQ, soma dos quadrados; <sup>3</sup>CV, componentes de variância; <sup>4</sup>VT, variância total; <sup>5</sup>P, probabilidade de significância e <sup>6</sup>Fst, índice de fixação entre populações.

A análise de Coordenadas Principais (PCoA) contribuiu com os resultados encontrados na análise de estrutura populacional, separando os indivíduos em grupos. A PCoA revelou a formação de seis grupos, com mistura dos indivíduos entre os grupos, assim como revelado no programa Structure, bem como pela AMOVA que revelou uma baixa diferenciação entre os grupos.

A primeira coordenada (PCoA1) explicou 8,13% da variação entre os indivíduos (Figura 4), seguido da segunda (PCoA2) com 6,38% do total da variação. Juntas as duas coordenadas, PCoA1 e PCoA2, foram capazes de explicar 14,51% da variação genética existente entre as etnovariedades amostradas. Os pontos mais distantes na figura são considerados os acessos mais divergentes e os mais próximos, os mais similares entre si.

Costa et al. (2013) pesquisando 66 acessos de mandioca doce no estado do Paraná, obteve valores para as duas Coordenadas Principais de 53,25% da variação total. Ferreira (2014), trabalhando com 61 acessos de mandioca de mesa, em Campo Grande, MS, acumularam 53,34% da variação genética. Ambos os trabalhos apresentaram valores diferentes ao encontrado nesta pesquisa para o resultado da PCoA, porém todos os autores obtiveram variação genética entre os acessos estudados, assim como neste trabalho.

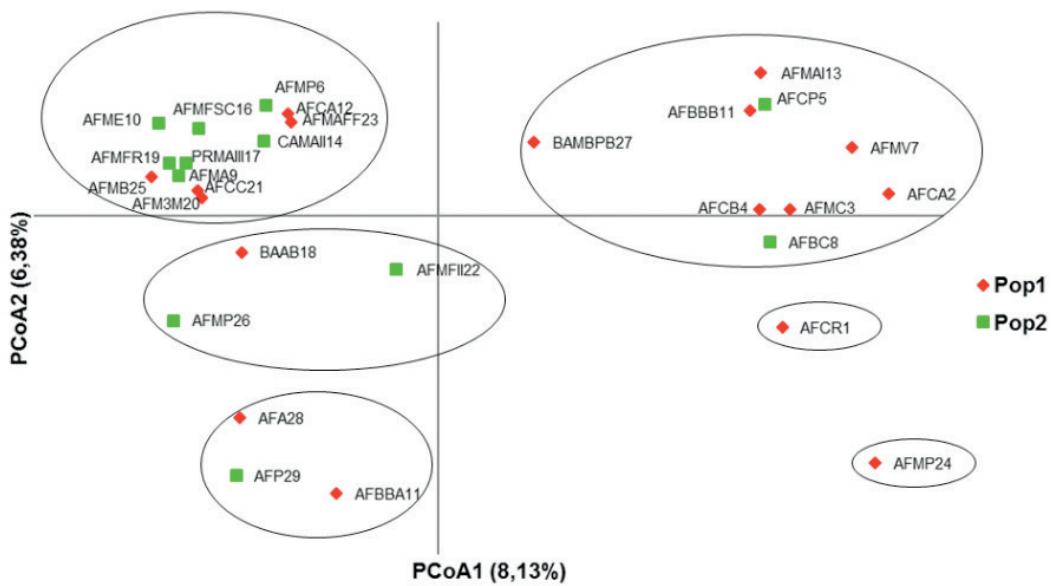


Figura 4. Análise de Coordenadas Principais de 15 primers SSR, indicando 14,51% de diversidade genética entre 29 etnovariedades de mandioca coletadas no município de Alta Floresta, MT.

## 4 | CONCLUSÃO

As etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, Mato Grosso apresentam estruturação genética. Há variabilidade genética intragrupos, indicando que as etnovariedades cultivadas em roças constituem uma forma de recurso genético que deve ser conservada, pois apresentam potencial para serem utilizadas em programas de melhoramento. Os agricultores familiares, ao realizar introdução e troca de material vegetal, atuam como mantenedores da diversidade local.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, A.C. *Manihot esculenta* as a native of the neotropics. **Plant Genetic Resources**, v. 71, p. 22-24, 1987.
- BHATTACHARJEE, R.; FERGUSON, M.; GEDIL, M.; DUMET, D.; INGELBRECHT, I. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 15, p. 3424- 3430, 2009.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2016. 385 p.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 3, p. 493-501, 1998.
- COSTA, T. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; GALVÁN, M. Z.; LACANALLO, G. F.; SILVA, L. I. KVITSCHAL, M. V. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 1040-1048, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v.4, p.359–361, 2012.

EMBRAPA - Empresa de Pesquisa Agropecuária Brasileira. **2ª Oficina de Concertação Estadual de Mato Grosso**. 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354377/2109296/Documento+base+CONTEXTUALIZA%C3%87%C3%83O.pdf/247bf759-27f9-4b4e-afad-1aa6cabd18d4?version=1.0>>. Acesso em: 30 setembro de 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Produção mundial de mandioca**. 2016. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 06 de setembro de 2018.

FARALDO, M. F.; SILVA, R. M.; ANDO, A.; MARTINS, P. S. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 499-505, 2000.

FERREIRA, R. C. U. **Estrutura genética e populacional de acessos tradicionais de mandioca-de-mesa coletados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2014. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2014.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2005. 400 p.

FIORDA, F. A.; SOARES-JUNIOR, M. S. S.; SILVA, F. A.; SOUTO, L. R. F.; GROSSMANN, M. V. E. Farinha de babaçu de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013.

GONÇALVES, T. M.; VIDIGAL FILHO, P. S.; VIDIGAL, M. C. G., FERREIRA, R.C.U.; ROCHA, V.P.C.; ORTIZ, A.H. T.; KVITSCHAL, M.V. Genetic diversity and population structure of traditional sweet cassava accessions from Southern of Minas Gerais State, Brazil, using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 346, 2017.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

LORENZI, J. O. **Mandioca**. CATI: Campinas, 2003. 116 p.

MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APEL, M.; GALE, J.; TOHME, M.; FREGENE, M. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 1, p. 21-31, 2001.

NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO, D.Y.C.; FERNANDES, S.D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 16-28, 2008.

OLSEN, K. M.; SCHAAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Evolution**, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, 2537- 2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/genetics/155/2/945.full.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

SOUZA SILVA, R.; MOURA, E. F.; FARIAS NETO, J. T., SOUSA, N. R.; MOURA, M. F.; SAMPAIO, J. E. Genetic divergence among accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) sampled in the Tapajós region, State of Pará, using agronomic characters and microsatellite markers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2989-3004, 2016.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 590 p.

## ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DE *Adiantum latifolium* LAM. (PTERIDACEAE, PTERIDOPHYTA) OCORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC – ILHÉUS – BA

Data de aceite: 12/12/2019

### **Matheus Bomfim da Cruz**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Alba Lucilvânia Fonseca Chaves**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Aline Oliveira da Conceição**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Leticia de Almeida Oliveira**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Juliana Silva Villela**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Jerônimo Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Lucimar Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz;  
Departamento de Ciências Biológicas

*latifolium*. O material vegetal foi coletado em sub-bosques de florestas secundárias do sistema agroflorestal de cacau. Os cortes foram realizados à mão, usando navalhas de aço e usando isopor como suporte. O procedimento de diafanização foi realizado e as seções foram coradas com azul alciano e safranina para realizar a análise anatômica. Para os testes histoquímicos, foi utilizado material fresco. Sudam foi usado para identificar lipídios; Lugol, amido; Cloreto férrego, composto fenólico; Vanilina clorídrica, taninos; cafeína e DMACA, flavonóides; floroglucinol acidificado, lignina e reagente de Wagner, alcalóides. A raiz é protostélica e apresenta córtex do colênquima; o rizoma possui um córtex parenquimatoso e um cilindro vascular em forma de ferradura; o pecíolo e o ancinho têm epiderme uniseriada, esclerênquima, córtex parenquimatoso e um feixe vascular; a folha é hipoestomática com mesófilo homogêneo, apresenta epiderme unisseriada com paredes anticlinais sinuosas, idiosblastos de esclerênquima nas duas faces e feixe vascular concêntrico anfícial nas veias. A maioria dos compostos testados foi detectada na planta, com exceção dos alcalóides na lâmina da folha. Os resultados deste trabalho corroboram as estruturas anatômicas de *A. latifolium* já descritas para o gênero, contribuindo para a taxonomia da categoria e a análise histoquímica revelou o potencial farmacológico

**RESUMO:** *Adiantum latifolium* Lam. é uma espécie nativa da América tropical que ocorre do México à Argentina. Pode ser encontrado em sub-bosques úmidos, nas margens das trilhas, perto de cachoeiras e nascentes. Este estudo teve como objetivo descrever a anatomia e os compostos químicos do esporófito de *A. latifolium*.

dessa espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Adiantoideae, Anatomia, Constituintes químicos, Samambaias.

**MORPHOLOGIC and HISTOCHEMICAL STUDY OF *Adiantum latifolium* LAM.  
(PTERIDACEAE, PTERIDOPHYTA) OCCURRING IN THE OF THE CAMPUS DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC – ILHÉUS – BA**

**ABSTRACT:** *Adiantum latifolium* Lam. is a native species of tropical America occurring from Mexico to Argentina. It can be found in humid subwoods, on the shores of the trails, near waterfalls and springs. This study aimed to describe the anatomy and chemical compounds of *A. latifolium* sporophyte. Plant material was collected at sub-groves of secondary forests of cocoa agroforestry system. The handmade cuts, using steel knives and Styrofoam as support, were obtained. Diaphanization procedure was done and sections were stained with alcian blue and safranin to perform anatomical analysis. For the histochemical tests, fresh material was used. Sudam was used to identify lipids; Lugol, starch; Ferric chloride, phenolic compound; hydrochloric Vanillin, tannins; caffeine and DMACA, flavonoids; acidified Floroglucinol, lignin and Wagner's Reagent, alkaloids. The root is protostelic and presents collenchyma cortex; the rhizome has a parenchymal cortex and a horseshoe-shaped vascular cylinder; the petiole and the rake have uniseriated epidermis, sclerenchyma, parenchymatous cortex, and a vascular bundle; the leaf is hypostomatic with homogeneous mesophyll, presents uniseriated epidermis with sinuous anticlinal walls, sclerenchyma idioblasts on both faces and concentric vascular bundle anfícrival in the veins. Most of the tested compounds were detected in the plant, with the exception of alkaloids in the leaf blade. The results of this work corroborate the anatomical structures of *A. latifolium* already described for the genus, contributing to the taxonomy of the category and the histochemical analysis revealed the pharmacological potential of this species.

**KEYWORDS:** Adiantoideae, Anatomy, Chemical constituents, Ferns

## **INTRODUÇÃO**

A família Pteridaceae compreende 50 gêneros e 950 espécies com uma ampla distribuição ocupando vários nichos ecológicos. Distinguindo de outras famílias de samambaia, a Pteridaceae apresenta várias formas de vida, podendo ser terrestres, epífitas, adaptadas para locais secos e até mesmo aquáticos (SMITH et al., 2006; SCHUETTPELZ et al., 2007; KRAMER et al., 1990). Por ter grande variedade morfológica a taxonomia dessas samambaias tem sido muito debatida (SCHUETTPELZ et al., 2007; GRAÇANO et al., 2001; KRAMER et al., 1990). Na classificação mais recente, a família Pteridaceae foi dividida em seis subfamílias Adiantoideae, Ceratopteridoideae, Cheilanthoideae, Platyzomatoideae, Pteridoideae e Taenitidoideae (SMITH et al., 2006; SCHUETTPELZ et al., 2007). Sendo que a subfamília Adiantoideae está representada por um único gênero, *Adiantum* (WINTER

et al., 2007) ocorrendo na América do Sul cerca de 70 espécies. No Brasil estima-se que ocorram 50 espécies, sendo *Adiantum latifolium* uma destas (LELLINGER et al., 2001).

Como mencionado anteriormente, devido à sua diversidade morfológica, a sistemática da Família é um ponto de preocupação e são necessários estudos anatômicos mais detalhados para solucionar dúvidas taxonômicas. Desse modo, a anatomia dessas plantas tem um grande valor na solução de problemas taxonômicos, pois fornece características relevantes como, por exemplo: composição do mesófilo, presença e distribuição do esclerênquima, vascularização e formato do pecíolo, formato da nervura e entre outras (GRAÇANO et al., 2001).

Além disso, os compostos secundários também podem auxiliar na taxonomia das espécies e na identificação de possíveis substâncias farmacológicas (e.g. NONATO et al., 2011), pois cada espécie tem sua própria característica química, se diferenciando qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie (KRAMER et al., 1990; SANTOS et al., 2009; LIMA et al., 1997; Poucos estudos foram realizados com *Adiantum* pra determinar os compostos secundários presentes nas espécies do gênero (MITHRAJA et al., 2012). Desse modo, esse trabalho propôs realizar a descrição anatômica de *Adiantum latifolium* e identificar os compostos químicos presentes no esporófito estéril.

## MATERIAL E MÉTODOS

A espécie utilizada neste estudo é *Adiantum latifolium* encontrada em diferentes estágios de desenvolvimento nos sub-bosques das matas secundárias e sistema agroflorestal Cacau-Cabruca do campus da Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, com a posição geográfica (lat: -14.7889003753662 long: -39.0494003295898), A espécie foi incluída no herbário UESC sob número 12156.

As amostras foram armazenadas em etanol 70%. Para a realização das lâminas os cortes foram feitos a mão, utilizando navalhas de aço e isopor como suporte e foram coradas com azul de alcian e safranina. As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada e vedadas com esmalte de unha incolor. Os cortes para os testes histoquímicos foram realizados com material fresco e testados com os seguintes reagentes para seus respectivos compostos: Sudam para lipídios, Lugol para amido, Vanilina clorídrica para tanino, Cafeína e DMACA para flavonóides, Floroglucinol para lignina, Reagente de Wagner para alcalóides e Cloreto férrico para outros grupos de compostos fenólicos. Para efeitos de comparação com os testes histoquímicos foram montados e registrados cortes na forma natural, o branco, montados em água destilada.

Para realização da diafanização, os folíolos foram coletados e armazenados

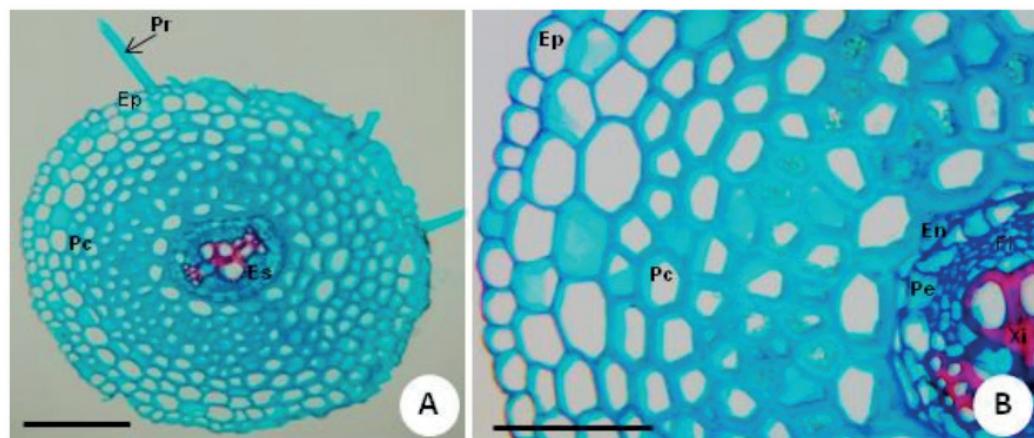
em etanol 50% por dois dias, transferidos para uma solução de hidróxido de sódio 5% em estufa a 60 C° por 4 horas. Após este tempo os mesmos foram lavados com água destilada, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 10% até a completa clarificação e, em seguida, desidratadas em série etílica crescente (10%, 30% e 50%) por 10 minutos cada. Posteriormente, os foliolulos foram corados em safranina alcoólica a 50% e lavada em etanol a 50%, para a retirada do excesso de corante. Por fim as lâminas foram montadas com gelatina glicerinada e vedadas com esmalte de unha incolor.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Anatomia

A raiz apresenta epiderme uniestratificada, córtex com cerca de dez camadas de células parenquimáticas, sendo as mais internas de paredes espessas, podendo significar com a maturidade, e com uma camada de células grandes e espessamento em U, adjacentes à endoderme unisseriada. O cilindro vascular é constituído de periciclo, com uma a duas camadas, floema e xilema internamente, formando um protostelo (Fig. 1 – A e B). A determinação do tipo de tecido vascular é uma característica muito significativa nas Pteridophyta, pois a disposição destes nos diversos órgãos das plantas são importantes para a determinação de famílias, gêneros e espécies (BECARI-VIANA et al., 2017).

O rizoma possui epiderme unisseriada, córtex parenquimático com aproximadamente dezessete camadas e cilindro vascular em forma de ferradura (Fig. 1 – C e D). Essa forma se origina de ampla lacuna foliar, constituindo assim um dictiostelo intermediário, pois está entre solenostelo e dictiostelo, com uma medula parenquimática (BECARI-VIANA et al., 2017).



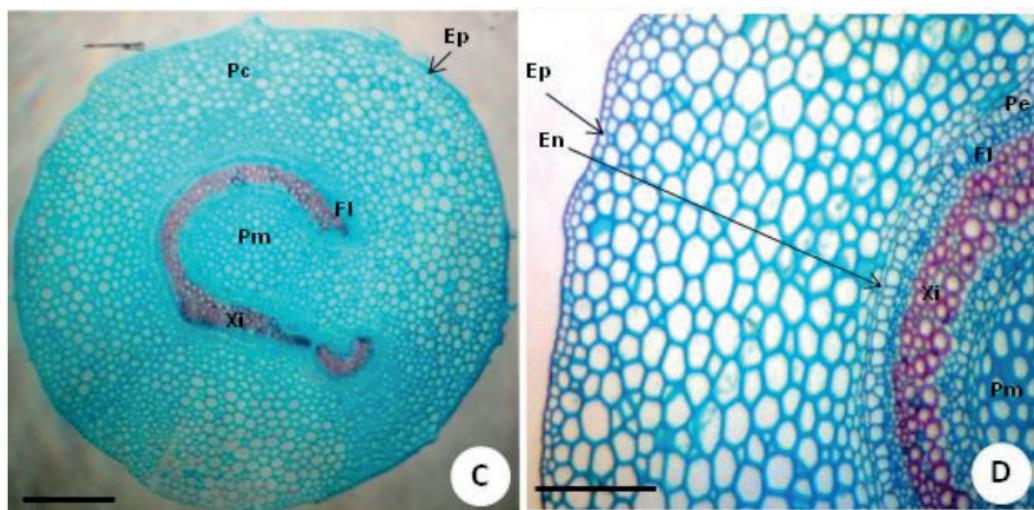


Figura 1—*Adiantum latifolium*-A) Corte transversal da raiz, visão geral; B) Detalhe da epiderme, córtex e feixe vascular; C) Corte transversal, visão geral do rizoma; D) Detalhe da epiderme, cotex e feixe vascular. Barras: A e B, 100µm; C e D, 200µm. Legendas:Pr: pêlo radicular, Ep: epiderme, Pc: parênquima cortical, En: endoderme, Pe: periciclo, Es: Estelo, Fl: floema, Xi: xilema, Pm: parêquema medular

O pecíolo possui uma forma ligeiramente triangular, apresentando uma epiderme com conteúdo escuro, compostos fenólicos, sendo este composto muito comum nas Pteridophyta e, em especial, na subfamília Adiantoideae (GRAÇANO et al., 2001; KRAMER et al., 1990). O córtex apresenta cerca de quatro camadas de esclerênquima e nove de parênquima. O tecido vascular é representado por dois feixes concêntricos anfícrivais, em forma de “cavalo-marinho”, possuindo endoderme, periciclo, floema e xilema (Fig. 2 – A), encontrada em varias espécies dos gêneros *Onoclea*, *Athyrium*, *Woodsia*, entre outras (OGURA, 1972).

A raque apresenta uma epiderme unisseriada com conteúdo escuro, córtex com aproximadamente quatro células colenquimáticas de paredes espessas, dez células de parênquima, e endoderme seguida pelo tecido vascular em feixe único (Fig. 2 - B). Essa fusão dos feixes, antes separados no pecíolo, ocorre dependendo do tamanho das pinas, pois, Ogura (1972), os feixes do pecíolo podem unir-se próximos ao rizoma ou próximo à lâmina foliar assim como ocorre em *A. latifolium*.

A lâmina foliar em corte transversal apresenta epiderme unisseriada, mesofilo homogêneo e feixe vascular anfícrival nas nervuras. Em vista frontal, a lâmina foliar apresenta uma venação livre sob a epiderme nas secções diafanizadas (3 – A e B). A epiderme em vista frontal possui células com paredes anticlinais sinuosas, principalmente na face abaxial, com a presença de estômatos anomocíticos, localizados apenas no lado abaxial. Ocorrem idioblastos esclerenquimáticos em ambas as faces (Fig. 2 – C e D), sendo uma característica marcante da família Pteridaceae, evidenciada em estudos anteriores por Graçano (2011). Provavelmente estas células estejam relacionadas à sustentação da folha, além de ter grande importância na taxonomia, na separação de espécies no gênero *Adiantum* (GRAÇANO

et al., 2011).

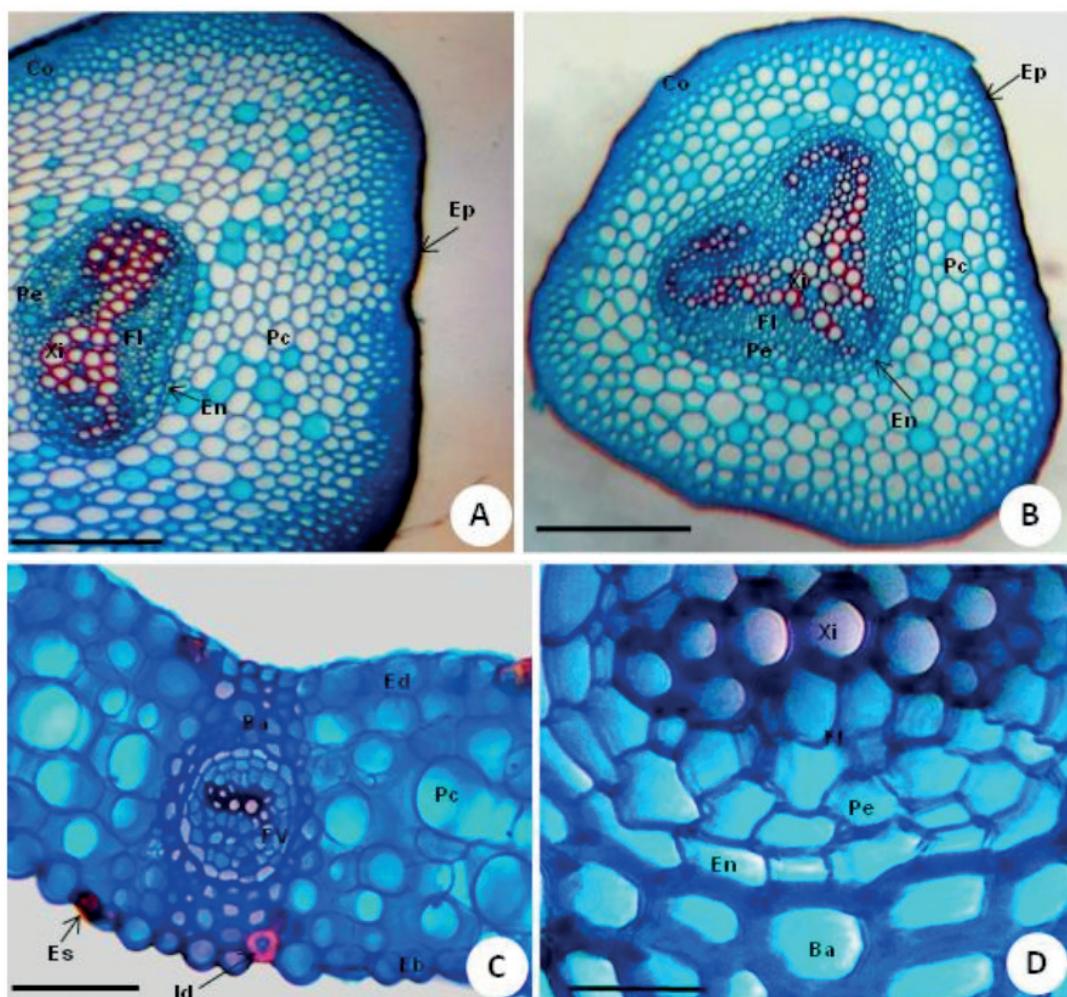


Figura 2-*Adiantum latifolium*-A) Corte transversal do pecíolo, córtex e feixe vascular; B) visão geral da raque; C) Corte transversal da lamina foliar; D) Detalhe do feixe vascular da nervura central. Barras: A, B, C, 100µm; D, 30µm. Legendas: Ep: epiderme, Eb: epiderme abaxial, Ed: epiderme adaxial, Id: idioblasto, Es: Estômato, Co: colênquima, Pc: parênquima cortical, Pe: parênquima clorofílico, Ba: Bainha parenquimática, En: endoderme, Pe: periciclo, Fl: floema, Xi: xilema, , Fv: feixe vascular

*A. latifolium* possui tricomas do tipo escamas no rizoma e peciolo, sendo as escamas do tipo comosa no rizoma e catenado no peciolo. Os apêndices da epiderme são células especializadas, destacando-se entre eles os tricomas e os estômatos (Fig. 3 – C e D), são muito variáveis na sua estrutura e de valor diagnóstico para a taxonomia e têm sido utilizados na separação de famílias, gêneros e espécies de Pteridophyta (GRAÇANO et al., 2011). Por exemplo, a presença de tricomas subterrâneos no rizoma é uma característica marcante da família Pteridaceae (OGURA, 1972).

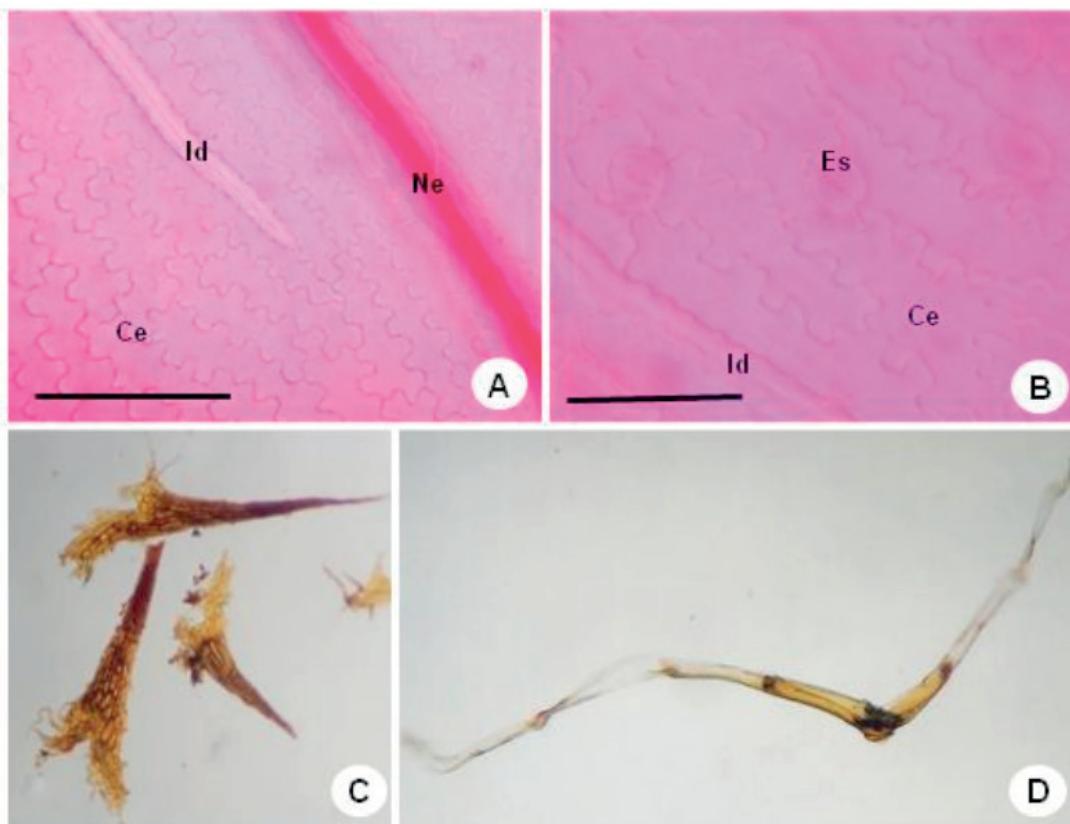


Figura 3-Adiantum latifolium –A) Vista frontal da superfície adaxial B) Vista frontal da superfície abaxial D) Escamado rizoma D) Escama do pecíolo. Barras : A e B, 400µm; C, 10mm. D,0,5mm. Legendas: Id: idioblasto, Ne: Nervura, Ce: Célula epidérmica.

### ***Histoquímica***

Através de vários testes histoquímicos, foi investigada a presença de amido, alcalóides, compostos fenólicos, flavonóides, óleo essencial e oleorresina, lignina, lipídios e tanino.

O amido foi observado em todos os órgãos de *A. latifolium*, sendo mais abundante nas células parenquimáticas do córtex rizoma. Foi observada uma variação na quantidade de amido nos órgãos a depender do estágio de desenvolvimento da *A. latifolium*. Esse resultado também já é descrito em estudos com outras plantas (SALGADO et al., 2005). Além do estágio de desenvolvimento, outros fatores podem influenciar a quantidade de amido armazenado nas plantas (e.g. estresse hídrico, perda foliar) (ZEEMAN et al., 2004).

Alcalóides foram detectados na raiz, rizoma, pecíolo e raque, sendo mais abundante nas células parenquimáticas do córtex na raiz e rizoma (Fig. 5 - C). Os alcalóides têm grande importância na defesa da planta. A presença dessas substâncias nesses órgãos sugere a proteção contra microorganismos (Fumagali et al., 2008), herbívora (Correa et al., 2008) ou crescimento competitivo de plantas nas proximidades (Aerts et al., 1991). Além disso, os alcalóides têm potencial farmacológico relatado na literatura como antiinflamatório (Souto et al., 2011). Que podem explicar esse potencial biológico atribuído a *A. latifolium* na literatura (Nonato

et al., 2010; Mithraja et al., 2012).

Os compostos fenólicos foram detectados em todos os órgãos, destacando-se a maior presença nas células colenquimáticas e epidérmicas do pecíolo e raque atribuindo uma cor escura na epiderme desses órgãos (Fig. 5 - B) que é uma característica muito comum na subfamília Adiantoideae (KRAMER et al., 1990).

Especificamente, os compostos fenólicos taninos foram encontrados nas células epidérmicas e parenquimáticas de todos os órgãos (Fig. 5 - G). Essas substâncias são de grande importância ecológica e biológica, evitando herbivoria e já demonstraram possuir atividade antimicrobiana (Belotto et al., 2014; Benevides et al., 2011; Monteiro et al., 2005).

A lignina foi encontrada nas células de condução do xilema de todos os órgãos (Fig. 5 - F), que conferem rigidez e resistência mecânica aos vasos, favorecendo a adaptação de plantas superiores ao ambiente terrestre (Vizzoto et al., 2010; Fumagali et al., 2008). Além disso, a lignina tem um papel importante na proteção dos tecidos contra microorganismos e no transporte de água e nutrientes (Saliba et al., 2001).

Os flavonóides foram detectados apenas nas células parenquimáticas do floema e do xilema de todos os órgãos (Fig. 5 - D). Em plantas vasculares terrestres, essa classe de substâncias compreende um amplo grupo de compostos (Birt et al., 2001), importantes para a proteção contra a incidência de radiação ultravioleta, patógenos e etc (FERREIRA et al., 2008; HARBORNE et al., 2000; HEIM et al., 2002; MACHADO et al., 2008).

Os lipídios foram observados em todos os órgãos do córtex, nas paredes das células do parênquima da raiz e do rizoma e nas células epidérmicas do colênquima do pecíolo e do ancinho e na epiderme foliar (Fig. 6 - E). Substâncias lipídicas como quitina e ceras formam a cutícula que reduz a perda de água através da transpiração, aumentando a eficiência do uso da água na planta. Cutículas espessas também podem fornecer proteção contra a intensidade da luz, radiação ultravioleta e patógenos (Kolattukudy, 2001; Burghardt et al., 2006; Ferreira et al., 2015). O armazenamento de suberinas, por exemplo, forma uma barreira que diminui significativamente os íons de água, nutrientes, toxinas e transporte de gases (Franke & Schreiber, 2007; Ma & Peterson, 2003; Kolattukudy, 2001).

Além disso, a presença de lipídios na parede celular e na lamela média das células do parênquima no córtex da raiz e do rizoma próximo ao feixe vascular e células colenquimáticas do pecíolo e raque nos leva a supor, com base em Kolattukudy, 2001 e Franke et al., 2007, que essas células do parênquima da raiz e do rizoma podem ter uma função semelhante às células endoderme que possuem uma banda de suberina chamada estria de Caspary, cuja a função é selecionar a entrada e saída de água, íons e outros solutos desses órgãos subterrâneos, e para evitar uma possível contaminação por microrganismos.

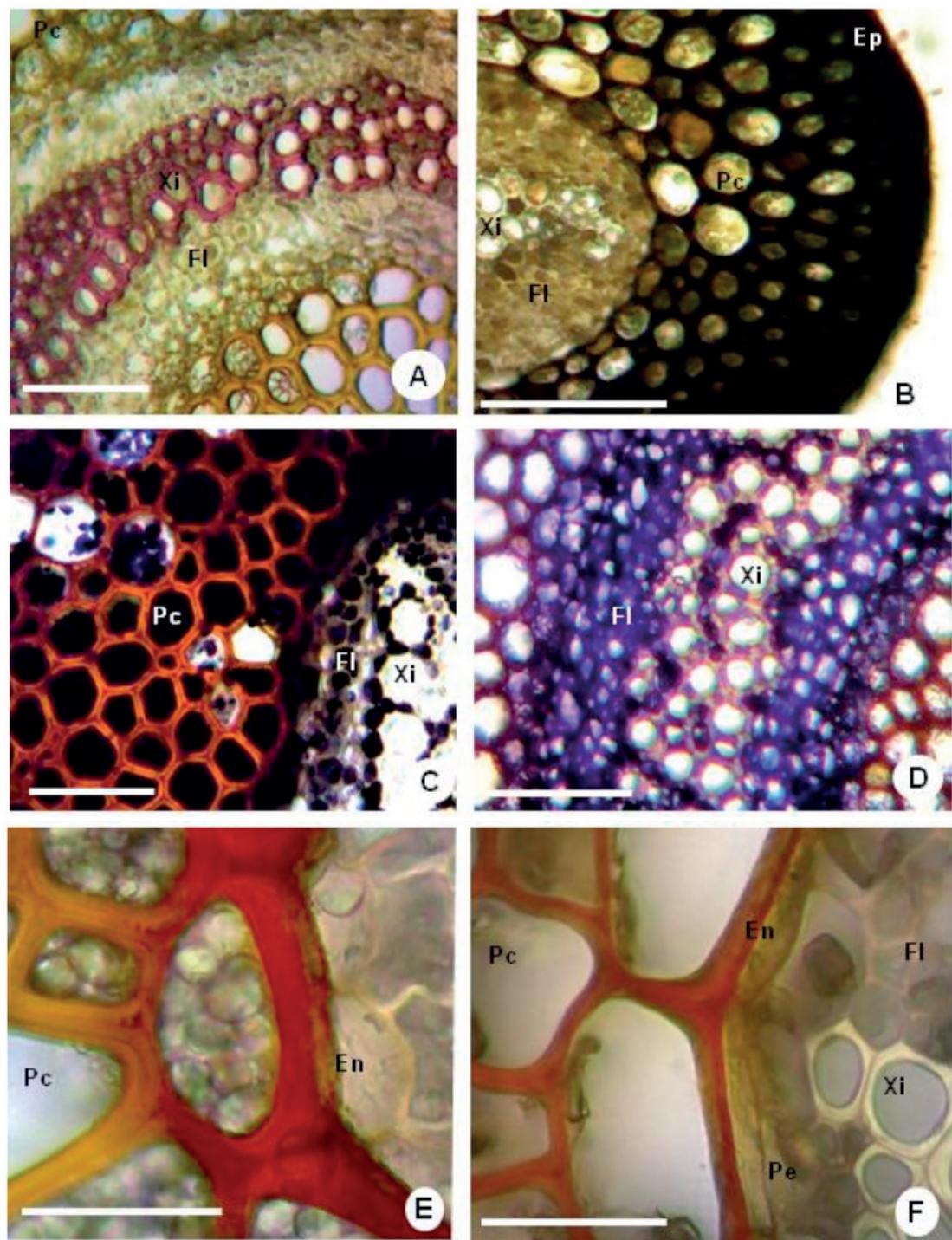


Figura 5 - *Adiantum lafolium* - A) Detalhe do cilindro vascular, em rosa reação positiva para lignina B) Detalhe da raque, em preto reação positiva para composto fenólico; C) Detalhe do rizoma, em preto reação positiva para amido e em vermelho-alaranja reação positiva para alcalóides; D) Detalhe do cilindro vascular do rizoma, em azul violeta reação positiva para flavonóides; E) Detalhe da raiz, em vermelho-alaranja para lipídios; F) Detalhe da raiz, em vermelho-alaranja positivo para tanino. Barras: A, B, C, D, F, 2000 $\mu$ m; E, G, 300 $\mu$ m. Legendas: Ep: epiderme, Pc: parênquima cortical, En: endoderme, Pe: Periciclo, Fl: floema, Xi: xilema.

## CONCLUSÃO

Os resultados anatômicos aqui apresentados corroboram descrições já publicadas para o gênero *Adiantum*, como estômatos anomocíticos, idiosblastos de esclerênquima epidérmico, mesofilo homogêneo, dois meristelos no pecíolo

e revelam a primeira descrição da morfologia de *Adiantum latifolium*. Embora a composição histoquímica das plantas possa variar intra e interespecificamente, durante o ano e entre o meio ambiente, os metabolitos de *Adiantum* perfilam a riqueza de compostos que podem servir como marcador taxonômico, além de indicar o potencial farmacológico dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- Aerts, R. J, Snoijer, W, Van der Meijden, E, Verpoorte, R. **Allelopathic inhibition of seed germination by Cinchona alkaloids?**. *Phytochemistry*. v. 30, p. 2947–2951, 1991.
- Belotto, E.M, Souza-leal, T, Paraluppi, A.L., Furtado, A.L.F.F., Gaspi, F.O.G., Pedrosode-morares, C. **Caracterização anatômica, histoquímica e de classes de metabólitos secundários de folhas de Guzmania lingulata (L.) Mez**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v. 16, p. 127-134, 2014.
- Benevides, C. M. J, Souza, M. V, Souza, R. D. B, Lopes, M. V. **Fatores antinutricionais em alimentos: revisão**. *Segurança Alimentar e Nutricional*. v. 18, p. 67-79, 2011.
- Becari-Viana, I, Schwartsburd, P.B. **Morpho-anatomical studies and evolutionary interpretations of the rhizomes of extant dennstaedtiaceae**. *Am. Fern J.* v. 107, p. 105–123, 2017.
- Birt, D.F. Hendrich, S, Wang, W. **Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids**. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 90, p. 157– 177, 2001.
- Burghardt, M, Riederer, M. **Cuticular transpiration**. *Biology of the plant cuticle*. v. 23, p. 292–309, 2006.
- Correa, P. G, Pimentel, R. M. M, Cortez, J. S. A, Xavier, H. S. **Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras**. *Ciência e Cultura*. v. 60, p. 54-57, 2008.
- Franke, R. e Schreiber, L. **Suberin — a biopolyester forming apoplastic plant interfaces**. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 10, p. 252–259, 2007.
- Ferreira, M. M. M., Oliveira, A. H. C., SANTOS, N. S. **Flavonas e flavonóis: Novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica**. *Revista Agro@mbiente On-line*. v. 2, p. 57-60, 2008.
- Ferreira, C.S., Carmo, W.S., Graciano-Ribeiro, D., Oliveira, J.M.F., Melo, R.B., Franco, A.C. **Anatomia da lâmina foliar de onze espécies lenhosas dominantes nas savanas de Roraima**. *Acta Amazonica*. v.45, p. 337–346, 2015.
- Fumagali, E, Gonçalves, R. A. C, Machado, M. F. P. S, Vidoti, G. J, Oliveira, A. J. B. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 627-641, 2008.
- Graçano, D., Azevedo, A. A., Prado, J. **Anatomia foliar das espécies de Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce (PERD) – MG**. *Revista Brasileira de Botânica*. v.24, p. 333-347, 2001.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J. **Advances in Flavonoid Research since 1992**. *Phytochemistry*. v. 55, p. 481-504. 2000.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships**. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572–584, 2002.
- Kramer, K.U., Green, P.S. **The families and genera of vascular plants: Pteridophytes and gymnosperms**. Springer Verlag. v. 1, p, 404, 1990.
- Kolattukudy, P.E.. **Polyesters in higher plants**. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. v.

71, p 2-49, 2001.

Lellinger. D. B., Prado, J. **The Group of Adiantum gracile in Brazil and Environs.** American Fern Journal. v. 91, p. 1-8, 2001.

Lima, R. S. N., **Cavada, B.S. Importância quimiotaxonômica de compostos vegetais.** Revista do Centro de Ciências da Saúde –UNIFOR, v. 9, p. 64-66, 1997.

Ma, F., and Peterson, C.A. **Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots.** Can. J. Bot. v. 81, p. 405–421, 2003.

Machado H., Nagem T.J., Peters V.M., Fonseca C.S., Oliveira T.T.D. **Flavonóides e seu potencial terapêutico.** Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, v. 27, p. 33-39, 2008

Mithraja, M. J., Antonisamy, J. M., Mahesh, M., Paul, Z. M., Jeeva, S. **Inter-specific variation studies on the phytoconstituents of Christella and Adiantum using phytochemical methods.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, p. 40–45, 2012.

Monteiro, M.C.; Trugo, L.C. **Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado.** Química Nova. v. 28, p. 637-641, 2005.

Nonato, F.R., Nogueira, T.M., Barros, T.A.A., Lucchese, A.M., Oliveira, C.E., Santos, R.R., Soares, M.B.P., Villarreal, C.F. **Antinociceptive and antiinflammatory activities of Adiantum latifolium Lam. Evidence for a role of IL-1 $\beta$  inhibition.** Journal of Ethnopharmacology. v. 136, p. 518-524, 2011.

Ogura, Y. 1972. **Comparative Anatomy of vegetative organs of the Pteridophytes.** 2ed. Gebrüder Bornträger, Berlim 502p.

Saliba, E. O. S., Rodriguez, N. M., Morais, S. A. L.; Piló-Veloso, D. **Ligninas –métodos de obtenção e caracterização química, revisão de literatura.** Ciência Rural v. 31, p. 917-928, 2001.

Salgado, S. M.; Guerra, N. B.; Andrade; S. A. C.; Olivera, A. V. S. **Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão caupi.** Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 25, p. 525-530, 2005.

Santos, M.C.A., Freitas, S. P., Aroucha, E. M. M., Santos, A. L.A. **Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (Catharanthus roseus (L.).** Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 9, p. 24-30, 2009.

Schuettpelz, E., Schneider, H., Huiet, L., Windham, M.D., Pryer, K.M. **A molecular phylogeny of the fern family Pteridaceae: Assessing overall relationships and the affinities of previously unsampled genera.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 44, p. 1172-1185, 2007.

Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider H., Wolf, P.G. **A classification for extant ferns.** Taxon, v. 55, p. 705-731, 2006.

Souto, A. L., Tavares, J. F., Silva, M.S., Diniz, M. F.; Athayde-Filho, P.F., Barbosa, F. J. M. **Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010.** Molecules. v. 16, p. 8515-8534, 2011.

Vizzotto, M., Krolow, A.C., Weber, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** 1 ed. Embrapa Clima Temperado. Documentos, Pelotas. 16p, 2010.

Winter, S. L. S., Mynssen, C. M., Prado, J. **Adiantum (Pteridaceae) no Arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil.** Rodriguésia. v. 58, p. 847-858, 2007.

Zeeman, S.C., Smith, S.M., Smith, A.M. **The breakdown of starch in leaves.** New Phytologist. v. 163, p. 247-261, 2004.

## ESTUDO DE MORFOLOGIA E HISTOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Microgramma vaccinifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel, *Polypodiaceae - pteridófita* - CORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ(UESC)

Data de aceite: 12/12/2019

### **Juliana Silva Villela**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Alba Lucilvânia Fonseca Chaves**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Letícia de Almeida Oliveira**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Matheus Bomfim da Cruz**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Aline Oliveira da Conceição**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Jerônimo Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

### **Lucimar Pereira de França**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas

presentes nas folhas de *M. vaccinifolia*. As amostras foram coletadas no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz e as lâminas preparadas com cortes a mão livre e dupla coloração com azul de alcian e safranina. Utilizou-se reagentes específicos para detectar os compostos químicos. A raiz é protostélica e apresenta epiderme com pelos absorventes, córtex parenquimático, esclerênquima, endoderme, periciclo xilema e floema alterno. O caule possui epiderme com escamas e é parenquimático, com estelo do tipo dictiostele e meristelos concêntricos. As folhas apresentam dimorfismo quando férteis e estéreis, são hipoestomáticas e os estômatos são anomocíticos. Anatomicamente apresentam epiderme, hipoderme do lado adaxial e mesofilo tendendo a bicolateral, com parênquima paliçádico pouco distinto, feixes vasculares típicos de pteridófitas. As análises histoquímicas revelaram, como principais constituintes, os compostos fenólicos tais como flavonóides, lignina, e taninos, compostos estes com importantes atividades biológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anatomia, Constituintes químicos, Samambaias, *Microgramma*.

**MORPHOLOGY AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE SPECIES *Microgramma vaccinifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL,**

**RESUMO:** O gênero *Microgramma* C. Presl, pertencente à família Polypodiaceae, sendo uma das espécies epífitas que apresentam características de resistência à dessecção. O presente estudo visa fazer a descrição da morfologia externa e interna, assim como caracterizar e localizar os compostos químicos

**ABSTRACT:** The *Microgramma C. Presl* genus, belongs to the *Polypodiaceae* family, and it is one of the epiphyte species which presents characteristics of desiccation resistance. This study aims to describe both, external and internal morphology, as well as characterize and locate the chemical compounds presents in the leaves of *M. vaciniifolia*. The samples were collected at the campus of Santa Cruz State University and the analysis slides were prepared with freehand cuts and double staining using *alcian blue* and *safranin*. Specific reagents were used to detect chemical compounds. The root is protosthetic and has absorbent epidermis, parenchymatic cortex, sclerenchyma, endodermis, xylem pericycle and alternate phloem. The stalk has scaled epidermis and it is parenchymatic, dictiostelo type and concentric meristeles. When fertile and sterile, the leaves show dimorphism, are hypoestomatic and its stomata are anomocytic. Anatomically it has epidermis, hypodermis on the adaxial side and mesophyll tending to be bilateral, with slightly distinct palisader parenchyma and typical vascular bundles of pteridophytes. The histochemical analysis has shown, as the main constituents, phenolic compounds such as flavonoids, lignin and tannins, compounds with important biological activities.

**KEYWORDS:** Anatomy, Chemical constituents, Ferns, *Microgramma*.

## INTRODUÇÃO

Pteridófita é a denominação do grupo parafilético artificial que abrange outros dois grandes grupos vegetais, as samambaias e as licófitas (SMITH et al., 2006), ambas plantas vasculares sem sementes, com ciclo de vida dividido em duas fases bem definidas, uma gametofítica e outra esporofítica, mais duradoura (PRADO, 1998).

O grupo das pteridófitas possui ampla distribuição mundial. Essas plantas desenvolveram adaptações marcantes em meios extremos, sendo encontradas nos mais distintos ambientes. Muitas espécies são cosmopolitas, e vivem preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais úmidos e sombreados das matas (RATHINASABAPATHI, 2006).

A família Polypodiaceae, possui aproximadamente 56 gêneros e cerca de 12.000 espécies, abrangendo as samambaias leptosporângiadas (SMITH et al., 2008). É uma família pantropical, podendo ocorrer tanto em locais úmidos como secos. Possui maior diversidade de espécies nas regiões de florestas úmidas dos Andes e do sudeste do Brasil. (SANÍN, 2006; LABIAK & PRADO, 2008).

O gênero *Microgramma C. Presl* sensu Tryon & Tryon (1982), pertencente à família Polypodiaceae, encontra-se amplamente distribuído nas regiões tropicais do continente americano e possui aproximadamente 13 espécies (MICKEL & BEITEL,

1988). São epífitas de florestas pantanosas e fechadas, com predominância de chuvas, encontradas frequentemente ao longo de rios e riachos (PERES et al., 2009). Por serem epífitas, possuem raízes sobre as superfícies dos forófitos, espalhando-se pelas cascas das árvores e arbustos e absorvendo a matéria orgânica disponível. É caracterizado por folhas glabras ou escamosas, monomórficas ou dimórficas (TRYON e TRYON, 1982).

*Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. é descrita como uma epífita reptante e/ou hemicriptófita reptante de distribuição neotropical. Pode ser encontrada como corticícola e/ou rupícola e é facilmente reconhecida por seu caule longo intensamente revestido por escamas e folhas dimórficas (as estéreis são ovadas e as férteis lanceoladas). É conhecida popularmente como erva-silvina, erva-silveira, erva-tereza, erva-de-lagarto, cipó cabeludo, cipó-peludo. Relatos apontam esta espécie como um poderoso adstringente, sendo também recomendada para hemorragias, expectorações, diarréias, disenterias, cólicas intestinais e hidropsia. (PERES et al., 2009).

A riqueza de samambaias e licófitas nas regiões tropicais está associada a variados microambientes caracterizados por diferentes altitudes, intensidade luminosa, solos, tipos de rochas e microclimas (MORAN, 1995). Os fatores edáficos, biótico e climáticos determinam estratégias fisiológicas, anatômicas e respostas adaptativas que possibilitam a sobrevivência das plantas em diferentes condições ambientais (DICKISON, 2000). Estudos morfológicos e anatômicos constituem um forte embasamento para a compreensão dos processos adaptativos, indicando a influência no ecossistema (PINTO et al., 1993).

A utilização da anatomia como subsídio para a taxonomia tem sido efetiva, inclusive permitindo a identificação de material fragmentado ou desprovido de estruturas reprodutivas. Os dados anatômicos também podem ser utilizados para identificar tendências evolutivas e relações filogenéticas entre os táxons. (METCALFE & CHALK, 1983).

O objetivo deste trabalho consistiu em fazer a descrição da morfologia externa e interna, assim como caracterizar e localizar os compostos químicos presentes no esporófito de *Microgramma vacciniifolia*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de raiz, caule, folhas de *Microgramma vacciniifolia*, da família Polypodiaceae, em árvores localizadas no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC Ilhéus, Bahia, Brasil (Lat: -14.796260, Long: -39.174513).

Amostras da região mediana da lâmina foliar; do caule e das raízes foram

cortadas transversalmente com lâminas de barbear e auxílio de suporte de isopor. Os cortes foram clarificados com água sanitária comercial a 50% e, após sucessivas lavagens com água destilada, até não restar cheiro do hipoclorito, corados com azul de alcian e safranina, e montados entre lâminas e lamínulas com gelatina glicerinada. As lamínulas foram vedadas com esmalte de unha incolor e as lâminas identificadas com etiquetas adesivas. As fotos das lâminas foram feitas através de uma câmera acoplada ao microscópico óptico e digitalizadas por meio do software Picostage.

Para as reações histoquímicas nas folhas foram usados os seguintes reagentes: Sudam III, para detectar lipídios (SASS, 1951); Lugol, para amido (BERLYN & MIKSCHE, 1976); Vermelho de Rutênio, para pectinas (JOAHNSEN, 1940); Cloreto Férlico, para compostos fenólicos (JOAHNSEN, 1940); Vanilina Clorídrica, para taninos (MACE & HOWELL, 1974); Floroglucinol Acidificado, para lignina (JOAHNSEN, 1940); Reagente de Wagner, para alcaloides (FURR & MAHLBERG, 1981), Azul de Coomassie, para proteínas (FISHER, 1968); Azul de Toludina, para mucilagem e pectinas (O'BRIEN et al., 1964) e Cafeína + DMACA, para flavonoides (FEUCHT & SCHMID, 1983).

## RESULTADOS

*M. vacciniiifolia* é uma epífita de caule reptante, longo, com ramificações que permitem que o caule se fixe ainda mais ao forófito (Fig. 1a, 1c e 1d), de coloração verde com uma parte achatada ligada ao forófito, por onde saem as raízes e outra arredondada por onde saem as folhas, coberto por muitas escamas de coloração branca. A planta possui filotaxia alterna e as folhas são curto-pecioladas e dimorfas, sendo a folha estéril (Fig. 1c-d) ovada com ápice arredondado, base cordada, margem inteira, venação peninérvia, livres entre si e superfície lisa. A folha fértil (fig. 1a-b) é lanceolada, com ápice agudo, base atenuada, margem inteira, venação peninévea, livres entre si. Os soros estão localizados na face abaxial das folhas férteis, é de formato circular e coloração amarelada a marrom. Estão distribuídos em duas fileiras paralelas, sendo uma de cada lado da nervura central (Fig. 1a-d).

A raiz em corte transversal é circular e apresenta, da periferia para o centro, epiderme unisseriada com numerosos pelos absorventes, córtex com duas camadas de células parenquimáticas e duas de esclerênquima, interrompidas na região do protoxilema e endoderme unisseriada com células pequenas e achatadas. No cilindro vascular o periciclo é formado por uma camada de células e o floema se dispõe alterno ao xilema, pouco diferenciado na raiz (Fig. 2a).

O caule é cilíndrico, levemente achatado na face abaxial, tendo uma epiderme unisseriada com cutícula fina. O corte transversal evidenciou grandes escamas em formato de hélice que saem de invaginações na epiderme. Possui aproximadamente

quinze camadas de células parenquimáticas no córtex e de quatro a seis meristelos, em volta de uma medula parenquimática, sendo um meristelo maior voltado para o lado adaxial e quatro a cinco menores voltados para o lado abaxial (Fig. 2b).

Os feixes vasculares (meristelos) do caule são concentricos anfícrivais. O periciclo é constituído por uma a mais camadas de células quadrangulares. Ao redor dos feixes há uma endoderme de células achatadas e uma bainha parenquimática que se cora de vermelho pela safranina (Figura 2c).

O corte transversal da folha demonstrou epiderme superior unisseriada com paredes finas e cobertas por cutícula relativamente delgada, seguida internamente por uma camada de células diferenciadas com características de células aquíferas (hipoderme). Possui de duas a três camadas de células de parênquima paliçádico, bem curtas, e de seis a sete camadas de células de parênquima lacunoso. Sob os estômatos são observadas câmaras subestomáticas amplas. A epiderme inferior é unisseriada com parede delgada (Fig. 2d-e).

Na nervura central observou-se que na face abaxial existem cerca de quatro a cinco camadas de células colenquimáticas de tamanhos e formatos diferentes entre si. Próximo ao feixe vascular, existem cerca de três camadas de células parenquimáticas de formato irregular. O feixe vascular da nervura central é concêntrico anfícrival. O periciclo possui uma a duas camadas de células de formato irregular e a endoderme uma camada de células achatadas. Envolvendo o feixe vascular, observa-se uma camada de células grandes, a bainha, com espessamento em U, com conteúdo de cor castanho-avermelhado (Fig. 2f).

A epiderme do lado adaxial da folha em vista frontal é constituída por células de formatos variados e paredes anticlinais sinuosas enquanto no lado abaxial estas possuem paredes mais sinuosas que as da adaxial. Os estômatos não apresentam células distintas das células epidérmicas sendo, portanto, anomocíticos. (Fig. 2g-h).

Os principais compostos encontrados nas folhas em *M. vacciniifolia* foram os compostos fenólicos, sendo observados no conteúdo das células da bainha dos feixes vasculares (Fig. 3a), lignina nas paredes das células do xilema (Fig. 3b) e flavonóides como conteúdo de algumas células do parênquima da nervura central e mesofilo (Fig. 3c-d). Para as outras reações realizadas não foram obtidos resultados consistentes.



Figura 1—a-d. *Microgramma vaccinifolia* in natura—a. folha fértil; b. folha fértil evidenciando soros; c. folhas estéreis; d. detalhe da folha estéril e caule com escamas esbranquiçadas.

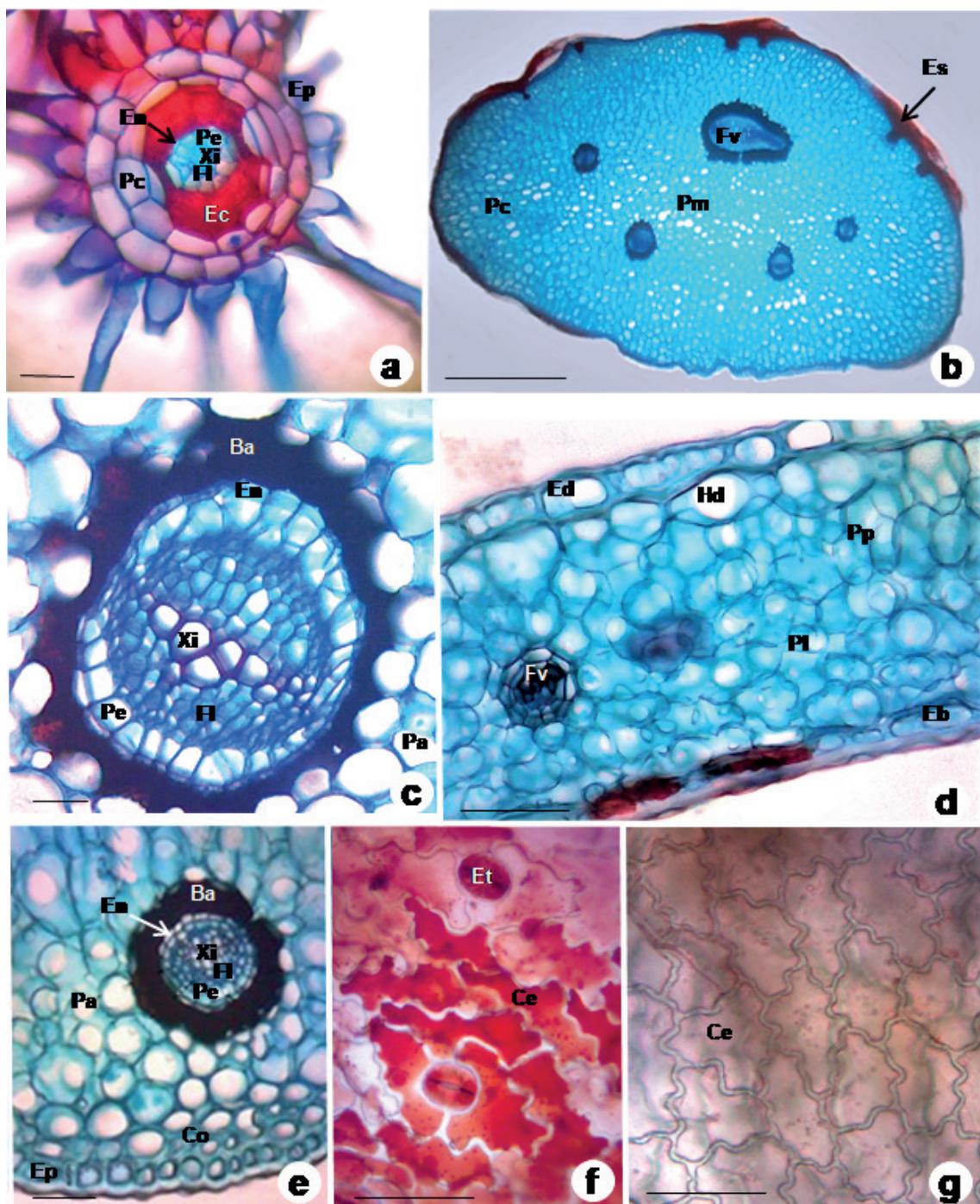


Figura 2 – *Microgramma vacciniifolia* – a. corte transversal da raiz; b. corte transversal do caule; c. detalhe de um feixe vascular do caule; d.corte transversal da folha e.detalle de um feixe vascular central da folha f. vista frontal da epiderme, lado abaxial; g.vista frontal da epiderme, lado adaxial; Barras: a, c, f-500µm; b, d, e-1000µm Legendas:Ce: célula epidermérica;Co: colenquima, Eb: epiderme, lado abaxial; Ed: epiderme, lado adaxial; Ec: esclerenquima,Ed: epiderme adaxial, En: endoderme,Ba: bainha, Ep: epiderme,Et: estômato, Fl: floema, Fv: feixe vascular,Hd: hipoderme adaxial,Pc: parênquima cortical, Pe: periciclo, Pl: parênquima lacunoso, Pp: parênquima paliçádico, Pm: parênquima medular, Xi: xilema.Barras: a, c, e -500µm; b,d,f,g –1000µm.

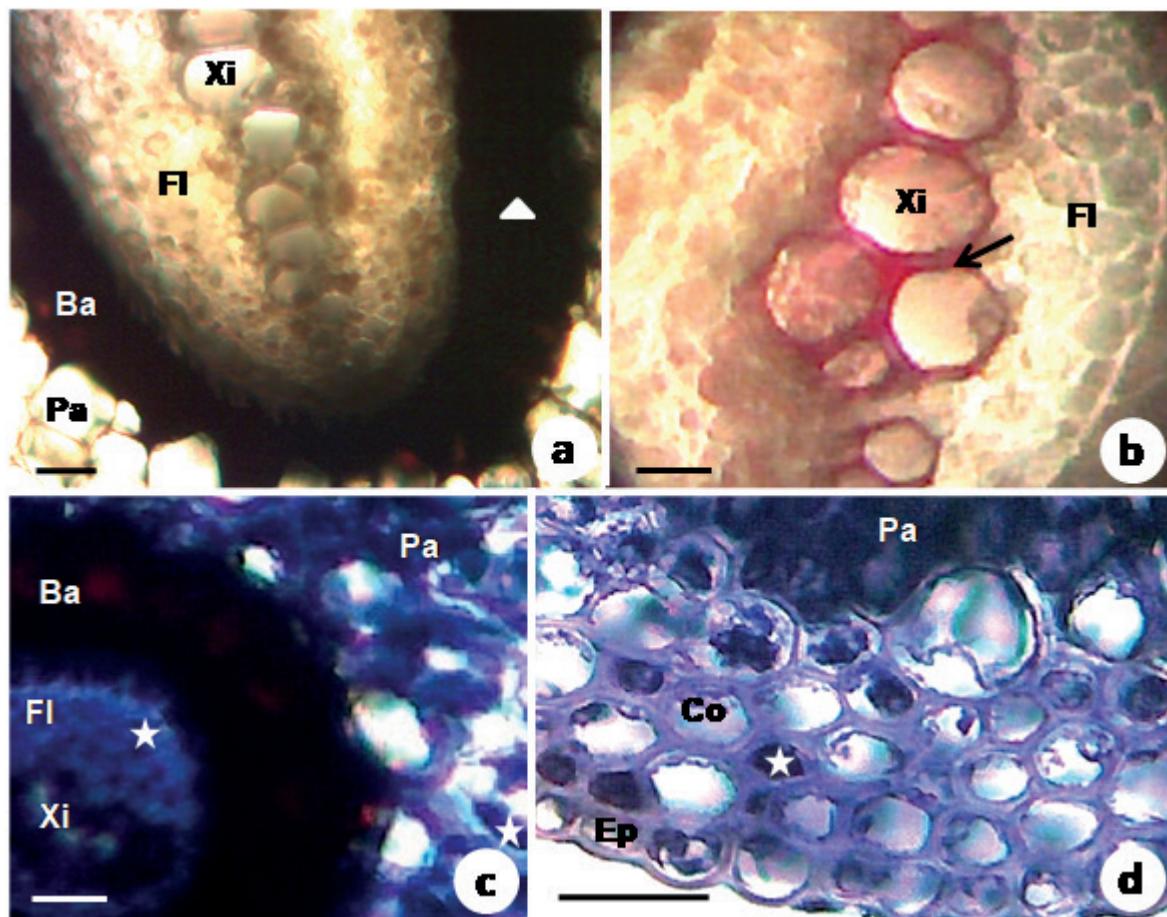


Figura 3-a-c. Testes histoquímicos –a.tanino no conteúdo das células da bainha do feixe vascular(triangulo branco); b. lignina na parede do xilema(seta preta);c. flavonóide no conteúdo de algumas células do colênquima(estrela branca).Barras: a, b -500 $\mu$ m; c, d-1000 $\mu$ m.Legendas: Xi: xilema, Fl:floema, Ba: bainha do feixe vascular, Pa: parênquima, Co: colênquima, Ep:epiderme.

## DISCUSSÃO

As análises morfológicas do esporófito de *Microgramma vacciniifolia*, demonstraram dimorfismo foliar, sendo as folhas estéreis menores e mais arredondadas, enquanto as folhas férteis apresentaram conformação mais longa e estreita. Esse padrão de dimorfismos também foi descrito por Mehltreter (2008) em forófitos de *M. squamulosa*, uma espécie do mesmo gênero da espécie descrita no presente estudo. Essa característica é observada em muitas espécies de epífitas (DE LA SOTA, 1971).

Foi possível observar uma grande quantidade de escamas cobrindo o caule de *M. vacciniifolia*, sendo que a presença e característica destas auxilia no diagnóstico e diferenciação das espécies pertencentes ao gênero *Microgramma*, também observado em *M. squamulosa* (SUFFREDINI et al., 2008).

Apresentação de hipoderme com características de células aquíferas é considerada uma adaptação ao ambiente epífito, pois é típica das folhas xeromórficas e responsável pelo armazenamento de água (KRAUS, 1949, ESAU, 1965), além de ser responsável pela manutenção da temperatura interna da folha (MADISON, 1977). É uma característica

descrita em muitas espécies da família Polypodiaceae (TEJERO-DÍEZ et al., 2010).

As plantas espífitas são geralmente expostas a uma grande incidência luminosa e déficit hídrico, assim, as células grandes e com pouco conteúdo interno que formam o tecido da hipoderme, observado em *M. vacciniifolia* é um mecanismo especializado para a absorção de luz, pois ajudam na captura de luz difusa, juntamente com a densidade estomática. (DE LA SOTA, 1963, DUBUISSON et al., 2009, LARCHER, 2000).

Além disso, A cor acastanhada vista nas células parenquimáticas próximas aos feixes vasculares trata-se de compostos fenólicos, resultado comprovado pela reação com Cloreto férrico (JAIME et al., 2007, OGURA, 1972). Muitos compostos fenólicos como taninos e flavonóides, também evidenciados pelo teste histoquímico com cafeína e DMACA no presente estudo, podem apresentar propriedades antimicrobianas (SCALBERT, 1991, VELURI, et al., 2004). Isso demonstra que os compostos fenólicos são uma adaptação contra a herbivoria e a ação de microorganismos principalmente nos feixes vasculares, os quais são responsáveis pelo transporte de nutrientes e substâncias nas plantas. A presença de compostos fenólicos em *M. vacciniifolia* também foi descrito por Peres et al. (2009) em estudo sobre os compostos químicos e biológicos da espécie.

Com esta descrição da espécie podem ser verificadas características morfológicas que favorecem sua adaptação aos períodos com escassez de água e intensa luminosidade a que se expõem as plantas epífitas, como a hipoderme e a cobertura dos órgãos com escamas. A presença marcante de substâncias fenólicas, conhecidamente característica das pteridófitas, favorece também esta adaptação pela proteção dos pigmentos, como protegem a planta de herbívoros e outros predadores. Além disso, substâncias fenólicas possuem atividades biológicas podendo ser testadas, em futuras pesquisas, sua ação antimicrobiana, antitumoral, entre outras.

## REFERÊNCIAS

- BERLYN G.P, MIKSCHÉ J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University. p. 121, 276, 1976
- DE LA SOTA, E.R. 'Microgramma megalophylla' (Polypodiaceae.str.), uma interessante espécie de Amazonas. **Bol. Soc. Arg. Bot.** v. 10, p. 158-165, 1963.
- DE LA SOTA, E.R. El epifitismo y las pteridofitas en Costa Rica (América Central Belém: MPEG/UFRA/ EMBRAPA, 2003. 78-79.). **N. Hedwigia** v. 2, p. 401-465, 1971.
- DICKISON, WC. **Integrative plant anatomy**. Academic Press, San Diego. 533p, 2000.
- DUBUISSON, J.Y., H. SCHNEIDER & S. HENNEQUIN. Epiphytism in ferns: diversity and history. **C. R. Biol.** v. 332, p. 120-128, 2009.
- ESAU, K. **Plant anatomy**. John Wiley & Sons, New York, USA, 1965.
- FEUCHT, W. & SCHMID, P.P.S. Selektiver histochemischer nachweis von flavanen (catechinen) mit p-dimethylamino-zimtaldehyd in sprossen einiger obstgehölzi. **Gartenbauwissenschaft**, v. 48, p.

119–124, 1983.

FISHER, D.B. **Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy.** Histochemie, 16: 92–96, 1968.

FURR & MAHLBERG, Histochemical analysis of lacticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.2, p.153-159. ,1981.

JAIME, G.S., G. BARBOZA & M.A. VATTUONE. Sobre los caracteres foliares diagnósticos de *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota (Polypodiaceae). **Blacpma** v. 6, p. 195-196, 2007.

JOHANSEN D. A. **Plant microtechnique.** New York, Mc Graw Hill, 1940.

KRAUS, B.H. Anatomy of vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. II. **The leaf.** **Bot. Gazette.** v. 110, p. 303-404, 1949.

LABIAK, P.H. & PRADO, J. New combinations in Serpocaulon and a provisional Key for the Atlantic Rain Forest species. **American Fern Journal**, v. 98, p. 139-159, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** Rima Artes e Textos, São Carlos, Brasil, 2000.

MACE, M. E. & HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings **Canadian Journal of Botany**, v. 52 n.11 p. 2423-2426, 1974.

MEHLTRETER, K. Phenology and habitat specificity of tropical ferns, p. 201-221. In R.A. Ranker & C.H. 299 **Rev. Biol. Trop.** (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) v.. 61 n.1, p. 291-299, 2008.

METCALFE, C.R & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: wood structure conclusion of the general introduction.** 2 ed Oxford Claredon Press, Oxford. 297p, 1983.

MICKEL, J.T. & BEITEL, J.M.. Pteridophyte flora of Oaxaca, Mexico. Mem. Nueva York. **Bot. Gard.** v. 46, p. 1-568, 1988.

MORAN, R.C. The importance of moutains to pteridophytes, with emphasis on Neotropical montane forests. In: S.P Churchill, H. Baslev, E. Forero & J. L. Lutein (eds.). **Biodversity and conservation of neotropical Montane Forests.** The New York Botanical Garden, New York. pp.359-363, 1995.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OGURA, Y. Comparative Anatomy of vegetative organs of the Pteridophytes. **Gebrüder Bornträger**, Berlin, Germany. 1972.

PERES M.T.L, POPPI N.R, CARDOSO C.A.L. Estudos Químicos e Biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch) Copel (Polypodiaceae). **Quim Nova**, v. .32, n. 4, p. 897-901, 2009.

PINTO, M, VARELA, V.P & BATALHA, L.F.P. Influencia do sombreamento no desenvolvimento de mudas de louro (*Licaria canela* (Meiss) Kosterm). **Acta Amazonica**. v. 23, p. 397-402, 1993.

PRADO, J. Pteridófitas do Estado de São Paulo. In: C.E.M. Bicudo & G.J. Shepherd (eds.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo. 2. Fungos macroscópicos & plantas.** São Paulo: Fapesp. p. 47-61, 2008.

RATHINASABAPATHI, B. Ferns represent untapped biodiversity for improving crops for enviromental stress tolerance. **New Phytol.** v. 172, p. 385-390, 2006.

SANÍN, D. Serpulon A.R.SM. (Polypodiaceae L.), uma revisão al género de helechos com forma de sepiente. **Revista Universidad de Caldas**. p. 89-103, 2006.

SASS J.E. **Botanical microtechnique**. 2ed. Ames: Iowa: State College Press, 1951.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** v.30, p.3875-3883, 1991.

SMITH A.R et al. A classification for extant ferns. Estados Unidos. **TAXON – Fern classification**, p.705–731, 2006.

SMITH, A.R. et al. Fern Classification. In: T.A. Ranker & C.H. Haufler (eds.). *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 417-467, 2008.

SUFFREDINI, I.B., E.M. BACCHI & J.E. KRAUS. Estudo farmacognóstico do caule e raízes de *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota (Polypodiaceae). **Rev. bras. farmacogn.** v. 18, p. 279-286, 2008.

TEJERO-DÍEZ, J.D., S. AGUILAR-RODRÍGUEZ, T. TERRAZAS & L. PACHECO. Arquitectura y anatomía foliar del complejo *Polypodium plesiosorum* sensu Moran (Polypodiaceae). **Rev. Biol. Trop.** v. 58, p. 955-976, 2010.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F.; **Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America**, Spring-Verlag: New York, 1982.

VELURI, R.; WEIR, T. L.; BAIS, H. P.; STERMITZ, F. R.; VIVANCO, J. M. **Agric. Food Chem.** v. 52, p. 1077, 2004.

## ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE SUSPENSÕES CELULARES DE DENDEZEIRO *Elaeis guineensis* Jacq.

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 04/11/2019

### Marlúcia Souza Pádua Vilela

Universidade Estadual De Minas Gerais  
Divinópolis- Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/5140359857613683>

### Raissa Silveira Santos

Laboratório Central de Biologia Molecular  
Universidade Federal de Lavras  
Lavras - Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/4951773748329599>

### Jéssica de Castro e Andrade

Laboratório Central de Biologia Molecular  
Universidade Federal de Lavras  
Lavras – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/7412588075307564>

### Vanessa Cristina Stein

Universidade Federal de São João Del Rei  
São João Del Rei – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/2989577237395688>

### Luciano Vilela Paiva

Laboratório Central de Biologia Molecular  
Universidade Federal de Lavras  
Lavras – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/5891515058796038>

de óleo, que é aplicado em várias áreas da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis. O objetivo deste estudo foi otimizar um protocolo de suspensão celular. Calos de dendezeiro híbrido IRHO cultivados e multiplicados *in vitro* foram utilizados para iniciar as suspensões celulares (ECS) a partir de 2 g de calos inoculados em erlenmeyer de 50 mL contento 10 mL dos meios de cultura MS e Y3 suplementados com ácido cítrico (250 e 500 mg.L<sup>-1</sup>). As ECS foram avaliadas em relação à oxidação e avaliadas histologicamente aos três meses de cultivo. Posteriormente as ECS finas foram avaliadas em relação ao seu potencial embriogênico com Carmim Acético (CA) e Azul de Evans (AE) aos três meses de cultivo, e também histologicamente aos cinco meses de cultivo. As ECS em meio de cultivo MS apresentaram oxidação mesmo na presença de ácido cítrico em ambas as concentrações. As ECS cultivadas em meio de cultura Y3 na presença do ácido cítrico não oxidaram, em ambas concentrações testadas. As análises histológicas das ECS grossas e finas no meio de cultivo Y3 na presença de ácido cítrico a 250 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram células com características embriogênicas em maior quantidade, em comparação as células no meio de cultivo MS. Pelo teste com CA e AE, as ECS finas aos três meses de cultivo apresentaram 36% de células com potencial embriogênico coradas pelo CA.

**RESUMO:** O dendezeiro possui grande importância econômica, devido à alta produção

Aos cinco meses de cultivo foi observado por meio de testes histológicos a presença de embriões somáticos com protoderme, meristema fundamental e procâmbio sem ocorrências de variações somaclonais.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Elaeis guineensis*, Cultura de Tecidos e Órgãos Vegetais, Células embriogênicas.

## HISTOLOGICAL ASPECTS OF DENDEZEIRO *Elaeis guineensis* Jacq. CELL SUSPENSIONS

**ABSTRACT:** Oil palm has economic value, due to high oil production, which is applied in various industry areas, such as food, cosmetics, pharmaceutical and biofuel. The aim of this study was to optimize oil palm cell suspension protocol. *In vitro* cultivated and multiplied IRHO hybrid oil palm calli were used to initiate cell suspensions (ECS). 2 g of callus were inoculated at 50 ml erlenmeyer containing 10 ml of MS and Y3 culture media supplemented with citric acid (250 and 500 mg.L<sup>-1</sup>). ECS oxidation and histology were evaluated after three months of cultivation. Subsequently, thin ECS were evaluated, with Acetic Carmine (CA) and Evans Blue (AE), after three months of cultivation to observe embryogenic potential, and after five months of cultivation histologically. ECS in MS culture medium showed oxidation even in presence of citric acid at both concentrations. ECS grown in culture medium Y3 + citric acid did not oxidize, at both concentrations tested. Histological analyzes of thick and thin ECS, in culture medium Y3 + citric acid at 250 mg.L<sup>-1</sup> showed cells embryogenic characteristics compared with cells in culture medium MS. About CA and AE test, thin ECS, at three months of culture, showed 36% of cells stained by CA with embryogenic potential. Somatic embryos with protoderm, fundamental meristem and procambium, without somaclonal variations, was observed by histological tests after five months of cultivation.

**KEYWORDS:** *Elaeis guineensis*, Tissue and Plant Organ Culture, Embryogenic Cells.

## 1 | INTRODUÇÃO

Na busca de patamares mais elevados de quantidade de óleo produzido por hectare, têm-se pesquisado espécies potenciais como, por exemplo, o dendezeiro, cujo rendimento pode atingir 6 t ha<sup>-1</sup> de óleo. Essa produtividade corresponde dez vezes à produção de óleo da soja, fato que caracteriza o dendê como a espécie de maior produtividade de óleo vegetal do mundo. Ele ainda tem a vantagem de poder ser explorado por um período aproximado de 25 anos (MIRAGAYA, 2005; CAMILLO et al., 2009).

O Brasil se destaca nesse cenário do biodiesel devido às suas grandes dimensões territoriais, diversidade edáfica e climática que são propícias ao plantio de dendezeiro (SOARES et al., 2011). No entanto, a expansão de palmeiras, tem sido limitada pela disponibilidade de mudas. A propagação convencional é realizada principalmente por meio de sementes, que apresentam baixas taxas de germinação

e requerem um período substancial de 1 a 3 anos, para produzir mudas (MARTINE et al. 2009, LUIS et al. 2010). Sendo assim, a propagação *in vitro* é uma alternativa eficiente para a propagação em larga escala de muitas espécies (KANCHANAPOOM e DOMYOAS 1999, STEINMACHER et al. 2007), incluindo o dendezeiro (DUVAL et al. 1988).

A embriogênese somática é um método de propagação *in vitro*, que permite a produção de plantas a partir de células diplóides, sem fusão de gametas. Ou seja, através dessa técnica é possível produzir plantas geneticamente iguais, denominadas clones, sendo um dos métodos mais promissores para o cultivo de mudas de dendezeiro com alta qualidade (THOMAS & RAO 1985). A embriogênese somática pode ocorrer de duas maneiras: indiretamente, com uma fase intermediária caracterizada por formação de calos ou diretamente, sem formação anterior de calos (GUERRA et al. 1998).

Na embriogênese somática indireta, ocorre a desdiferenciação dos tecidos para a formação de calos e posterior diferenciação para formação de embriões somáticos. Para a indução dessas respostas fisiológicas geralmente é necessária à adição de reguladores de crescimento. O Picloram se destaca entre os reguladores de crescimento usados para a indução de calos com potencial embriogênico no cultivo com palmeiras (STEINMACHER et al., 2007; MOURA et al., 2008; PÁDUA et al., 2013; MAZRI et al., 2018). A associação de auxinas com citocinas, também pode favorecer a formação de calos, como observado em *Paspalum vaginatum* Flüggé (NEIBAUR & ALTPETER, 2008) e *Elaeis guineensis* Jacq (SILVA et al., 2009; BALZON, 2013).

A embriogênese somática também pode ser obtida por meio de suspensões celulares. Geralmente, estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido. As suspensões devem ser mantidas no escuro e sob agitação, a fim de evitar a formação de gases e gradientes nutricionais indesejáveis no meio de cultivo (LIMA, 2009).

Algumas espécies, principalmente as plantas lenhosas, demandam a adição de antioxidantes no meio de cultivo, para impedir o escurecimento das culturas. Os principais antioxidantes utilizados no cultivo *in vitro* são o ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, polivinilpirrolidona (TORRES et al., 2018 ÂNGELO et al., 2013; BALZON et al., 2013). Suspensões celulares de *Bauhinia holophylla* foram obtidas, com melhor padrão de crescimento, a partir da utilização de meios de cultivo suplementado com ácido cítrico (REZENDE, 2018).

O crescimento e a qualidade das suspensões celulares, pode ser observado por meio de diferentes metodologias. Qualitativamente é possível identificar por meio de análises histológicas, células com potencial embriogênico (FILLIPI et al. 2001; STEINER et al. 2005; MOURA et al. 2008). As células embriogênicas são pequenas

e morfologicamente constituídas de núcleo volumoso, conteúdo citoplasmático denso e parede celular delgada, devido à alta atividade metabólica, as não embriogênicas apresentam célula alongadas e possuem núcleos pequenos e citoplasma menos denso em função do maior grau de vacuolização (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al. 2005). A seleção das suspensões celulares com características embriogênicas aumenta significativamente a eficiência do processo de propagação *in vitro*, reduzindo o tempo necessário e os custos de produção. Outro teste é a dupla coloração com Carmim-Acético e Azul-de-Evans, esses corantes inferem o potencial embriogênico da suspensão. Células com características embriogênicas são reativas ao Carmim-Acético e geralmente se dispõem em aglomerados, enquanto que as células permeáveis ao Azul-de-Evans são alongadas e altamente vacuoladas (STEINER, 2005).

Além disso, durante o cultivo de tecidos vegetais *in vitro*, existe o risco de ocorrerem variações somacloniais nas células, embriões somáticos ou nas plantas regeneradas. Sendo esse risco maior quando as plantas são adventícias, ou seja, originam-se por meio de calos, de suspensão celular, de protoplastos e de embriogênese somática. Por meio de análises histológicas, além de observar as características embriogênicas e não embriogênicas da cultura pode-se também acompanhar o padrão de desenvolvimento dos embriões somáticos e avaliar a possibilidade de variações somacloniais.

Assim, a cultura de células ou suspensão celular é uma técnica que permite a indução, multiplicação e manutenção de células em meio líquido, as quais apresentam taxas de divisão muito mais elevadas comparadas as cultivadas em meio sólido (GUERRA et al., 1999; MATSUMOTO, 2006; GEORGE et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi otimizar o estabelecimento de suspensões celulares *in vitro* de dendêzeiro e avaliar o seu potencial embriogênico.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e desinfecção

Para a realização deste estudo, foram utilizadas inflorescências de *E. guineensis* Jacq. híbrido IRHO da empresa DENPASA do estado do Pará, Brasil. As inflorescências foram lavadas em água corrente e a primeira bráctea foi removida. Em seguida, levadas para câmara de fluxo laminar, imersas em hipoclorito de sódio (1,25%) adicionado de 5 gotas de Tween por litro e mantidas em agitador magnético, sob agitação constante por 20 minutos. Posteriormente, as inflorescências foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e a segunda bráctea foi removida para expor as inflorescências.

## 2.2 Indução e multiplicação de calos

Para indução de calos, explantes de 0,5 cm das inflorescências foram isolados e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), adicionado da auxina picloram, na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> e suplementado com carvão ativado a 0,1%. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em uma sala de crescimento, no escuro e a temperatura de 27 ± 2 °C. Dez explantes foram inoculados por placa de Petri, e foram utilizadas 10 placas por tratamento, totalizando 10 parcelas com 10 repetições.

Na multiplicação dos calos embriogênicos, foi utilizado o meio de cultura denominado MM, consistido de meio de cultura MS com metade dos sais, suplementado de 5 µM de 2,4-D; 4,92 µM de IBA; 9,84 µM de 2-iP; 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose. Os explantes foram transferidos para novo meio de cultura a cada 30 dias. Durante o experimento, que totalizou 3 meses, os calos foram mantidos em uma sala de crescimento, no escuro, a uma temperatura de 27 ± 2° C.

## 2.3 Suspensão celular

Para a obtenção das suspensões celulares, os calos foram inoculados em erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de meio de cultura líquido e 2 g de calos. Os meios de cultura avaliados foram, meio de cultura A constituídos pelo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais e suplementado de 5 µM de 2,4-D; 4,92 µM de IBA; 9,84 µM de 2-iP, utilizado como controle, Meio B – meio de cultura A acrescido de 250 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; Meio C - meio de cultura A suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; Meio de cultura D – meio de cultivo Y3 (EEUWENS, 1978) suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de picloram, Meio E – meio de cultura D suplementado com 250 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; Meio F - meio de cultura D suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico. Todos os meios de cultivo foram adicionados de 30g. L<sup>-1</sup> de sacarose e o pH foi ajustados para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. As suspensões celulares foram mantidas em shaker a 100 rpm, no escuro, e o meio de cultivo foi renovado em dois terços do volume a cada 15 dias. Após 15 dias de cultivo as suspensões celulares foram avaliadas quanto à oxidação.

### 2.3.1 Análises Citológicas das Suspensões celulares

As suspensões celulares classificadas como grossas e finas, cultivadas durante três meses em meio de cultura B e E, foram selecionadas para análises citológicas.

Amostras das suspensões celulares foram fixadas em FAA (formol, ácido acético e etanol), durante 72 horas, e conservadas em etanol 70%. Para o preparo das lâminas, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas em álcool

+ resina (50%) overnight, em seguida em resina pura durante 48 horas, e depois emblocadas em resina Leica, de acordo com o protocolo do fabricante. Os blocos de resina foram seccionados, com espessura de 5  $\mu\text{m}$ , em micrótomo rotativo, coradas com Azul de toluidina 0,05%, montadas em lâmina e visualizadas nos aumentos de 100x e 200x em microscópio fotônico Zeizz Scope.A1 acoplado com câmera.

### *2.3.2 Cultivo de suspensões celulares finas*

As suspensões celulares finas, obtidas quando peneirou a primeira suspensão celular iniciada pelos calos, foram cultivadas em meio de cultura MS líquido (sem adição de agar), durante 5 meses, com metade da concentração de sais e adicionado de 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; 4,92  $\mu\text{M}$  de IBA; 9,84  $\mu\text{M}$  de 2-iP suplementado com 250 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico e analisadas por testes citológicos (item 2.3.1).O potencial embriogênico foi analisado através do teste de dupla coloração Carmim acético e Azul de Evans.

#### *2.3.2.1 Análise do potencial embriogênico*

As características pró-embriogênicas das suspensões celulares finas foram analisadas pelo teste de dupla coloração com Carmim acético e Azul de Evans. Para avaliação foi coletado em tubos Eppendorf, 1mL de suspensão celular. Após a decantação, o sobrenadante foi retirado com uma pipeta e então adicionado 200  $\mu\text{L}$  do corante Carmim acético 2% onde permaneceu em reação por 1 minuto. Após esse período o material foi lavado com água destilada para a retirada do excesso do corante. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de Azul-de-Evans 0,1%, o qual ficou em reação por 30 segundos, com posterior lavagem utilizando água destilada para retirada do excesso do corante (VALENTE, 2007). Por fim foram adicionados em cada eppendorf 200 $\mu\text{L}$  de água glicerinada 50% das quais foram distribuídos 20 $\mu\text{L}$ /lâmina, sendo 5 lâminas para cada tratamento.

As suspensões celulares foram visualizadas (Leica Microscópio DM LS® com a câmera Nikon® conectada) em aumento de 200X. As áreas coradas com Carmim acético (CA) e Azul de Evans (AE) foram medidas utilizando-se o software ImageTool e os 5 melhores campos de cada lâmina foram digitalizados. A calibração do software foi feita por meio de digitalização de uma lâmina micrometrada, utilizada no mesmo aumento das fotografias (PEREIRA et al., 2008).

Foram avaliadas as porcentagens das áreas coradas com CA e AE e a área total ocupada pelas células da suspensão celular, através de análise estatística. Os dados foram analisados de forma completamente randomizado (CRD), com 25 repetições. Os resultados foram comparados utilizando-se teste de Scott-Knott a 5% do valor nominal em nível de significância(Software Sisvar 5.0,FERREIRA, 2008)

## 2.2 Resultados e discussão

As suspensões celulares foram obtidas a partir de calos embriogênicos induzidos nos meios de cultivo MS e Y3. No entanto, as ECS obtidas no meio de cultura B e C apresentaram, a partir do terceiro dia, após a inoculação, escurecimento e a oxidação das células, apesar da introdução do agente antioxidante ácido cítrico nas concentrações de 250 e 500 mg.L<sup>-1</sup>, .. Por outro lado, os meios de cultura E e F; constituído dos sais do meio de cultura Y3 e ácido cítrico em ambas as concentrações, não apresentaram oxidação.

As suspensões celulares foram classificadas em grossa (Figura 1 A e C), obtidas a partir dos calos inoculados e suspensão celular fina (Figura 1 B e D), resultantes das células que se soltaram da suspensão celular grossa e foram peneiradas em peneira de inox autoclavada (Figura 1 B e D).

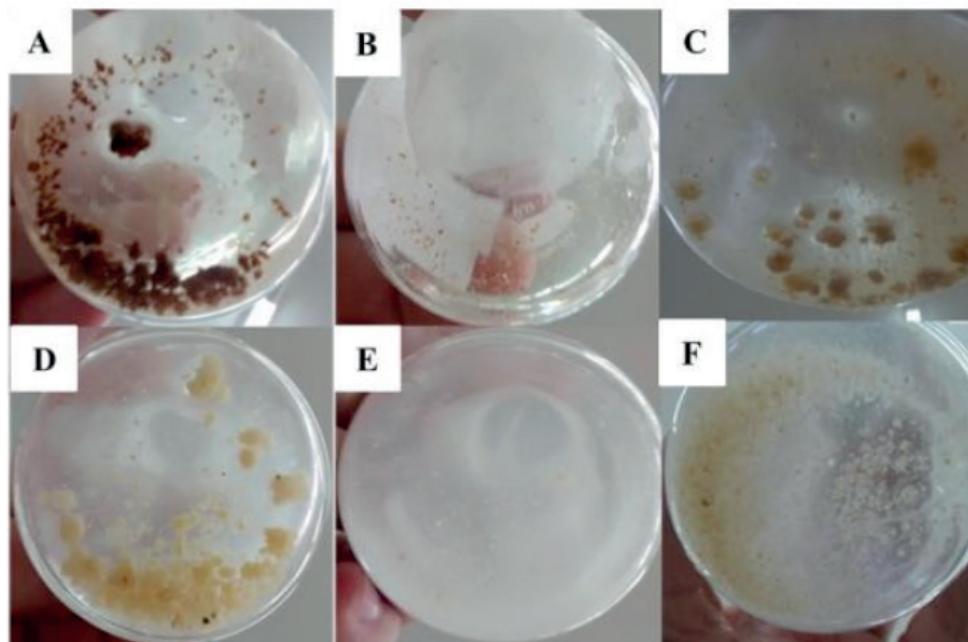


Figura 1 – Suspensão celular de *Elaeis guinensis* híbrido IRHO em diferentes meios de cultura. A) Suspensão celular em meio de cultura A. B) Suspensão celular em meio de cultura B. C) Suspensão celular em meio de cultura C. D) Suspensão celular em meio de cultura D. E) Suspensão celular em meio de cultura E. F) Suspensão celular em meio de cultura F.

A oxidação das culturas pode ser reduzida com por diversas maneiras dependendo do explante e da espécie em estudo, como exemplo o pré-tratamento dos explantes, a adição de antioxidantes ao meio de cultura, a incubação inicial dos explantes no escuro e a redução da concentração de sais ao meio de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA 1998, AKHTAR et al., 2016).

Neste trabalho, verificou-se que a introdução do antioxidante ácido cítrico, nas concentrações avaliadas, não foi eficaz no controle da oxidação das células cultivadas em meio de cultura A. Porém, a redução das concentrações de sais, que

constituem o meio de cultura B (Y3), suplementado com ácido cítrico em ambas as concentrações testadas, promoveu a ausência de oxidação nas suspensões celulares.

Kanchanapoom e Chourykaew (1998), para evitar a oxidação das culturas, subcultivaram semanalmente as suspensões celulares de dendezeiro e obtiveram uma suspensão celular após três meses de cultivo.

O escurecimento dos tecidos também tem sido atribuído à liberação de compostos fenólicos, durante a excisão dos explantes, inibindo o crescimento das células vegetais e levando à morte (JONES e SAXENA et al. 2013). O dendezeiro, assim como as plantas lenhosas, tende a oxidar ao redor da superfície excisada, fato que pode interferir na composição do meio de cultivo e na absorção de nutrientes (CORDEIRO et al., 2004; NIC-CAN et al., 2015). Por isso, se faz necessária muitas vezes a introdução de agentes antioxidantes, como exemplo o ácido cítrico (TORRES et al., 2018), carvão ativado (BALZON et al., 2013), ácido ascórbico e polivinilpirolidona (ÂNGELO et al., 2013) são os mais citados no cultivo *in vitro* de lenhosas (BALZON et al., 2013).

Outro fator que pode gerar a oxidação das culturas *in vitro* é a constituição do meio de cultivo utilizado. O meio de cultura Y3 é composto por pequenas concentrações de sais, em relação ao meio de cultivo MS, que apesar de ter sido utilizado com metade de seus nutrientes, contém maior concentração de sais, principalmente o macronutriente nitrogênio.

O processo oxidativo em espécies lenhosas pode estar relacionado à concentração dos sais minerais do meio de cultura, especialmente o nitrogênio, a partir do nitrato de amônio (FORTES, 1992; CORDEIRO et al. 2004). O nitrogênio é incluído no meio nutritivo na forma de sais inorgânicos, porém a forma e a concentração requerida é variável entre as espécies, sendo necessário encontrar o balanço ideal de  $\text{NH}^{4+}$  /  $\text{NO}^{3-}$  para um desenvolvimento satisfatório (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

### **Análises Citológicas das Suspensões celulares**

As suspensões celulares classificadas como grossas cultivadas em meio de cultura B, apresentaram regiões com células alongadas e na região interna aglomerados de células com formato arredondado, porém poucas células apresentavam núcleo evidente. Por outro lado, as suspensões celulares finas, no mesmo meio de cultivo B, apresentaram aglomerados com células pequenas e isodiamétricas, características embriogênicas; e ao redor células mais alongadas e sem núcleo evidente, caracterizando células inviáveis.

No entanto, ambas as suspensões celulares, grossas e finas, cultivadas em meio de cultura E, apresentaram características embriogênicas, como aglomerados

de células arredondadas, com núcleo proeminente, intensa divisão celular e poucas regiões formadas por de células com aspecto inviável.

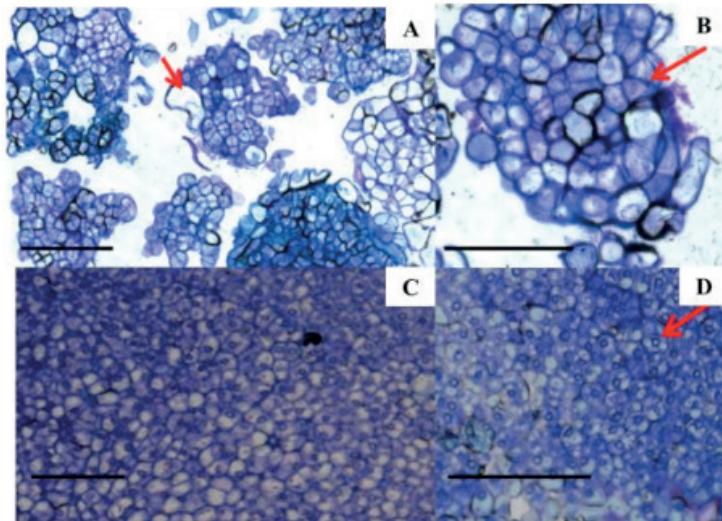


Figura 2 – Fotomicrografias das células de suspensões celulares de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) coradas com azul de toluidina a 0,12%. A) Suspensão celular grossa em Meio de cultivo B. Células alongadas sem núcleo evidente (setas). B) Suspensão celular fina em meio de cultura B. Células dispostas em aglomerados. C) Suspensão celular grossa em meio de cultura E. Células justapostas, isodiamétricas com núcleo proeminente e intensa divisão celular. D) Suspensão celular fina em meio de cultivo F. Células dispostas em aglomerados com núcleo proeminente.

Torres et al. (2013), observaram células com potencial embriogênico de cafeiro, cultivadas em suspensão até os 20 dias sem a renovação do meio de cultura. A suspensão celular apresentava pequenas células isodiamétricas com divisão celular aparente, núcleos grandes (TORRES et al., 2013). No presente estudo as suspensões celulares mantiveram seu potencial embriogênico, variando a quantidade de células embriogênicas, durante a renovação do meio de cultura a cada 15 dias.

### Análise do potencial embriogênico

As suspensões podem apresentar ou não características embriogênicas, e alguns testes colométricos podem ser utilizados para a determinação da viabilidade celular. Os corantes Carmim-Acético e Azul-de-Evans refletem a integridade das estruturas celulares como o núcleo e membrana plasmática (VAZHANGAT e THOPPIL, 2016).

As suspensões celulares finas cultivadas em meio de cultura E, durante cinco meses, foram analisadas quanto ao potencial embriogênico, utilizando-se o teste de dupla coloração com os corantes Carmim acético e Azul de Evans. Foram identificados aglomerados celulares com forte afinidade pelo corante Carmim Acético, coradas de vermelho e circundado por células coradas com Azul de Evans. As células coradas com Carmim Acético são pequenas e isodiamétricas e justapostas, em contraste com as células coradas com Azul de Evans, que são alongadas e dispersas. Nas

suspensões celulares analisadas, apresentaram 64% de área corada com Azul de Evans e 34% com Carmim acético.

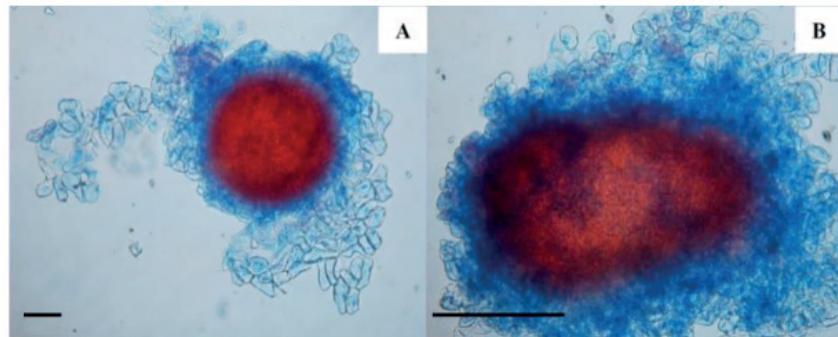


Figura 3 – Fotomicroscopia do teste de dupla coloração com Carmim acético e Azul de Evans das suspensões celulares finas em meio de cultura E. Células alongadas com espaço intercelular e sem núcleo evidente, coradas com Azul de Evans (setas) e células justapostas, pequenas e isodiamétricas coradas com Carmim Acético (CPE= células com potencial embriogênico).

Segundo Munhoz et al. (2008), a reação positiva ao corante Carmim Acético demonstra integridade cromossômica. Nossos dados corroboram os achados de Steiner et al. (2005), que enfatizam a afinidade do corante Carmim acético para pequenas células isodiamétricas e o Azul de Evans afinidade por células alongadas em calos da *Araucaria angustifolia*. O Azul de Evans penetra nas rupturas da membrana plasmática das células, indicando a morte celular (BHARGAVA et al., 2007). A viabilidade celular e a permeabilização da membrana obviamente mudaram quando as células foram transferidas para o meio líquido. A transferência provoca rápido aumento nos níveis de atividade da polifenol oxidase e na produção de polifenóis (YALI et al., 2015).

Gatica-arias et al. (2008) avaliaram a viabilidade embriogênica das suspensões celulares de cafeeiro usando o corante Azul de Evans, observaram que as células não viáveis se coram intensamente de azul, enquanto células viáveis não reagiram e apresentaram forma isodiamétrica, citoplasma denso e núcleo com nucléolos proeminente. A quantidade de Azul de Evans que entra e se liga à célula reflete o grau de perda de integridade da membrana celular (XU et al. 2014).

### Análises citológicas das suspensões celulares finas

As suspensões celulares finas em meio de cultura E, após cinco meses de cultivo, apresentaram organização tecidual, sugerindo o desenvolvimento de embriões somáticos. Os aglomerados celulares passaram a apresentar os tecidos meristemáticos primários protoderme, meristema fundamental e procâmbio. Nesta fase de desenvolvimento não foram identificadas variações estruturais, que podem ser indicadoras de variações somacloniais no cultivo de dendezeiro (Figura 4).

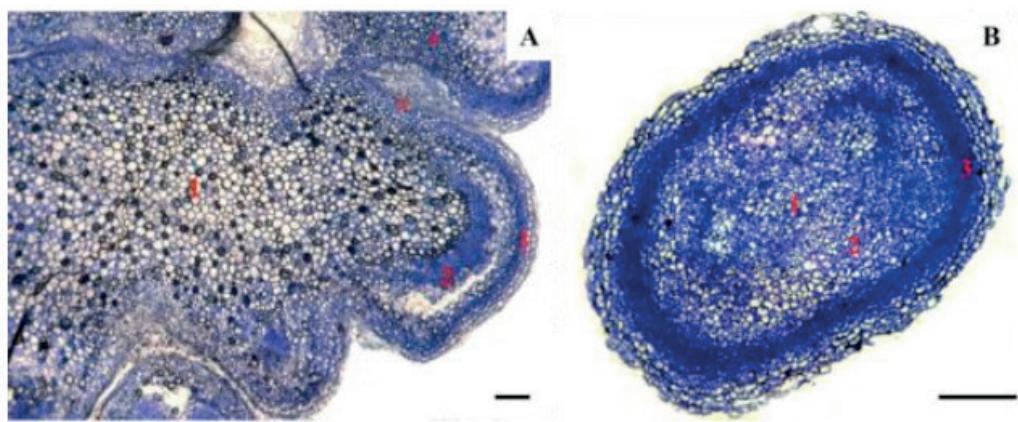


Figura 4 – Fotomicrografia de embriões somáticos obtidos de suspensões celulares finas. A) Embriões em estádio globular para torpedo. Início de formação de possíveis traqueídes..B) Embriões em estádio torpedo. 1 e 2 –meristema fundamental e 3 – Procâmbio.

Monteiro et al. (2011) estudaram suspensões celulares de bananeira e observaram o efeito do tamanho dos propágulos, diferenciados em meio de cultura de consistência líquida. Esses autores observaram que propágulos celulares superiores a 5 mm de diâmetro permitiram maior regeneração e diferenciação de embriões somáticos. Diferente deste trabalho, pois as suspensões grossas não desenvolveram embriões somáticos. Esses resultados corroboram com os encontrados por Monteiro (2013) em estudos com suspensões celulares de dendezeiro, mostrando que o padrão dos propágulos é dependente da espécie.

Dados de estudos com outra palmeira *Phoenix dactylifera*, mostraram que os embriões formados possuem células pequenas com características meristemáticas e núcleos densos (ASLAM et al., 2011).

Balzon et al. (2013) observaram em *Elaeis guineensis*, que as células embriogênicas que se proliferaram possuem características isodiamétricas, pequenas, com citoplasma denso e núcleo volumoso. A partir dessas células, foi possível observar a formação de proembriões.

Células fortemente coradas mostradas na figura 4<sup>a</sup> por setas, indicam a ocorrência de possíveis elementos traqueias, também observados em estudos com dendezeiro por Monteiro (2013), onde observaram em cultura de células em suspensão a diferenciação de agregados celulares, com a presença de elementos traqueais identificados por paredes celulares espessadas. Provavelmente, devido a isso a maior afinidade pelo corante, como também observado neste estudo. Segundo Monteiro (2013) a ocorrência de elementos traqueais entre as estruturas globulares, confirma a sua origem procambial.

Resultados semelhantes foram relatados por Ângelo et al. (2013) que observaram a formação de procâmbio, meristema fundamental e protoderme; em embriões de dendezeiro. Monteiro (2013) observou essa diferenciação, das suspensões celulares em embriões somáticos, após 30 dias. Neste estudo foi possível observar a presença

de embriões somáticos, após cinco meses de cultivo. Este fato pode estar relacionado com alterações nas concentrações dos reguladores de crescimento usados no meio de cultivo.

Fki et al. (2003), observaram que o desenvolvimento de grande número de embriões somáticos em células em suspensão de tamareira (*Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour) ocorreu em meio de cultura com composição diferente do meio de cultivo utilizado para de indução das suspensões celulares.

No presente estudo as regiões meristemáticas, formadas por células com núcleos grandes em relação ao citoplasma, intensa atividade metabólica e divisão celular corroboram com as características observadas por Moura et al. (2008) e Silva et al. (2012), em trabalhos realizados com as palmeiras *Acrocomia aculeata* e *Elaeis guineensis*, respectivamente.

Verdeil et al. (2001) e Sané et al. (2006), estudando a aquisição da competência embriogênica em *Cocos nucifera* e *Phoenix dactylifera*, respectivamente, observaram o isolamento dos pró-embriões pelo espessamento da parede celular exterior.

Em dendezeiro, Balzon et al. (2013) e Silva et al. (2012), também observaram na fase de indução da embriogênese somática, regiões meristemáticas, com intensas divisões celulares, que posteriormente evoluíram para agrupamentos de células com pró-embriões, em fase semelhante ao estágio globular. Através dos cortes histológicos, também foram observadas células parenquimáticas grandes e vacuoladas, com espaços intercelulares reduzidos e parede celular mais espessa do que nas demais células dos agregados.

Al-Khayri (2012) observaram em *Phoenix dactylifera* L. aumento na produção de embriões somáticos pela técnica de suspensão celular.

### 3 | CONCLUSÃO

As suspensões celulares de dendezeiro foram obtidas com maior sucesso em meio de cultura Y3 suplementado com 250 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, sem oxidação das células e meio de cultivo.

Por das análises histológicas pode-se confirmar que o meio de cultivo Y3 suplementado com 250 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico mais indicado, utilizando suspensões celulares finas, pois as células apresentaram em maior quantidade com características embriogênicas.

O teste de dupla coloração com CA e AE apresentou células com alto potencial embriogênico.

As suspensões celulares finas, com 5 meses de cultivo, contém embriões somáticos com padrão de desenvolvimento normal.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, G. et al. Effect of Antioxidants, Amino Acids and Plant Growth Regulators on *in vitro* Propagation of *Rosa centifolia*. **Iranian journal of biotechnology**, SL, v.14, n.1, p. 51–55, 2016.
- AL-KHAYRI, J. M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, SL, v. 24, n.5, p. 444-455, 2012.
- ÂNGELO, P. C. S. et al. Histological analysis and transcription profiles on somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineensis* × *E. oleifera*. **Agricultural Sciences**, SL, v.4, n.11, p.1-11, 2013.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al. The origin and anatomy of rhizophores in Vernonia herbacea and V. platensis (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. **Australian Journal of Botany**, SL, v. 53, n. 3, p. 273-279, 2005.
- ASLAM, J. et al. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Jurnal of Biolofical Sciences**, SL, v.18, n.4, p. 369–380, 2011.
- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSK-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 1, p.41-50, 2013.
- BHARGAVA, A. et al. Expression of a polyphemusin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, SL, v. 88, n. 3, p. 301-312, 2007.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, Brasília, p.87-132, 1998.
- CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA. Tolerância de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.44, n.2, p.211-215, 2009.
- CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos in vitro de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, p. 118-124, 2004.
- DUVAL, Y. et al. *In vitro* vegetative production of oil palm (*Elaeis guineensis* JACQ) strategy and results. **Oleagineux**, SL, v.43, n.2, p.39-47, 1988.
- EEUWENS, C. J. Effects of organic nutrient and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. **Physiology Plant**, SL, v. 42, p.173-178, 1978.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Pernambuco, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA; B. RORIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 58, n.4, p.711-716, 2001.
- FKI, L. et al. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, SL, v. 21, n.6, p. 517–524, 2003.

FORTES, G. R. de L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus spp*) afetados por fatores físicos, químicos e biológicos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

GATICA-ARIAS, A.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. 'Caturra' and 'Catuaí'. **Electronic Journal of Biotechnology**, SL, v. 11, n. 1, p. 101-112, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, 3 ed. Dordrecht: The Background, p.205-226, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, Brasília, v.1, p. 183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES AC, CALDAS LS and BUSO JA (Eds), Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, Brasília, v. 2, 1998.

GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e semente sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, L. A. (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, Brasília, v. 2, p.533-568, 1999.

JONES, A. M., SAXENA, P. K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **PloS one**, SL, v. 8, n.10, 2013.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURYKAEW, B. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Science Society of Thailand**, v.24, p. 241-250, 1998.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Asia**, SL, v. 25, p.195-202, 1999.

LIMA, C. D. F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. prata-anã**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2009.

LUIS ZG, BEZERRA KMG AND SCHERWINSKI -PEREIRA JE. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n.3, p. 209-215, 2010.

MARTINE, B. M. et al. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, SL, v. 4, n.10, p.931-937, 2008.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 126f., 2006.

MAZRI, M. A. et al. A combined pathway of organogenesis and somatic embryogenesis for an efficient large-scale propagation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. **Biotechnology**, Berllim/Alemanha, v.8, n.4, p.215, 2018.

MIRAGAYA, J.C.G. **Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.26, .229, p.7-13, 2005

MONTEIRO, T. R. **Embriogênese somática e regeneeração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão**. Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MONTEIRO, T. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O.; MATSUMOTO, K.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. especial, p 213-221, 2011.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius). **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, SL, v. 95, n. 2, p. 175-184, 2008.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, SL, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen/Dinamarca, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NEIBAUR, I.; GALLO, M.; ALTPETER, F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, SL, v.44, n.6, p.480, 2008.

NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; DE-LA-PEÑA, C.; ALCAZAR-MAGAÑA, A.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus. **PLoS one**, SL, v. 10, n.6, 2015.

PÁDUA, M. P.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G; ALVES, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, SL, v.85, n.4, p.1545-1556, 2013.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p.1649-1656, dez. 2008.

REZENDE, M. E. D. **Criopreservação de sementes e obtenção de suspensão celulares de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. (Fabaceae: Cercideae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis, 2018.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, E.; GASSAMA-DIA, Y. K.; TROUSLOT, M. E.; DUVAL, U.; BORGEL, A. Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, SL, v. 98, n.2, p. 301-308, 2006.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; MARQUES, S. V.; MARQUES, R. V.; PASQUAL, M. Diferentes reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embrióides em anteras de cafeeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p.19-27, 2009.

SIVA, R.; MAYES, S.; BEHERA, S. K.; RAJASEKARAN, C. Anthraquinones dye production using root cultures of *Oldenlandia umbellata* L. **Industrial Crops and Products**, SL, v.37, n.1, p. 415-419, 2012.

SOARES, J. D. R., RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; NUNES, C. F.; ARAUJO, A. G. Germinação de embriões e crescimento inicial in vitro de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p. 773-778, 2011.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, SL, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS A. C. M.; STEFENON V. M.; CLEMENT C. R.; GUERRA M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, SL, v. 100, n.4, p.699-709, 2007.

THOMAS, V.; RAO, P. S. *In vitro* propagation of palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq var Tenera) through somatic embryogenesis in leaf-derived callus. **Current Science**, SL, v. 54, 1985

TORRES, L. F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de Coffea arábica.** Dissertação (Mestrado), Univesidade Federal de Lavras, Lavras 2013.

TORRES, L. F. et al. Histological analyses reveal promising features in *Coffea arabica* cell suspension culture. **Journal of Experience Agriculture International**, v. 25, n. 5, p. 1-12, 2018

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em Araucaria angustifolia.** 2007. 97p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VAZHANGAT, P.; THOPPIL, J. Apoptotic induction via membrane/DNA damage and metabolic inactivation by synthetic food colorants in *Allium cepa* root meristem. **Turkish Journal of Biology**, SL, v.40, n.4, p. 922-933, 2016.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?. **Trends Plant Science**, SL, v.12, n. 6, p. 245-252, 2007.

XU, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, C.; CHEN, H. Effects of Ce4+ on membrane integrity of rice in seedling hydroponic cultures. **Agricultural Science**, SL, v.5, n. 9, p. 785–792, 2014.

YALI, L.; TINGTING, M.; YUXI, W.; XIAOLI, Z. Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. **Agriculture and Environmental Biotechnology**, SL, v. 30, n. 2, p. 277-283, 2015.

## HISTOQUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E MELANOGÊNICA DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta* (*Ker Gawl.*) Miers EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 EXPOSTA À RADIAÇÃO UVA E UVC

Data de aceite: 12/12/2019

### Elias Jorge Muniz Seif

Universidade Federal de São Paulo, Mestrando em Biologia Molecular, Departamento de Biofísica, São Paulo – SP

### Alba Lucilvânia Fonseca Chaves

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professora Doutora Adjunta de Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

### Silvana Gaiba

Universidade Federal de São Paulo, Professora Doutora do Departamento de Cirurgia, São Paulo – SP

### Bruna Bomfim dos Santos

Universidade Estadual de Santa Cruz, Discente do Curso de Enfermagem, Departamento de Saúde, Ilhéus – Ba

### Ana Carolina Moraes Fernandes

Universidade Federal de São Paulo, Doutora da Unidade de Tratamento de Queimaduras (UTQ), Departamento de Cirurgia, São Paulo – SP

### Luiz Alberto Mattos Silva

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor Assistente de Botânica, Curador do Herbário UESC, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus - Ba

### Lydia Masako Ferreira

Universidade Federal de São Paulo, Professora Doutora Titular da Cirurgia Plástica, Departamento de Cirurgia, São Paulo – SP

### Jerônimo Pereira de França

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor Doutor Adjunto de Biofísica, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

### Lucimar Pereira de França

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professora Doutora Adjunta de Biofísica, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus – Ba

**RESUMO:** Existem um grande número de doenças que podem acometer a pele, desde despigmentação como no vitiligo à formação de metástase como no câncer de pele do tipo melanoma que pode levar a morte do indivíduo. As plantas são utilizadas como medidas terapêuticas para tratamento da saúde desde os primórdios da civilização humana, sendo a principal fonte de novas moléculas com grande potencial medicinal. A *Pyrostegia venusta* (*Ker Gawl.*) Miers é usada na Medicina tradicional Brasileira, popularmente conhecida como Cipó-de-São-João. É uma planta utilizada para o tratamento de infecções respiratórias, diarreias, doenças inflamatórias e como terapia apropriada para tratamento da despigmentação da pele (Vitiligo). Esse estudo teve como objetivo avaliar a composição histoquímica de flores, bem como determinar a atividade citotóxica e melanogênica de células de melanoma murino B16-F10 induzida pelo extrato etanólico de flores de *Pyrostegia venusta* (eePV). Foram

utilizadas técnicas de histoquímica para marcação de compostos presentes na sua estrutura floral. Avaliou-se a citotoxicidade do eePV e da radiação ultravioleta A (UVA) e C (UVC) pelo método de fotométria (MTT) e por microscopia de fluorescência. Além disso, quantificou-se a concentração de melanina antes e após tratamento com eePV e/ou radiação UVA e UVC. Nossos resultados da histoquímica mostraram a presença de compostos fenólicos, flavonoides e amido nas flores. O eePV induziu citotóxica seletiva em um fator superior a 3 em B16-F10 em relação as células controles de ovário de hamster chinês (CHO-K1). Além disso, o eePV induziu aumento significativo do conteúdo de melanina que foi concentração e tempo dependente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas Medicinais; Citotoxicidade; Câncer.

**HITOCHEMICAL, ACTIVITY CYTOTOXIC AND MELANOGENIC OF THE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers FLOWERS IN CELLS OF MURINO MELANOMA B16-F10 EXPOSUD TO UVA AND UVC RADIATION**

**ABSTRACT:** There are a large number of diseases that can affect the skin, from depigmentation such as vitiligo to metastasis formation such as melanoma skin cancer that can lead to death. Plants have been used as therapy for health care since the beginning of human civilization, being the main source of new molecules with high medicinal potential. *Pyrostegia venusta* miers is used in traditional Brazilian medicine, popularly known as "cipó-de-São-João". It is a plant used to treat respiratory infections, diarrhea, inflammatory disease and appropriate therapy on treatments for skin depigmentation (vitiligo). This study aimed to evaluate the histochemical composition of flowers as well as to determine the cytotoxic and melanogenic activity of murine B16-F10 melanoma cells induced by the ethanolic extract of *Pyrostegia venusta* miers (eePV) flowers. Hytochemistry techniques were used to label compounds present in their floral structure. The cytotoxicity of eePV and ultraviolet radiation A (UVA) and C (UVC) was evaluated by photometric method (MTT) and fluorescence microscopy. In addition, melanin concentration was quantified before and after treatment with eePV and / or UVA and UVC radiation. Our histochemical results showed the presence of phenolic compounds, flavonoids and starch in the flowers. EePV induced selective cytotoxic factor greater than 3 in B16-F10 melanoma cells relative to chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. In addition, eePV induced a significant increase in melanin content which was concentration and time dependent.

**KEYWORDS:** Medicinal plants; Cytotoxicity; Cancer.

## **1 | INTRODUÇÃO**

Vitiligo é a doença de desordem pigmentar mais prevalente em todo o mundo, com taxa de incidência podendo variar entre 0,1% a 2% na população mundial. Sua prevalência é mais relatada por pessoas que possuem pele mais pigmentada, no entanto não há dados que associem o vitiligo com uma etnia específica (WOLFF *et*

*al.*, 2008). Essa doença possui caráter genético, provocada por alteração de caráter dominante em gene autossômico com penetrância incompleta (BURNS *et al.*, 2004), com isso é possível observar uma maior probabilidade de aparecimento em pessoas filhas de indivíduos com essa síndrome. No entanto não se exclui o aparecimento de novos casos em famílias que antes não havia sido observadas (LOTTI *et al.*, 2008; LEBWOHL *et al.*, 2013).

O melanoma é outra enfermidade que acomete a pele, possuindo importância epidemiológica ainda maior. Foram estimados para o ano de 2018 cerca de 6280 novos casos somente no Brasil. Apesar de ser o tipo de neoplasia com menor prevalência no tecido cutâneo, possui alta taxa de mortalidade, fazendo com que o indivíduo acometido tenha poucas chances de se reestabelecer (DE OLIVEIRA SANTOS, 2018).

As plantas produzem grupos de substâncias conhecidas como metabólicos secundários e nesse grande grupo estão classificados os terpenos, alcaloides e flavonoides, que como o próprio nome sugere, possuem função secundárias na manutenção da viabilidade do indivíduo, ou seja, não sendo necessária como requisitos mínimos para a vida da planta. Normalmente estão associados a atividade antioxidantes, antimicrobiana, reprodutora além de ser utilizado na proteção contra predação por herbívoros. Desta forma as plantas possuem um grande potencial medicinal, podendo ser material para estudo e possivelmente elaboração de novos fármacos (ROSENTHAL E BERENBAUM, 2012).

O uso de plantas como medida terapêutica foi adotado por várias comunidades ao redor do mundo durante a história, essa prática é ainda bastante difundida em nosso país. *Pyrostegia venusta* Miers é conhecida popularmente como cipó de são João, é nativa do Brasil e, por conta da sua utilização como ornamentação de jardins, atualmente ela possui uma distribuição bem ampla ao longo país (MEANINGER, 1970). Além disso, seu tônico, preparado a partir da decocção das suas cascas, folhas ou flores é largamente utilizado na medicina tradicional para o tratamento diversas doenças, dentre elas estão, infecções respiratórias, bronquite, diarreia, vitiligo, icterícia e náuseas (FERREIRA *et al.*, 2000).

Ao longo do tempo o conhecimento popular acerca de *Pyrostegia venusta* Miers vem sendo validado a partir de pesquisa científicas, mostrando resultado muito interessantes no ponto de vista da fitoquímica e da atividade biológica dos seus componentes. Atualmente já existem trabalhos que associam extratos dessa planta a atividade antioxidante (ROY *et al.*, 2011), antimicrobiana (BOUZADA *et al.*, 2009), antinflamatória (Roy *et al.*, 2012), melanogênica (MOREIRA *et al.*, 2012) e usada para o tratamento das complicações associadas a disfunções hormonais causas pela menopausa (VELOSO *et al.*, 2010).

Visto isso, este trabalho teve como objetivo identificar os compostos químicos

e avaliar o potencial do extrato etanólico das flores de *Pyrostegia venusta* Miers (eePV) na promoção da atividade citotóxica contra células de melanoma murinho B16-F10 bem como a capacidade melanogênica em B16-F10 após tratamento com eePV associada a irradiação com ultravioleta A e C.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e Preparo dos Extratos

O espécime em estudo foi coletado na cidade de Sete Lagoas - MG, sendo elaborada uma exsicata e depositada no herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) com o número de voucher: 20327 (Figura 1). Após coleta do material, as flores da *Pyrostegia venusta* Miers foram destacadas dos seus galhos, secas em estufa de circulação forçada de ar a 50°C durante uma semana e pulverizadas com o uso de moinho de facas. O extrato etanólico (eePV), foi preparado utilizando 10g das flores em pó e colocadas em contato com 100mL de Etanol (70%) durante 2 dias sendo protegido da luz. Após esse período os Extratos foram coados em papel filtro e secos com auxílio de centrifuga a vácuo à 4°C para evitar possível degradação de compostos presentes no extrato.



Figura 1 - *Pyrostegia venusta* Miers., ramos com flores e frutos.

### 2.2 Histoquímica das Flores

Para as reações histoquímicas foram feitos cortes a mão em botões florais em pré antese. Os cortes foram realizados com navalhas de aço de barbear e suporte de isopor na região mediana da corola. Cortes sem reação foram montados entre lâminas e lamínulas com água para o controle branco. Foram realizados testes para detectar a presença de compostos fenólicos com Cloreto férlico (JOHANSEN,

1940), para amido com Lugol (JOHANSEN, 1940), para lipídios totais com Sudam III (SASS, 1951) para alcalóides com reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG, 1981), para flavonóides com cafeína e DMACA (FEUCHT & SCHIMID, 1983) e para lignina com Floroglucinol acidificado (JOHANSEN, 1940).

### 2.3 Cultivo Celular

Nessa pesquisa foram utilizadas linhagens de melanoma murinho (B16-F10) e de ovário de hamster chinês (CHO-K1), ambas as linhagens obtidas através do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> com meio RPMI suplementadas com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de antibióticos, estreptomicina e gentamicina e meio de cultura foi renovado a cada 48 horas e mantidas em incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.4 Ensaio de Citotoxicidade do eePV, UVA e UVC por MTT

Para determinação da citotoxicidade em linhagens B16-F10 e CHO-K1, foram semeadas 5x10<sup>3</sup> células em placa de 96 poços. Após 24 horas foram realizados os estímulos com eePV em concentrações entre (1000 – 0,01µg/mL) permanecendo em contato com as células durante 48h, o mesmo foi feito em uma placa de 24 poços contendo 5x10<sup>4</sup> células, tendo alteração apenas na forma de tratamento. Nesse caso foi utilizado radiação ultravioleta do tipo A e C com energia entre (60 – 5 mJ/cm<sup>2</sup>), após o tratamento essas células também foram incubadas por 48h. Por fim, ambas as placas tiveram o meio substituído por solução de MTT (0,5mg/mL) diluído em meio RPMI sem suplementação sendo incubada durante 4 horas. Após isso a solução de MTT foi substituído por isopropanol, em seguida a absorbância desse ensaio foi quantificada utilizando fotometria com comprimento de onda de 570nm (RISS *et al.*, 2016).

### 2.5 Microscopia de Fluorescência

Foram semeadas 4x10<sup>4</sup> células de B16-F-10 em placa de 6 poços, após 24h foram estimuladas com eePV em concentração relativa ao valor do seu  $IC_{50}$  9,8µg/mL nos tempos de zero, 4 e 48 horas. Após o período determinado para cada grupo experimental, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol e coradas com os seguintes marcadores DAPI ( $\lambda_{EX} = 340\text{nm}$  e  $\lambda_{EM} = 488\text{nm}$ ) que possui afinidade pelo núcleo celular e Rodamina ( $\lambda_{EX} = 560\text{nm}$  e  $\lambda_{EM} = 580\text{nm}$ ) que interage com membrana plasmática da célula. Após período de 20 minutos para cada marcação, as células foram lavadas por mais duas vezes para retirar o excesso de marcadores (BUTCHER *et al.*, 1980; CHAZOTTE, 2011). Feito isso, os poços foram observados

com auxílio de microscópio de fluorescência.

## 2.6 Associação número de células e conteúdo de melanina:

Primeiro foi determinada a taxa de crescimento do melanoma B16-F10, para isso o número de células foi acompanhado durante 7 dias. O equivalente a  $1 \times 10^6$  células foram semeadas em uma placa de 6 poços, onde a cada dia as células eram retiradas dos poços com auxílio da solução de tripsina e o seu número era quantificado utilizando câmara de Neubauer e com auxílio de azul de trypan, para marcar quais células encontravam-se viáveis, após a quantificação das células nos quadrantes da câmara a seguinte equação foi respeitada (Número de células total/ número de quadrantes x 10000 x fator de diluição) para determinar o número total de células a cada dia.

Concomitantemente era feita medição da concentração de melanina intracelular para cada dia de estudo. Para isso as células foram lavadas com PBS (0,9% NaCl), e submetidas a uma solução de lise celular (PBS + 10% de dimetilsulfóxido) à 80°C durante uma hora, a melanina era solubilizada em hidróxido de sódio e a absorbância dessa reação foi mensurada utilizando fotometria com comprimento de onda de 475nm. Por fim, era relacionado o valor da absorbância da melanina encontrada a cada dia pelo número de células total, sendo que esse valor foi normalizado a partir do valor obtido no primeiro, permitindo determinar o aumento da melanina em valores percentuais (HYUN *et al.*, 2008).

## 2.7 Quantificação de melanina após tratamento com eePV e / ou irradiação UVA e UVC

Para esse experimento as células foram cultivadas em placa de 6 poços, após 24 horas foram divididas em grupos, tratadas ou não tratadas com  $1,5 \mu\text{g/mL}$  eePV, bem como os grupos irradiadas e não irradiadas com UVA ou UVC  $9,4 \text{ mJ/cm}^2$ , esses parâmetros foram selecionados pois ambos não demonstraram possuir caráter citotóxico. Após o tratamento as células voltaram para a incubação durante mais 48 horas e posteriormente a concentração de melanina dos grupos foi mensurada e comparadas com o controle.

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo Histoquímico: no controle branco (Figura 2A) pode ser observado nos tecidos (epiderme e parênquima) cromoplastos de coloração alaranjada que conferem a forte coloração laranja da flor. Os compostos químicos detectados foram lipídios (Figura 2B), flavonóides (Figura 2C), amido (Figuras. 2D e 2E) e compostos fenólicos (Figura 2F), concentrados na epiderme e mais diluídos nas células do

parênquima lacunoso. As reações com reagente de Wagner e Floroglucinol não apresentaram resultados significativos.

Compostos fenólicos, incluindo flavonóides, possuem ações relacionadas com a proteção dos tecidos e moléculas da oxidação por radiação excessiva e contra a herbívora, por serem impalatáveis para os animais, além de ser conhecido seu valor terapêutico com atividade antimicrobiana, antidiarreicas e antissépticas (GRAÇANO *et al.*, 2001; BELOTTO *et al.*, 2014). Amido e Lipídios são compostos de valor energético, importantes para o metabolismo das células (TAIZ E ZEIGER, 2015).

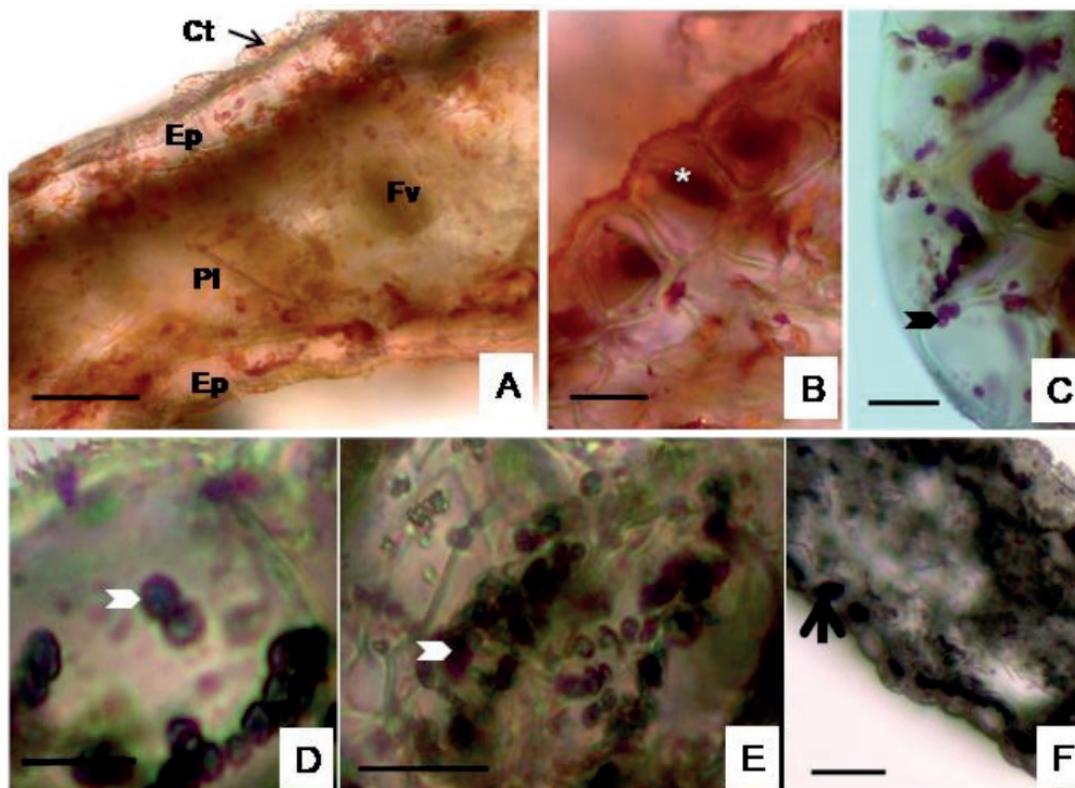


Figura 2 – Corola de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers com reações histoquímicas: A) Controle branco, com cromoplastos alaranjados; B) Sudam III, lipídios totais (asterisco branco); c) Cafeína + DMACA, flavonoídes (ponta de seta preta); D e E) Lugol, grãos de amido (ponta de seta branca); F) Cloretro ferrico, compostos fenólicos (seta preta). Legendas: Ct = cutícula, Ep = epiderme, PI = parênquima lacunoso, Fv = feixe vascular. Barras: A, E e C = 20  $\mu\text{m}$ ; B e F = 50  $\mu\text{m}$ ; D = 10  $\mu\text{m}$ .

Na presença do fitoextrato de *Pyrostegia venusta* Miers durante o período de 48h, o eePv induziu toxicidade para a linhagem de melanoma murinho B16-F10 obtendo um  $\text{IC}_{50} = (9.8 \pm 0.6) \mu\text{g/mL}$ , índice citotóxico seletivo (IS) de  $3.2 \pm 0.4$  para viabilidade celular e de indução de morte em B16-F10 comparado às células controle, CHO-K1, (Figura 3A). Resultados semelhantes foram encontrados por Altoé *et al.* (2014) e Figueiredo *et al.* (2014), mostrando que após o contato com eePV por pelo menos 18h já é possível observar pronunciada diminuição de viabilidade seletiva entre as células com fenótipo tumoral e linhagens normais.

Além disso experimentos com *Artemia salina* evidenciaram o potencial citotóxico do eePV onde a concentração de 0,001% foi suficiente para reduzir na metade a

população dos crustáceos em 48h (SILVA *et al.*, 2012).

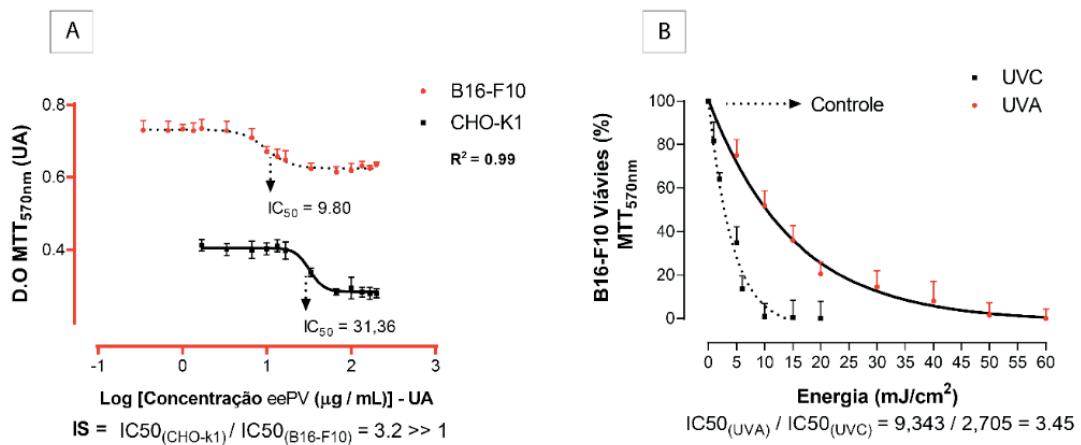


Figura 3: (A) Curva da atividade citotóxica de células de melanoma da linhagem B16F10 e CHO-K1 (controle) tratadas com extrato etanólico da flor de *Pyrostegia venusta* Miers (eePV) por 48h, utilizando-se a técnica do MTT. (B) Curva de Sobrevivência / Morte celular promovida pela radiação Ultravioleta A e C em células de melanoma da linhagem B16-F10. A contagem do número de células viáveis foi realizada em 48h a partir da exposição às doses de radiação (0 a 60mJ/cm<sup>2</sup>). O eixo Y representa os valores da densidade óptica observado para MTT, após 4h (Curva sigmoidal / Exponencial, o valor médio e o erro padrão das amostras para N=4 utilizou-se para análise estatística o Software Prism Plot-3) que permitiu a determinação do  $IC_{50}$ .

A radiação ultravioleta A (UVA) e C (UVC) promoveram morte celular em função do aumento da intensidade de energia, promovendo uma queda exponencial do número de células viáveis em função da dose de radiação utilizada, (Figura 3B). Isso é também descrito por Gentile *et al.* (2003), que utilizaram as técnicas de citometria e *western blotting* mostrando que a incidência de radiação ultravioleta promovem injuria celular, em baixas concentrações promovendo lesão e parada do ciclo celular e com o aumento da dose consequentemente ocorre diminuição na viabilidade celular.

O eePV foi capaz de induzir alterações morfológicas drásticas nas células de melanoma B16-F10 que apresentaram núcleos fragmentados e picnóticos, bem como desordens em sua membrana citoplasmáticas (Figura 4). Alterações essas também foram descritas por Figueiredo *et al.* (2014) mostrando que o aumento progressivo das concentrações de eePV são capazes de promover alterações estruturais que estão associados a perda de viabilidade das células tumorais tratadas.

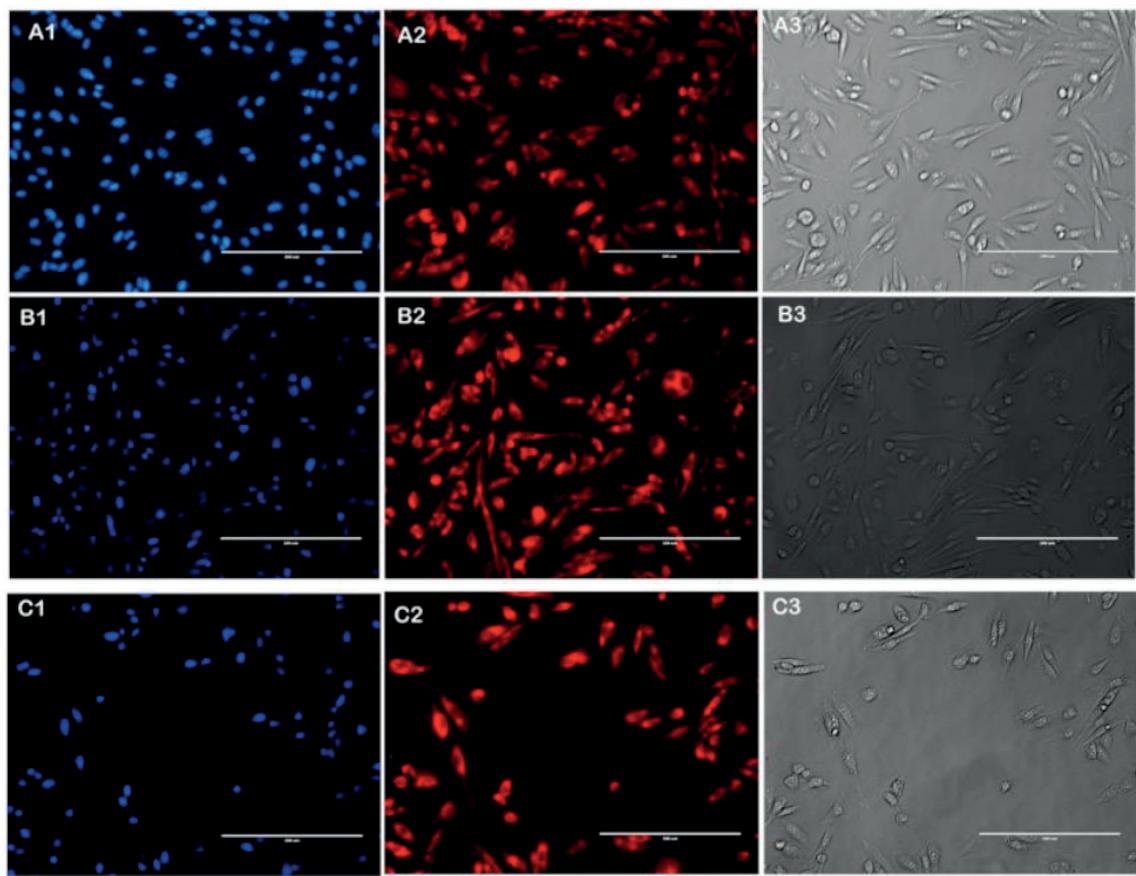


Figura 4: Micrografia das células de melanoma B16F10 do grupo controle (A) tratado com 9,8 µg / mL ( $IC_{50}$ ) extrato hidroalcoólico (eePV) por 4h (B) e por 48h (C). As imagens A1, B1 e C1 coradas com DAPI (azul); A2, B2 e C2 coradas com rodamina (vermelho); A3, B3 e C3 (imagens de campo claro / DIC): Identificando núcleo, citoplasma e as células de melanoma B16-F10, respectivamente. A mesma imagem em campo claro (figura da direita) melhor visualiza a presença de núcleo picnótico e núcleos fragmentados.

Obtivemos uma Curva de Crescimento Sísmoide de células de melanoma da linhagem B16-F10 em 07 dias a partir do plaqueamento (dia 0), (Figura 5A). Para esse crescimento foi observado um crescimento exponencial do conteúdo intracelular de melanina em células de melanoma B16F10 nas nossas condições experimentais de cultivo, (Figura 5B).

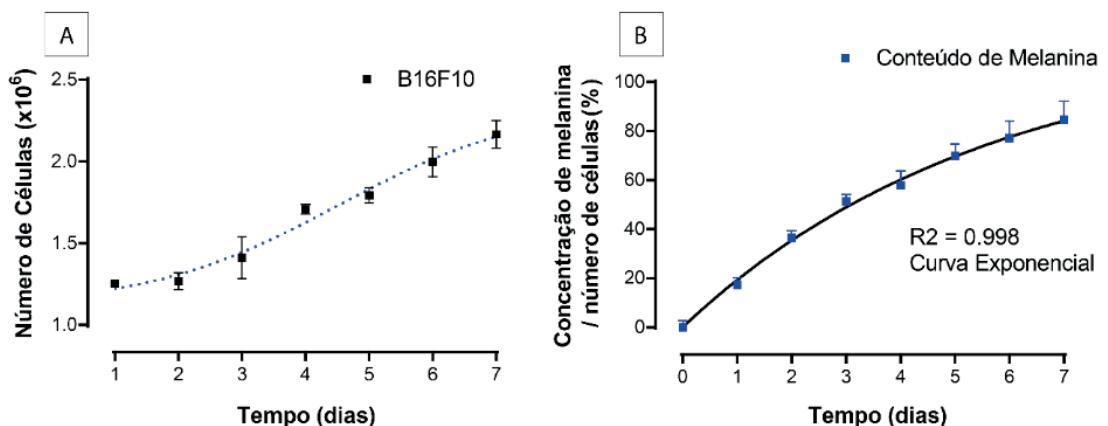


Figura 5: (A) Curva de Crescimento de células de melanoma da linhagem B16F10. A contagem do número de células viáveis foi realizada em 07 dias a partir do plaqueamento (dia 0). A direita Curva do crescimento exponencial do conteúdo intracelular de melanina em células de melanoma B16F10, normalizado pela quantidade de células obtidas pela contagem em câmara de neubauer.

(B) Conteúdo intracelular de melanina nas células viáveis foi realizado por 07 dias a partir do plaqueamento (dia 0). Observar a linha gráfica que expressa a Curva exponencial associada, o valor médio e o erro padrão das amostras para N=5, utilizou-se para análise estatística o Software Prism Plot-3 que permitiu a determinação do coeficiente de correlação  $R^2 = 0.98$ .

O tratamento com eePV (1,5 $\mu$ g/mL) por si só promoveu o aumento de 20% na concentração de melanina intracelular das células de melanoma B16-F10 no período de 48 horas. Resultado esse também foi demonstrado por Moreira *et al.* (2012) onde comparou-se o aumento da síntese de melanina pelo eePV em relação a outras substâncias que compartilham dessa mesma função.

Os grupos irradiados com dose 9.4 mJ /cm<sup>2</sup> de UVA e UVC tiveram um aumento de 60% e 40% em seu conteúdo de melanina quando comparada ao controle sem irradiação. Como mostra a pesquisa Yeom *et al.* (2014) onde o aumento do conteúdo de melanina citoplasmático em função da intensidade de radiação. No entanto essa produção foi maximizada quando o tratamento com eePV foi somado a dose 9.4 mJ /cm<sup>2</sup> de irradiação UVA ou UVC, tendo um aumento de 110% e 90% respectivamente na concentração de melanina em relação ao grupo controle sem tratamento, como mostra a (Figura 6).

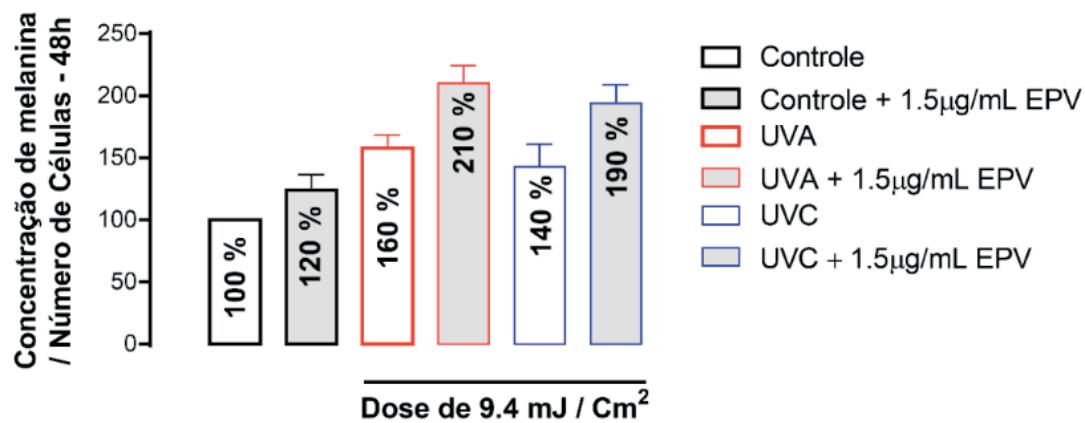


Figura 6: Conteúdo intracelular de melanina em células de melanoma B16-F10 pela quantidade total de células obtidas pela técnica do cristal de violeta em resposta a dose de 9.4 mJ /cm<sup>2</sup> de radiação UVA e UVB e tratado por 48h com PV (1,5 $\mu$ g/mL). Conteúdo intracelular de melanina das células. O valor médio e o erro padrão das amostras para N=5, utilizou-se para análise estatística o Software Prism Plot-3.

## 4 | CONCLUSÃO

As flores de *Pyrostegia venusta* Miers são ricas em Amido, lipídeos compostos fenólicos e flavonoides. O extrato etanólico da flor da *Pyrostegia venusta* Miers (eePV) é capaz de promover citotoxicidade em células de melanoma B16-F10 dependente da concentração e do tempo de contato com o fitoextrato, bem como é capaz de induzir alterações morfológicas nas células, como fragmentação e diminuição nuclear além de desordem na membrana plasmática. Sua atividade citotóxica possui caráter

seletivo, sendo cerca de 3 vezes menos tóxica à CHO-K1, linhagem que não possui fenótipo tumoral.

Em nossas condições experimentais de cultivo, o crescimento de células de melanoma da linhagem B16-F10 é acompanhado por aumento exponencial do conteúdo intracelular de melanina. O número de células viáveis diminui exponencialmente em relação à dose de radiação ultravioleta A e C aplicada. Considerando  $IC50_{(UVA)}$  /  $IC50_{(UVC)}$  podemos determinar que a radiação UVC tem potencial lesivo 3 vezes superior radiação UVA.

O efeito sobre o conteúdo de melanina das células de B16-F10 foi mais significativo para a radiação UVA do que UVC. São necessárias doses quatro vezes menores de UVA do que UVC para promover o mesmo aumento no conteúdo de melanina. Além disso, UVA promove efeito ainda maior quando associado ao eePV. Naturalmente, como já definido na literatura, a radiação UVA tem grande efeito bronzeador e com os biocompostos do eePV o aumento foi ainda expressivo.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, BNB – Fundeci, FAPESB pelo auxílio financeiro e bolsas e Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro pelo uso do Laboratório de Ginecologia Molecular, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP / EPM.

## REFERÊNCIAS

- ALTOÉ, T. D. et al. **In vitro antioxidant and cell viability of Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 6, n. 4, p. 215-222, 2014. ISSN 1984-6428.
- BELOTTTO, E. et al. **Caracterização anatômica, histoquímica e de classes de metabólitos secundários de folhas de Guzmania lingulata (L.) Mez.** Rev. Bras. Pl. Med, v. 16, n. 1, p. 127-134, 2014.
- BOUZADA, M. L. et al. **Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil.** Pharmaceutical biology, v. 47, n. 1, p. 44-52, 2009. ISSN 1388-0209.
- BURNS, T. et al. **Textbook of dermatology.** Blackwell, v. 49, p. 32-49, 2004.
- BUTCHER, E. C.; SCOLLAY, R. G.; WEISSMAN, I. L. **Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate. II. Potential application to studies of lymphocyte migration and maturation.** Journal of immunological methods, v. 37, n. 2, p. 109-121, 1980. ISSN 0022-1759.
- CHAZOTTE, B. **Labeling nuclear DNA using DAPI.** Cold Spring Harbor Protocols, v. 2011, n. 1, p. pdb. prot5556, 2011. ISSN 1940-3402.
- DE OLIVEIRA SANTOS, M. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 64, n. 1, p. 119-120, 2018. ISSN 2176-9745.

FERREIRA, D. T. et al. **Chemical constituents from roots of Pyrostegia venusta and considerations about its medicinal importance.** Química Nova, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000. ISSN 0100-4042.

FEUCHT, W.; SCHMID, P. **Selective histochemical staining of flavanols (catechins) with p-dimethylaminocinnamaldehyde in shoots from some fruit crops.** Gartenbauwissenschaft, v. 48, n. 3, p. 119-124, 1983. ISSN 0016-478X.

FIGUEIREDO, C. R. et al. **Pyrostegia venusta heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity in vivo.** Pharmacognosy magazine, v. 10, n. Suppl 2, p. S363, 2014.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. **Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in Cannabis sativa.** Journal of Natural Products, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981. ISSN 0163-3864.

GENTILE, M.; LATONEN, L.; LAIHO, M. **Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses.** Nucleic acids research, v. 31, n. 16, p. 4779-4790, 2003. ISSN 0305-1048.

GRAÇANO, D.; AZEVEDO, A. A.; PRADO, J. **Anatomia foliar das espécies de Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce (PERD)-MG.** Revista brasileira de Botânica, v. 24, n. 3, p. 333-347, 2001.

HYUN, S. K. et al. **Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from Sophora flavescens on tyrosinase and melanin synthesis.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 31, n. 1, p. 154-158, 2008. ISSN 0918-6158.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique.** McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.

LEBWOHL, M. G. et al. **Treatment of Skin Disease E-Book: Comprehensive Therapeutic Strategies (Expert Consult-Online and Print).** Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 0702052361.

LOTTI, T. et al. **Vitiligo: new and emerging treatments.** Dermatologic therapy, v. 21, n. 2, p. 110-117, 2008. ISSN 1396-0296.

MEANINGER, E. **Flowering Vines of the World:** Hearthside Press Inc., New York 1970.

MOREIRA, C. G. et al. **Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of Pyrostegia venusta on murine B16F10 melanoma.** Journal of ethnopharmacology, v. 141, n. 3, p. 1005-1011, 2012. ISSN 0378-8741.

RISS, T. L. et al. **Cell viability assays.** 2016.

ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes.** Academic Press, 2012. ISBN 0080925456.

ROY, P. et al. **In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of Pyrostegia venusta (Ker Gawl) Miers.** Journal of ethnopharmacology, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012. ISSN 0378-8741.

ROY, P. et al. **Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of Pyrostegia venusta (Ker Gawl) Miers.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 11, n. 1, p. 69, 2011. ISSN 1472-6882.

SASS, J. E. **Comparative leaf number in the embryos of some types of maize.** Iowa State Coll. J.

Sci.v. 25, p. 509-512, 1951.

SILVA, R. M. et al. **Antitumor and cytotoxic activity of Kielmeyera coriacea mart. Zucc. and Pyrostegia venusta (ker-gawl.) Miers extracts**. Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, n. 24, p. 4142-4148, 2012. ISSN 1996-0875.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p. FLORESTA, Curitiba, PR, v. 45, n. 2, p. 303-314, 2015.

VELOSO, C. C. et al. **Pyrostegia venusta attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice**. Journal of ethnopharmacology, v. 132, n. 1, p. 355-358, 2010. ISSN 0378-8741.

WOLFF, K. et al. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**, 2 volumes. Transplantation, v. 85, n. 654, 2008.

YEOM, G. G. M.; MIN, S.; KIM, S. Y. **2, 3, 5, 6-Tetramethylpyrazine of Ephedra sinica regulates melanogenesis and inflammation in a UVA-induced melanoma/keratinocytes co-culture system**. International immunopharmacology, v. 18, n. 2, p. 262-269, 2014. ISSN 1567-5769.

## IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO *Artemia salina*: DETERMINAÇÃO DA LC<sub>50</sub> DO PINHÃO E DA GOIABA SERRANA

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 14/10/2019

**Gabriele da Silva Santos**

Instituto Federal de Santa Catarina  
Lages - SC

<http://lattes.cnpq.br/7887327922094598>

**Marcel Piovezan**

Instituto Federal de Santa Catarina  
Florianópolis - SC

<http://lattes.cnpq.br/5620681386338692>

**RESUMO:** A determinação da toxicidade aguda é muito importante para identificação de substâncias com potencial tóxico, ou seja, que causam danos aos organismos vivos. O teste toxicológico utilizando *Artemia salina* como bioindicador é um teste que apresenta muitas vantagens como: ser mais prático em relação a testes com outros organismos, ter baixo custo e boa repetibilidade. Este trabalho buscou implementar o teste toxicológico utilizando K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> como controle positivo, e cafeína como substância com potencial tóxico. E na sequência determinar a LC<sub>50</sub> (concentração letal mediana) de extratos aquosos de goiaba serrana e semente de pinhão. O teste utilizando *Artemia salina* foi adaptado da norma NBR 16530 e a LC<sub>50</sub> foi calculada por meio do método de probit. O resultado obtido para LC<sub>50</sub> cafeína foi 565

ppm, maior que os relatados na literatura, no entanto, condizente com relação às condições geográficas do local de realização do ensaio. Para os extratos de goiaba serrana e pinhão foi observado efeito não-tóxico, dado os valores de LC<sub>50</sub> > 1000 ppm. Por fim, o teste de toxicidade pode ser implementado e utilizado para estudar o potencial tóxico de alimentos nativos da serra catarinense até então não verificados. Este ensaio torna-se uma ferramenta útil para screening de plantas e substâncias com potencial tóxico.

**PALAVRAS-CHAVE:** ecotoxicidade, *Branchipus stagnalis*, *Acca sellowiana*

IMPLEMENTING TOXICOLOGICAL ASSAY  
USING BRINE SHRIMP: DETERMINATION  
OF LC<sub>50</sub> OF *Araucaria angustifolia* SEED  
(PINHÃO) AND FEIJOA

**ABSTRACT:** Determination of acute toxicity is very important for the identification of substances with toxic potential, causes damage to living organisms. The Toxicological assay using *Artemia salina* like a bioindicator has many advantages such as: practicity compared to tests with other organisms, low cost and good repeatability. The aimed of this work was implement the toxicological assay using K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> as a positive control, and caffeine as a substance with toxic potential. The second point

was determine the LC<sub>50</sub> (median lethal concentration) of aqueous extracts of *Araucaria angustifolia* sess (pinhão) and feijoa. The test was adapted from NBR 16530 and the LC<sub>50</sub> was calculated using the probit method. The result obtained for caffeine was LC<sub>50</sub> 565 ppm, higher than those reported in the literature, however, consistent with the geographical conditions of the trial site. To pinhão and feijoa, a non-toxic effect was observed, with LC<sub>50</sub> values >1000 ppm. Finally, the toxicity assay could be implemented and used to study the toxic potential of native food. This assay becomes a useful tool for screening plants and substances with toxic potential.

**KEYWORDS:** ecotoxicity, *Branchipus stagnalis*, *Acca sellowiana*

## 1 | INTRODUÇÃO

A atividade biológica se refere aos efeitos causados por uma droga em organismos vivos, e a toxicidade é uma atividade biológica que causa danos aos organismos vivos, mas esta depende muito da dosagem da substância e do indivíduo (MACHADO, 2003). Por isso, é muito importante o estudo de compostos que podem ter atividade tóxica. Porém, os testes toxicológicos e estudos de compostos bioativos são limitados muitas vezes por falta de procedimentos apropriados que sejam simples e rápidos, pois, muitos laboratórios não tem estrutura para a realização de bioensaios com animais, tecidos ou órgãos, e não tem pessoal capacitado. O teste agudo-letal requer como resposta apenas a letalidade, para estes testes podem ser utilizados organismos simples (CIFUENTES, 2003).

A morte ou vida de organismos simples tem sido utilizada para uma rápida e simples avaliação da resposta biológica e determinação da toxicidade geral em compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE, *et al.*, 1999). A *Artemia salina* (*Branchipus stagnalis*) é um microcrustáceo que vive em água salgadas e é de fácil aquisição seus ovos desidratados podem ser obtidos em lojas de aquaristas e podem durar por anos em ambiente seco (Meyer, 1982). Este organismo tem sido amplamente utilizado como bioindicador em estudos de compostos ativos e testes toxicológicos agudo-letal, pois, apresenta um baixo grau de tolerância a fatores ambientais modificados, apresentando uma resposta clara a pequenas variações em seu ambiente (CARVALHO *et al.*, 2009). Em testes com *Artemia Salina* a letalidade é única variável observada (Meyer, 1982).

O bioensaio frente a *Artemia salina* baseia-se em compostos bioativos que são tóxicos em doses maiores, devido a grande sensibilidade da *Artemia salina* produzem uma boa resposta para testes agudo-letal, correlaciona-se com testes de citotoxicidade, antitumorais, atividade larvícida, inseticida, antifúngica, virucida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida, além disso é prático, de baixo custo, fácil e com boa reprodutibilidade (MACHADO, 2003; KARCHESY *et al* 2016). O

primeiro teste a que são submetidos os compostos é o agudo-letal que consiste em uma só dose que serve como teste preliminar para determinar a concentração letal mediana, que é a dose que mata 50 % de uma população em teste, representada em mg de substância por kg de massa corporal do organismo testado mg/kg (OLIVEIRA, 2012).

O objetivo deste trabalho é implementar o teste toxicológico utilizando  $K_2Cr_2O_7$  como controle positivo, e cafeína como substância com potencial tóxico e determinar determinar a  $LC_{50}$  de extratos aquosos de goiaba serrana e semente de pinhão, alimentos típicos da serra catarinense.

## 2 | METODOLOGIA

Foi utilizada a metodologia NBR 16530 (2016), com adaptações. Toda a vidraria utilizada no experimento foi lavada com detergente neutro, acetona e ficou em banho de solução de ácido clorídrico 2% por 24 horas seguida de lavagem com água corrente e água deionizada. Para a eclosão dos cistos de *Artemia salina* foi preparada água do mar reconstruída de composição conhecida de sais (Tabela 1). O pH da solução foi ajustado para 8,0 - 8,5 com NaOH 0,1 mol/L, e aerada durante 10 min (utilizando bomba de aquário). Em aproximadamente 500 mL de água do mar reconstituída foram colocados os cistos desidratados de artemia salina 0,2 g (adquiridos no comércio local) e o recipiente foi envolto de papel alumínio para impedir a entrada de luz, o qual foi mantido a 25 °C em incubadora shaker com câmara de acrílico durante 24 h (Figura 1). Após eclosão, os naúplios foram transferidos com micropipeta para outro recipiente com água do mar reconstituída e incubados a 25 °C por mais 24 h em ausência de luz. Este procedimento de incubação de 48 h garante que os naúplios alcancem a fase II de desenvolvimento, ideal para a realização do teste (Figura 2, C).

Reagente	Massa (g)
Cloreto de estrôncio hexahidratado ( $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0,02
Ácido bórico ( $H_3BO_3$ )	0,03
Brometo de potássio (KBr)	0,1
Cloreto de potássio (KCl)	0,7
Cloreto de cálcio dihidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	1,4
Sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ )	3,5
Cloreto de magnésio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	10,78
Cloreto de sódio (NaCl)	23,5
Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ )	0,2

Tabela 1. Massa dos reagentes para o preparo de 1L de água do mar reconstituída.

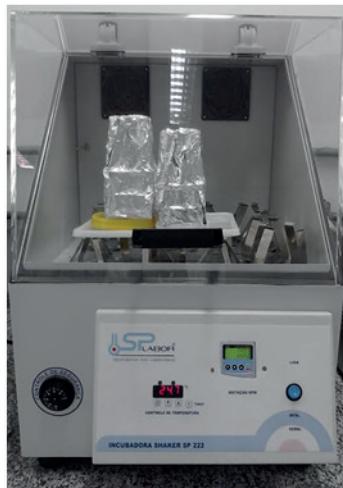


Figura 1. Incubação das artêmias salinas em incubadora shaker *SP labor*, a 25°C na ausência de luz com papel alumínio.

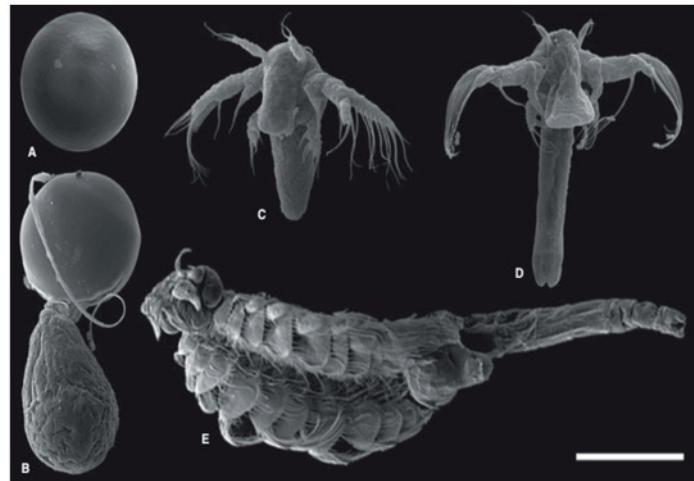


Figura 2. Principais estágios de desenvolvimento da Artemia salina. A: Cistos Diapausa, B: Náuplios I; C: Náuplios II; D: Metanáuplios II; E: Posmetanáuplios – adultos. Escala: A: 178 µm; B: 177 µm; C: 150 µm; D: 250 µm; E: 3,5 mm (GOSTLING *et al*, 2009).

Para execução do teste são contados e transferidos exatamente 10 naúplios de Artemia salina na fase II (48 h de incubação dos cistos e nauplios Figura 1, C) para um tubo de ensaio contendo os respectivos volumes de água do mar reconstituída, e por último foi adicionado volumes das amostras em diferentes concentrações conforme mostram as Tabelas 2 a 4. A solução devem estar a aproximadamente 25°C na transferência dos naúplios. O ensaio foi feito em triplicata. Os naúplios foram incubados a 25° C durante 48 h. Foram avaliadas três diferentes amostras: a cafeína que serve como referência para avaliação da implementação e comparação com resultados de outros trabalhos e também os extratos aquosos de pinhão e goiaba serrana.

Tubo de ensaio	Solução de cafeína 1000 mg L <sup>-1</sup> (mL)	Concentração de cafeína (mg L <sup>-1</sup> )	Água do mar reconstituída (mL)	Quantidade de Artemia salina (unidade)
Controle negativo	0	0	10	10
2	0,25	125	9,25	10
3	0,5	250	9,5	10
4	1,0	500	9,0	10
5	2,0	1000	8,0	10
6	3,0	1500	7,0	10
Controle positivo*	3,0	45	7,0	10

Tabela 2. Condições para o preparo dos ensaios para cafeína.

\*Adicionado 3 mL de solução estoque 150 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Tubo de ensaio	Extrato de pinhão 10 g L <sup>-1</sup> (μL)	Concentração de extrato (mg L <sup>-1</sup> )	Água do mar reconstituída (mL)	Quantidade de naúpios
Controle negativo	0	0	10	10
1	50	50	9,95	10
2	100	100	9,9	10
3	250	250	9,75	10
4	500	500	9,5	10
5	1000	1000	8,0	10
Controle positivo*	3,0	45	7,0	10

Tabela 3. Condições para o preparo dos ensaios para pinhão cru.

\*Adicionado 3 mL de solução estoque 150 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Tubo de ensaio	Extrato de goiaba serrana 75 g L <sup>-1</sup> (μL)	Concentração de extrato (mg L <sup>-1</sup> )	Água do mar reconstituída (mL)	Quantidade de naúpios
Controle negativo	0	0	10	10
1	60	50	9,94	10
2	130	100	9,87	10
3	330	250	9,67	10
4	660	500	9,34	10
5	1330	1000	8,67	10
Controle positivo*	3,0	45	7,0	10

Tabela 4. Condições para o preparo dos ensaios para goiaba serrana.

\*Adicionado 3 mL de solução estoque 150 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Após esse período de 48 h foi feita a contagem de naúpios mortos e vivos, a morte é evidenciada pela sedimentação e falta de movimento das *Artemias*, sendo evidente a movimentação das que permanecem vivas. Após a contagem calculou-se a média da mortalidade para cada concentração, sendo que a mortalidade no controle negativo não deve ultrapassar 10 % para que o teste tenha validade. Foi calculado a LC<sub>50</sub>, para todas as amostras pelo método de probit, os resultados de LC<sub>50</sub> foram comparados com resultados encontrados na literatura.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de LC<sub>50</sub> foram calculados primeiro por meio da porcentagem de mortalidade (M %) utilizando a fórmula de Abbott (Nguta *et al.*, 2012) (Equação 1).

$$\text{Equação 1: } M \% = \frac{Am - Am_{\text{controle negativo}}}{Av_{\text{controle negativo}}} \times 100$$

onde: Am = média das Artemias mortas;  $Am_{\text{controle negativo}}$  = média das artemias mortas no controle negativo;  $Av_{\text{controle negativo}}$  = média das Artemias vivas no controle negativo.

Os resultados obtidos foram transformados em probit, por meio de tabela de conversão em probit (Karchesy *et al*, 2016) (Figura 3). Os valores foram localizados encontrando o valor da dezena na coluna e o valor da unidade na primeira linha como demonstrado para o valor 14,0 de porcentagem de mortalidade obtida (M %) pela fórmula de Abbott, sendo igual a 3,92 probit.



%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Figura 3. Conversão de porcentagem de mortalidade (M %) em valor probit.

Para determinação da  $LC_{50}$  foi então construída uma tabela para obter os valores de log concentração da substância teste (log [substância]) e de Probit para cada ensaio como demonstrado na Tabela 5 para cafeína. Na sequência construiu-se gráfico que relaciona Probit x log [cafeína] para determinar o  $LC_{50}$  (Figura 4). A  $LC_{50}$  foi estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre o probit e a concentração da substância ou extrato.

[cafeína] ppm	log [cafeína]	Am média	Av média	Total de artemias	M %	probit
Controle negativo	0,00	0	10	10	3	0
125	2,10	3	7	10	30	4,48
250	2,40	2	8	10	20	4,16
500	2,70	4	6	10	40	4,75
1000	3,00	6,3	3,7	10	63	5,33
1500	3,18	9	1	10	90	6,28

Tabela 5. Determinação do log [cafeína] e probit para ensaio de toxicidade com artemia salina.

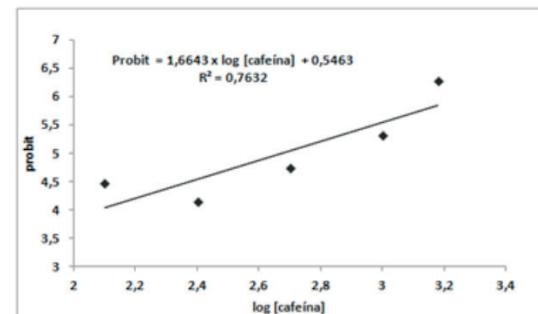


Figura 4. Determinação gráfica do  $LC_{50}$  para cafeína.

Em seguida, a  $LC_{50}$  é determinada pelo método gráfico de Probit através da equação de regressão (GUTIERREZ, 2008). Considerando a equação da reta representada por: Probit = a x log [substância] + b (Figura 4), substitui-se o valor

da variável dependente (probit) pelo valor 5, que refere-se à 50 % dos indivíduos testados e isola-se a variável log[substância]. Na sequência determina-se o inverso do log, obtendo-se a [cafeína] para probit 5, ou seja o LC<sub>50</sub> da substância testada, simplificada pela Equação 2. Para o caso da Figura 4 o valor de [substância] = LC<sub>50</sub> = 477 ppm.

$$\text{Equação 2: } [\text{Substância}] = \text{LC}_{50} = 10^{\left(\frac{5-b}{a}\right)}$$

Os valores obtidos de LC<sub>50</sub>, para a cafeína com exposição de 48 h estão apresentados na Tabela 6, onde os valores apresentaram variação de  $\pm 421$  ppm. Tal variação está ligada ao fato de que o teste apresenta muitas variáveis que podem interferir nos resultados, como: viabilidade dos ovos, temperatura e as condições geográficas (Hamidi M. *et al*, 2014). Observou-se que os resultados dos Testes 3 e 4 apresentaram valor de LC<sub>50</sub> consideravelmente maior que a dos resultados dos Testes 1 e 2, isso deve estar relacionado a maturidade dos cistos que estavam mais velhos, observado pela eclosão tardia dos náuplios causando incerteza da fase de desenvolvimento dos organismos para realizar o teste. Dessa forma, estes valores foram desconsiderados para cálculo da média da LC<sub>50</sub> cafeína, que foi de 565 ppm.

LC <sub>50</sub> (ppm)	Teste*
1	472
2	658
3	1361
4	1183
Média (1 e 2)	565

Tabela 6. Valores de LC<sub>50</sub> para réplicas de implementação do teste de toxicidade com artemia salina usando cafeína como substância padrão.

\* Testes realizados com mesmo lote de cistos, e apresentados em ordem cronológica de execução.

A condição geográfica é outro fator interessante que influencia nos resultados, haja vista que foram executados em uma região de altitude elevada com média de 884 m acima do nível do mar (Lages, SC - Brasil). Estes resultados mostram uma realidade plauzível, onde percebe-se uma correlação entre o aumento do valor numérico de LC<sub>50</sub> para cafeína com o aumento da altitude do local onde o teste é realizado (Figura 5). Corrobora esta constatação, o fato de as artemias salinas serem organismos sensíveis e de habitat marinho (altitude zero) as quais podem sofrer maior influência no metabolismo (desaceleração) quando não se encontram ao nível do mar.

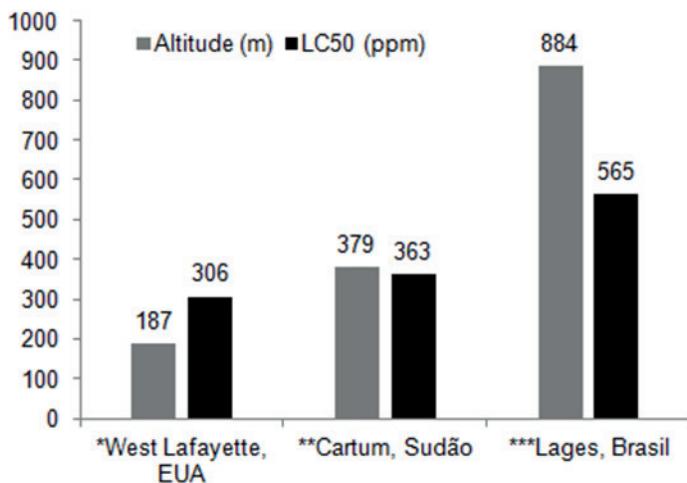


Figura 5. Correlação entre altitude dos locais de realização dos testes e valores de LC<sub>50</sub> para cafeína.

Legenda: \* Meyer, 1982; \*\*Gadir, 2012; \*\*\*Presente estudo

### 3.1 Toxicidade de extratos de pinhão e goiaba serrana

Os critérios utilizados por Clarkson e colaboradores (2004) para toxicidade de extratos de plantas foi a seguinte: extratos com LC<sub>50</sub> acima de 1000 ppm são não-tóxicos, LC<sub>50</sub> de 500 - 1000 ppm são levemente tóxicos, extratos com LC<sub>50</sub> de 100 - 500 ppm são de moderadamente tóxicos, e extratos com LC<sub>50</sub> < 100 ppm são de altamente tóxicos (Clarkson *et al.*, 2004; Nguta *et al.*, 2012). Como os extratos de goiaba serrana e pinhão apresentaram mortalidade de 0% dos náuplios na dose de 1000 ppm, são considerados como não tóxicos, pois a concentração onde 50 % dos indivíduos testados morrem é superior a maior concentração testada e neste caso LC<sub>50</sub> > 1000 ppm.

## 4 | CONCLUSÕES

A metodologia para avaliação da toxicidade aguda utilizando *Artemias salinas* pode ser utilizado na serra catarinense para avaliar toxicidade de compostos químicos e extratos. Porém para utilização dos testes de toxicidade com artemia salina em regiões de altitude diferente do nível do mar, uma sugestão seria a utilização de um fator de conversão (fator multiplicativo). Este fator, serviria para convergir o valor experimental com o encontrado na literatura para uma substância considerada padrão, que no presente estudo foi a cafeína. Outra possibilidade é mineralizar água do mar, e utilizá-la para o ensaio ao invés de água do mar reconstituída.

Por fim, o teste de toxicidade pôde ser implementado e utilizado para estudar o potencial tóxico de alimentos nativos da serra catarinense até então não verificados. Este ensaio é uma ferramenta útil para varredura e descoberta de plantas e

substâncias com potencial tóxico, mesmo das mais conhecidas. Vale salientar que mais testes devem realizados para confirmação da real toxicidade de qualquer substância e ou extrato de planta.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 16530: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Artemia sp (Crustacea, Brachiopoda)**. 1 ed. 2016. 16 p.

CARVALHO, Camilo A. de *et al.* **Cipó-cravo (*tynnanthus fasciculatus* miers - bignoniacaeae): Estudo Fitoquímico e Toxicológico Envolvendo Artemia Salina**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 6, p.51-58, jan. 2009.

CAVALCANTE, Márcia Ferreira *et al.* **Síntese de 1,3,5-triazinas Substituídas e Avaliação da Toxicidade Frente a Artemia Salina LeachS**. Química Nova, v. 1, n. 23, p.20-22, jan. 2000.

CIFUENTES, Karen Rebeca Pérez. **Comparación de la Actividad Biológica de 10 extractos Vegetales y 5 Fármacos utilizando Tres Bioensayos Toxicológicos**. 2003. Tese (Doutorado) - Curso de Química Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, San Carlos.

CLARKSON, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M. G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I., 2004. **In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa**. J Ethnopharm. 92, 177-191.

GADIR, Suad A.. **Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay**. Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research, v. 12, n. 4, p.5145-5148, 2012.

GOSTLING, Neil J.; DONG, Xiping; DONOGHUE, Philip C. J.. **Ontogeny and Taphonomy: An Experimental Taphonomy Study of the Development of the Brine Shrimp**. Palaeontology, [s.l.], v. 52, n. 1, p.169-186, jan. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1475-4983.2008.00834.x>.

GUTIERREZ de Gerardino, Astrid, **Métodos Para Determinar La dosis Mediana Efectiva En Ensayos Biológicos**, ICA, Bogotá, Colombia. revista de investigaciones de la Universidad del Quindío Vol 4, N° 12, Septiembre, 2008.

HAMIDI M, Jovanova B, Panovska T. **Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*Artemia salina* L.) model**. Macedonian Pharm Bull. 2014; 60(1):9–18

KARCHESY, Yvette M. *et al.* **Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay**. Springerplus, [s.l.], v. 5, n. 1, p.2-9, 23 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-2145-1>

MACHADO, Karina Zaia. **Avaliação da Toxicidade de Plantas Ornamentais Frente ao Teste com Artemia**. 2003. 48 f

MEYER, B. *et al.* **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Ianta Medica**, [s.l.], v. 45, n. 05, p.31-34, maio 1982. Thieme Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-971236>.

NGUTA JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG (2012). **Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan biodiversity using brine shrimp, Artemia salina L. (Artemiidae)**. Open Conf Proc J 3:30–34.

OLIVEIRA, Cecília Carvalho de. **Estudos Toxicológicos Pré-clínicos e Antitumorais do Extrato Acetônico das folhas de *Annona muricata L.*** 2012. 173 f.

RIOS, F. J. B. **Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de Artemia sp.** 1995.

## INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA DIABETES MELLITUS NO BRASIL

Data de aceite: 12/12/2019

### **Isabela Santos Lima**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. slimaisabela@hotmail.com

### **Beatriz Júlia Pimenta**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. biahjulia@hotmail.com

### **Nathália Muricy Costa**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. nathaliaamuricy@hotmail.com

### **Viviane Francisco dos Santos**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. vivianefranciscodossantos@gmail.com

### **Bruna Cristina Campos Pereira**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. brucriscampos@outlook.com

### **Jéssica dos Santos Fernandes**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Medicina. Jessica\_96fernandes@hotmail.com

### **Maristela Lúcia Soares Campos**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. lscmaristela@gmail.com

### **Eloisa Araújo de Souza**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. eloisa.araujoo.souzaa16@gmail.com

### **Ketlin Lorraine Barbosa Silva**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. ketlin\_lorraine@live.com

### **Izabel Mendes de Souza**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. izabelmendes04@gmail.com

### **Iara Macário Silverio**

Discente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. iarafmacario@outlook.com

### **Marianne Lucena da silva**

Docente. Universidade Federal de Jataí (UFJ),  
Fisioterapia. mariannebsb@gmail.com

## 1 | INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que se caracteriza por um grupo de patologias metabólicas hiperglicemiantes associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina. (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

As complicações microvasculares incluem danos no sistema nervoso, no sistema renal e lesões oculares. As macrovasculares

incluem doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. A doença vascular periférica pode levar a contusões ou lesões que não cicatrizam, gangrena e, em última análise, amputação (DESHPANDE et al., 2008). A patogênese dessas complicações é complexa pois envolve distúrbios metabólicos e hemodinâmicos, como hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e disfunção imunológica (VERHULST, et al., 2019).

Essa doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública, devido à alta taxa morbidade mortalidade decorrente de suas complicações crônicas, gerando consequências como altos gastos dos serviços de saúde no controle e tratamento dessas doenças, bem como a redução da força de trabalho e impacto no status biopsicossocial das pessoas afetadas (OLIVEIRA, 2017).

## 2 | BASE TEÓRICA

O Diabetes Mellitus configura-se atualmente como uma epidemiologia mundial, sendo considerado um grande desafio para os sistemas de saúde. A DM é caracterizada como uma patologia de alto impacto na vida dos indivíduos acometidos, pois se relaciona a inúmeras comorbidades e complicações, afetando a vida social e ocupacional. Sendo estimado 89 milhões de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade no mundo, devido a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MALTA, 2019).

Segundo Mendes et al. (2017) o DM é apontado como uma epidemia moderna, a mesma afeta cerca de 8,3% dos adultos, é responsável por 382 milhões de pessoas da população global, e acredita-se que 46% dos casos atualmente não são diagnosticados. O desenvolvimento desta doença é muito complexo, pois essa patologia é influenciada por diversos fatores, dentre eles os fatores genéticos, os hábitos socioculturais, ambientais, alimentares e de vida, e por fim podendo estar também relacionado as diferenças regionais (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016; TESTON et al. 2018).

A grande maioria dos casos de diabetes se enquadra em duas categorias etiopatogenéticas. Em uma categoria, o diabetes tipo 1, a causa é uma deficiência absoluta de secreção de insulina. Indivíduos com risco aumentado de desenvolver este tipo de diabetes podem frequentemente ser identificados por evidência serológica de um processo patológico autoimune que ocorre nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

Na outra categoria, muito mais prevalente, o diabetes tipo 2, a causa é uma combinação de resistência à ação da insulina e uma inadequada resposta secretora de insulina compensatória. Na última categoria, um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas e funcionais em vários tecidos-alvo, mas sem

sintomas clínicos, pode estar presente por um longo período de tempo antes que o diabetes seja detectado (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

No Brasil, as estimativas da prevalência de DM são em geral autorreferidas. Segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) foi constatado crescimento da prevalência nas capitais do Brasil, aumentando de 5,5% em 2006 para 7,6% em 2017 (MALTA et al. 2013).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM. Quantificar a prevalência atual de DM e estimar o número de pessoas com diabetes no futuro é importante, pois permite planejar e alocar recursos de forma racional. Outros aspectos a destacar são as repercussões de mudanças no estilo de vida, em curto período de tempo, em grupos de migrantes (SBD, 2015).

### 3 | OBJETIVOS

Conhecendo o quanto agravante é essa patologia e levando em consideração a relevância do DM, bem como a escassez de estudos analíticos de base populacional no Brasil, este estudo buscou investigar a prevalência de DM no Brasil nos últimos cinco anos.

### 4 | METODOLOGIA

Este é um estudo epidemiológico descritivo, com coleta retrospectiva, cujos dados foram obtidos por meio da consulta ao Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde, disponibilizada pelo Departamento de Informática do SUS (DATASUS), em informações de saúde (TABNET). Sendo buscado os dados da vigilância epidemiológica referente ao número de internações e óbitos por Diabetes Mellitus, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2018. A população alvo encontra-se na faixa etária entre dez anos a oitenta anos ou mais sem distinção de sexo. Para a avaliação detalhada foram ainda consideradas as variáveis sexo, faixa etária e macrorregiões brasileiras.

Os dados foram obtidos pelo TABNET, que é um banco de domínio e acesso público, no site do DATASUS, respeitando os princípios éticos. De acordo com a Resolução CNS 510/2016, por se tratar de uma análise em banco de dados públicos (DATASUS), pelo qual as informações são adjuntas, sem possibilidade de identificação individual e não havendo submissão ao CEP. Para análise estatística foi utilizado o software Microsoft Excel 2016.

## 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2018 foram notificadas 796.473 internações por DM no Brasil. De acordo com a análise por sexo, os indivíduos do sexo feminino apresentaram 424.578 internações, representando 53,31% do total, já o sexo masculino apresentou valores inferiores de 371.895, totalizando 46,69% das hospitalizações (Gráfico 1).

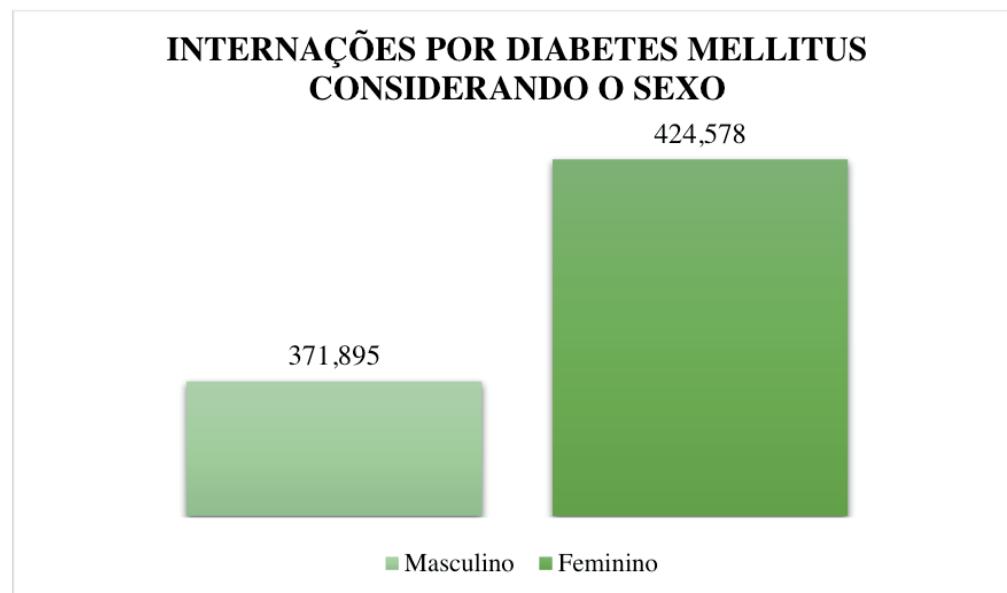


Gráfico 01: Internações por Diabetes Mellitus, no período de 2013 a 2018, entre o sexo masculino e feminino.

Fonte: DATASUS, Departamento de Informática do SUS.

Verifica-se a predominância de internações por DM no sexo feminino. Observação que está em consonância com o estudo transversal desenvolvido por Mendes (2011) o qual envolveu 872 idosos em São Paulo e demonstra a prevalência de DM de 18,86 % no sexo feminino e de 15,54 % no sexo masculino, como também pela investigação do inquérito nacional de Pesquisa Dimensões Sociais das Desigualdades (PDSD), que contou com 12.423 participantes adultos de ambos os sexos, nos diabéticos (n=935), verifica-se a maior prevalência de 8,2% entre as mulheres (FLOR,2017).

É importante ressaltar que as mulheres têm um maior contato com os serviços de saúde, o que relaciona-se com um diagnóstico precoce, além disso, são mais cuidadosas, se informam quanto os seus sintomas e conseguem se expressar melhor quanto ao que sentem o que implica em maiores hospitalizações. Já os homens apresentam resistência em assumir que precisam de cuidado, e de conversar sobre os seus sintomas, podendo esconde-los e utilizar do argumento de que tem que trabalhar e em virtude do machismo (ARAÚJO,2017; BARROS, 2011; FREITAS,2018).

As principais causas de internações por pacientes diabéticos decorrem de um controle glicêmico ineficaz, baixa adesão à terapia medicamentosa, e ao

desconhecimento do paciente e de sua família em relação a doença, fatores que são considerados evitáveis e preveníveis. Dessa forma, destaca-se a importância de uma relação de confiança entre os pacientes e os profissionais de saúde, ações de educação em saúde para que sejam disseminadas informações sobre a DM, maneiras de promover o controle metabólico, auxílio na reeducação alimentar, atividade física e no tratamento medicamentoso (FREITAS, 2018; SANTOS, 2013; SUZUKI, 2011).

Em relação a faixa etária as maiores ocorrências de hospitalizações foram encontradas em idosos com a faixa etária com 60 a 69 anos, com um total de 196.427 (24,6%) internações. Já as menores ocorrências são observadas em jovens entre 15 e 19 anos, totalizando 15.984 internações (2%) (Tabela 1).

FAIXA ETÁRIA	INTERNAÇÕES
<b>10 a 14 anos</b>	19.045
<b>15 a 19 anos</b>	15.984
<b>20 a 29 anos</b>	30.914
<b>30 a 39 anos</b>	46.402
<b>40 a 49 anos</b>	86.106
<b>50 a 59 anos</b>	159.104
<b>60 a 69 anos</b>	196.427
<b>70 a 79 anos</b>	156.830
<b>80 anos e mais</b>	85.661
<b>TOTAL</b>	796.473

Tabela 01: Número de internações por Diabetes Mellitus no Brasil, no período de 2013 a 2018, com ênfase nas faixas etárias.

Fonte: DATASUS, Departamento de Informática do SUS.

Esse fato pode ser justificado ao considerar o aumento da expectativa de vida dos brasileiros e maior proporção de idosos na população. O envelhecimento, leva a alterações fisiológicas no metabolismo o que contribui diretamente para a maior prevalência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que são mais incidentes em pessoas acima de 50 anos. Portanto, como maior frequência de DM em pessoas com mais idade é esperada (CORTEZ, 2015; RAMOS, 2017).

Esse dado também está em consonância com a pesquisa epidemiológica, com coleta retrospectiva realizada no Piauí por Araújo (2017) que observou-se que o acometimento maior da DM encontra-se entre a faixa etária de 40-59 anos e em indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos.

Dessa maneira, idosos com DM têm um maior risco de morte prematura e a maior associação com outras comorbidades como o maior risco de hipertensão arterial, doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral,

podendo, ainda, desenvolver neuropatia, artropatia e disfunção autonômica, inclusive sexual que são causas que podem leva a internações decorrentes indiretamente da DM (RAMOS,2017).

Ao analisar as internações de acordo com as macrorregiões, percebe-se que as regiões sudeste e nordeste apresentam os maiores números de internações sendo 276.138 (35%) e 259.090 (33%) respectivamente, em seguida a região sul com 127.671 (16%), região norte com 75.645 (9%) e com o menor índice de hospitalizações a região centro-oeste com 57.929 (7%) (Gráfico 2).

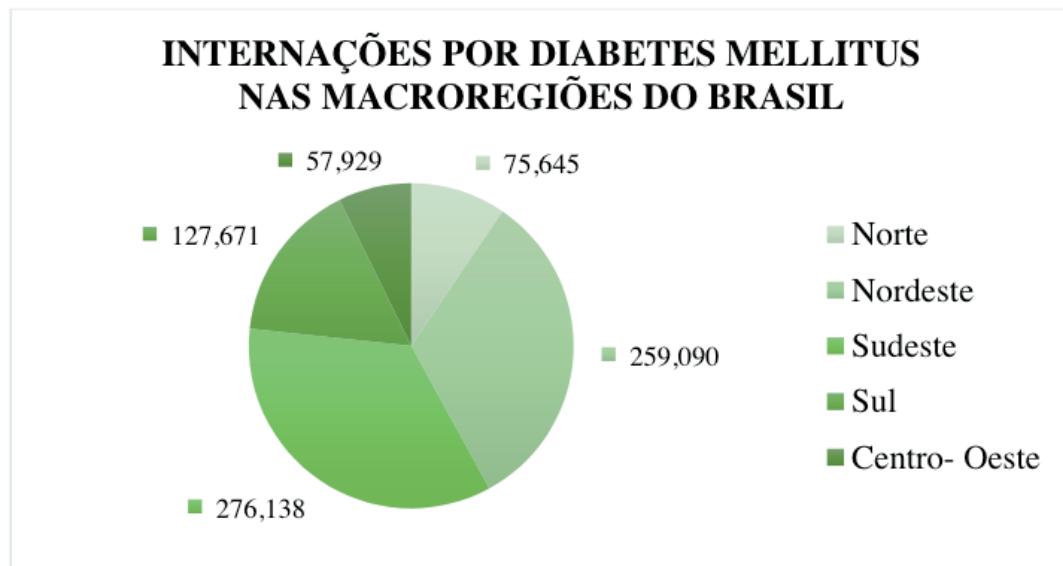


Gráfico 2: Número de internações por Diabetes Mellitus no Brasil, no período de 2013 a 2018, com ênfase nas macrorregiões.

Fonte: DATASUS, Departamento de Informática do SUS.

O número de internações e de óbitos por DM durante o período analisado segue uma tendência declinante. Em 2013 foram notificadas 138.232 notificações, entretanto em 2018 foram registradas 130.853 internações, o que representa um declínio de 5,3%. Em relação ao número de óbitos em 2013 foram apresentados 6.331 óbitos e em 2018 foi demonstrado o total de 5.665 mortes, tendo uma redução de 10,5%. (Gráfico 3).

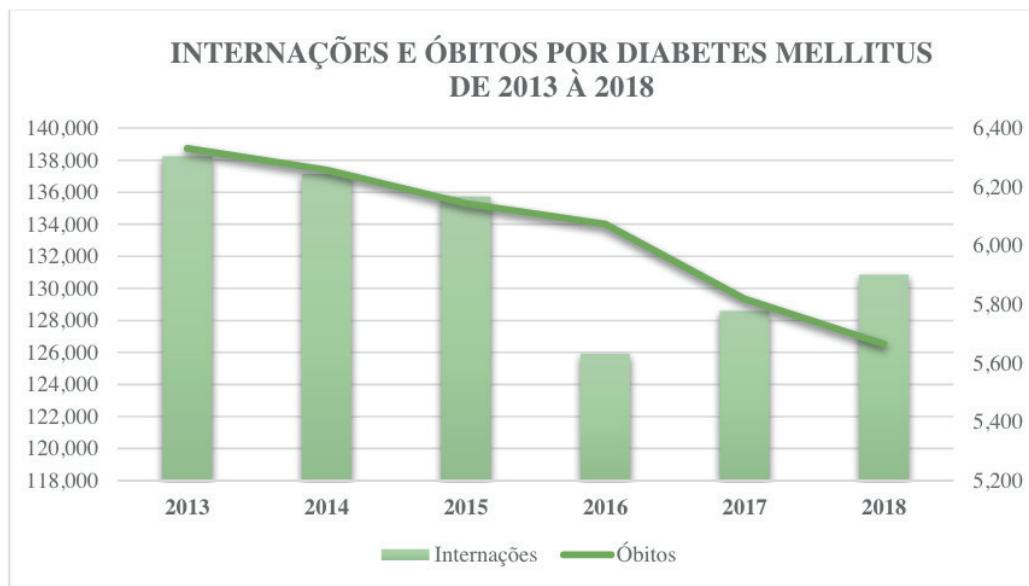


Gráfico 03: Internações e óbitos por Diabetes Mellitus, no período de 2013 a 2018.

Fonte: DATASUS, Departamento de Informática do SUS.

Ao analisar o DM como causa básica de óbito, observa-se uma redução que pode estar associada a diversos fatores principalmente a importância subestimada dos óbitos por DM e as subnotificações dos óbitos pela plataforma digital que deveria considerar todas as causas citadas na declaração de óbito, notificando todas as vezes que o diabetes é mencionado no documento. Em estudo realizado na população do Estado de São Paulo por Franco et al, a análise do DM como causa básica representou apenas 1/3 da sua real contribuição para o total de óbitos (MATHIAS,2004; FRANCO,1998).

Em relação às internações, a análise dos dados mediante diagnóstico principal de internação também é desvalorizada e subnotificada pois indivíduos com DM podem ser internados por outras causas, destacando os serviços de urgência como o pé diabético, a cegueira, a insuficiência renal crônica, além de todas as decorrentes do comprometimento cardiovascular (RAMOS,2017).

## 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados analisados, há maior número de internações por DM no sexo feminino, na faixa etária de 60 a 69 anos, na região sudeste. Verificou-se também redução do número de internações e óbitos por DM no período avaliado. Dessa maneira, é fundamental a implementação de ações para o controle do DM, voltadas para fatores de risco modificáveis, tais como excesso de peso, inatividade física e má alimentação, além de ampliar o acesso aos serviços de saúde tanto de atenção primária, secundária e terciária, mas que enfoquem primariamente na prevenção e no diagnóstico precoce. Assim é fundamental a educação em saúde aos

pacientes que levem ao empodeiramento do autocuidar, informem sobre a doença, incentivem a adesão a abordagem terapêutica e mudanças no estilo de vida.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, vol.37, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes: 2016 abridged for primary care providers. **Clinical Diabetes**, vol.34, n.1, p.3-21, 2016.
- ARAUJO, A. C. A. de. F.; ALMEIDA, P. D.; ARAÚJO, A. K. L. de; SALES, I.M.M.; ARAÚJO, T.M.E. de; ROCHA, S.S. da. Perfil epidemiológico do Diabetes Mellitus em um estado do nordeste brasileiro. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental**, vol.9, n.3, 2017.
- BARROS, M.; FRANCISCO, P.; ZANCHETTA, L. Tendências das desigualdades sociais e demográficas na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD: 2003-2008. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol.16, n.9, p.3755-3768, 2011.
- CORTEZ, Daniel Nogueira et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção primária. **Acta paul. enferm.**, São Paulo, vol.28, n.3, p.250-255, 2015.
- DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. **Phys Ther.** vol.88, n.11, p.1254-1264, 2008.
- FLOR, Luisa Sorio e Campos, MONICA Rodrigues. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol.20, n.1, p.16-29, 2017.
- FRANCO, L. J. et al. Diabetes como causa básica ou associada de morte no Estado de São Paulo, Brasil, 1992. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, vol.32, n.3, p.237-245, 1998.
- FREITAS, PAULA DA SILVA et al. Uso de serviços de saúde e de medicamentos por portadores de Hipertensão e Diabetes no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol.23, n.7, p.2383-2392, 2018.
- MALTA D. C; ISER B. P. M; CHUEIRI P. S; STOPA S. R; SZWARCWALD CL, SCHMIDT M. I. et al. Cuidados em saúde entre portadores de diabetes mellitus autorreferido no Brasil, Pesquisa Nacional de Saúde. **Rev. Bras. Epidemiologia**, 2013.
- MALTA, D. C; DUNCANLL, B. B; SCHMIDTLL, M. I, et al. Prevalência de diabetes mellitus determinada pela hemoglobina glicada na população adulta brasileira, Pesquisa Nacional de Saúde. **Rev. Bras. Epidemiologia**, 2019.
- MATHIAS, T.A.F. Diabetes Mellitus na População Idosa em Município da Região Sul do Brasil: Um Estudo da Mortalidade e Morbidade Hospitalar. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, vol.48, n.4, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. DIABETES MELLITUS. Brasília, 2006
- MENDES, T.A.B. et al. Diabetes mellitus: fatores associados à prevalência em idosos, medidas e práticas de controle e uso dos serviços de saúde em São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública.**, vol.27, n.6, p.1233-43, 2011.
- OLIVEIRA, P. S; COSTA, M. M. L; FERREIRA, J. D. L; LIMA, C. L. J. Autocuidado em Diabetes Mellitus: estudo bibliométrico. **Enferm. glob.**, vol.16, n.45, p.634-688, 2017.

RAMOS, R.S.P.S. et al. Fatores associados ao diabetes em idosos assistidos em serviço ambulatorial especializado geronto-geriátrico. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, vol.20, n.3, p.364-374, 2017.

SANTOS, S.; VASCONCELOS, D. Hospitalização por hipertensão arterial essencial em caráter de urgência no Brasil. **Rev Ciênc Méd Biol**, vol.12, p.465-471, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: SBD; 2015.

SUZUKI, V.F.; CARMONA, E.V.; LIMA, M.H.M. Planejamento da alta hospitalar do paciente diabético: construção de uma proposta. **Rev Esc Enferm USP**, vol.42, n.2, p.527-532, 2011.

TESTON, E. F; SPIGOLON, D. N; MARAN, E; SANTOS, A. L; MATSUDA, L. M; MARCON, S. S. Nurses' perspective on health education in Diabetes Mellitus Care. **Rev. Bras. Enferm.** vol.71, n.6, p.2735-2742, 2018.

VERHULST, M. J. L; LOOS, B. G; GERDES, V. E. A; TEEUW, W. J. Avaliando todas as possíveis complicações orais do diabetes mellitus. **Endocrinol dianteiro**. vol.10, n.56, 2019.

## MORFOLOGIA DA TRAQUEIA E RAMIFICAÇÃO BRONQUICA DE *Megaceryle torquata* (LINNAEUS, 1766) (ORDEM CORACIIFORME, FAMÍLIA *Alcedinidae*), MARTIM-PESCADOR-GRANDE

Data de aceite: 12/12/2019

### **Thaysa Costa Hurtado**

Aluna de graduação em Ciências Biológicas  
– UNEMAT Av São João s/n, CEP 78200-00,  
Cáceres

thaysa\_mt@hotmail.com

### **Gerlane de Medeiros Costa**

Universidade do Estado de Mato Grosso. Centro  
de Estudos de Limnologia, Biodiversidade e  
Etnobiologia do Pantanal (CELBE) – Laboratório  
de Mastozoologia  
gerlanemcosta@yahoo.com.br

### **Áurea Regina Alves Ignácio**

Universidade do Estado de Mato Grosso. Centro  
de Estudos de Limnologia, Biodiversidade e  
Etnobiologia do Pantanal (CELBE) – Laboratório  
de Ecotoxicologia  
aurea@unemat.br,

### **Manoel dos Santos Filho**

Universidade do Estado de Mato Grosso. Centro  
de Estudos de Limnologia, Biodiversidade e  
Etnobiologia do Pantanal (CELBE) – Laboratório  
de Ecotoxicologia  
msantosfilho@gmail.com

**RESUMO:** *Megaceryle torquata* é uma ave aquática da família Alcedinidae, com representantes ocorrendo em zonas tropicais e subtropicais próximo a ambientes aquáticos. O sistema respiratório das aves apresenta

algumas características peculiares entre os vertebrados, tanto na sua estrutura como na forma de desempenhar sua função, como por exemplo, a presença de sacos aéreos. O objetivo deste trabalho foi descrever a anatomia da traqueia de *M. torquata*, produzindo informações de base sobre sua biologia. Foram utilizados sete exemplares vinculados ao Projeto “Avaliação Ecológica do Impacto do Mercúrio sobre a Biota dos Rios Teles Pires, próximo ao Parque Nacional do Juruena”, coletados no Rio Teles Pires – MT. A traqueia, nos exemplares analisados, se mostrou como um tubo levemente curvo, formado por anéis cartilaginosos completos. Localizada na porção média da região cervical, ventral a coluna vertebral e ao esôfago, se estendia da região caudal da laringe até a siringe, onde se bifurcava dando origem aos brônquios. As características morfológicas desta espécie são similares as de outras descritas na literatura.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anatomia, Aves, Sistema Respiratório, Teles Pires.

MORPHOLOGICAL OF THE TRACHEA AND  
BRONCHIIC BRANCHING OF *Megaceryle*  
*torquata* (LINNAEUS, 1766) (ORDER  
CORACIIFORME, FAMILY *Alcedinidae*),  
KINGFISHER-GREAT

**ABSTRACT:** *Megaceryle torquata* it is an

aquatic bird of the family Alcedinidae with representatives occurring in tropical and subtropical areas near aquatic environments. The respiratory system of the poultry has some unique characteristics among vertebrates, both in structure as in the play its function, such as the presence of air bags. The objective of this study was to describe the anatomy of the trachea of *M. torquata*, producing basic information on their biology. seven copies linked to the project were used "Ecological Assessment of Mercury's Impact on Biota Rivers Teles Pires, near the Juruena National Park", collected in Rio Teles Pires - MT. The trachea in analyzed specimens was shown as a slightly curved tube formed by complete cartilaginous rings. Located in the middle portion of the neck, Ventral spinal column and the esophagus, extending from caudal to the syrinx of the larynx, where the resulting branched bronchi. The morphological characteristics of this species are similar to others described in literature.

**KEYWORDS:** Anatomy, Birds, Respiratory System, Teles Pires

## 1 | INTRODUÇÃO

Os martins-pescadores são aves aquáticas com ampla distribuição geográfica, encontrados em zonas tropicais e subtropicais próximo a ambientes aquáticos (SICK, 1997). No Brasil ocorrem cinco espécies: *Megacyrle torquata*, *Chloroceryle americana*, *Chloroceryle aenea*, *Chloroceryle amazonae* e *Chloroceryle inda*. Duas espécies, *M. torquata* e *C. amazona*, ocorrem em todo o território brasileiro, em áreas costeiras, alagadas, rios, represas, lagos e lagoas. São consideradas piscívoras, com tendências oportunistas para consumo de pequenos crustáceos (FRISCH, 1981; SICK, 2001). As duas espécies são encontradas ao longo das margens de lagos e lagoas marginais nos rios Teles Pires e Juruena, dois grandes corpos de água constituintes da bacia amazônica, e no rio Paraguai, um dos formadores da bacia do Paraguai.

*Megacyrle torquata* é descrita como uma ave de beleza exuberante, com plumagem colorida, cabeça relativamente grande e bico longo, vive ao longo de locais próximos à beira d'água. Nos machos a região peitoral apresenta coloração cor de ferrugem, a cobertura inferior das asas e região pélvica de cor branca. As fêmeas exibem na base da região cervical um colar de cor branca, a região peitoral de cor azul acinzentado, com a porção abdômen-pélvica e a cobertura inferior das asas, de coloração ferrugem, com uma faixa branca na região caudo ventral da região pélvica.

Este gênero foi inicialmente classificado como *Ceryle* (Linnaeus, 1766), atualmente está descrito como *Megacyrle*, havendo poucos estudos na área de sua biologia, com estudos de descrições de osteologia, helmintologia e reprodução (PASCOTTO et al., 2006; MENDÉZ et al., 2007; NAIFF et al., 2011).

A anatomia do sistema respiratório de aves demonstra particularidades que já foram utilizadas na separação taxonômica de algumas espécies. Bottino et al.

(2007), descreveram diferenças morfológicas na traqueia e na siringe entre machos e fêmeas de periquitos (*Touist* sp.) e Müller (1878) utilizou a siringe e a traqueia como forma de classificação de aves.

Até o momento, não foi encontrado na literatura, nenhuma referência relacionada à descrição morfológica do sistema respiratório de *Megacyrle torquata*, desta forma, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia da traqueia desta espécie, produzindo informações de base sobre sua biologia e subsídios para o desenvolvimento de outras pesquisas com aves neotropicais.

## 2 | MATERIAS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados sete (7) exemplares de *Megacyrle torquata*, seis (6) machos e uma (1) fêmea, coletados na região do rio Teles Pires, localizado no norte do estado do Mato Grosso (Figura 01).

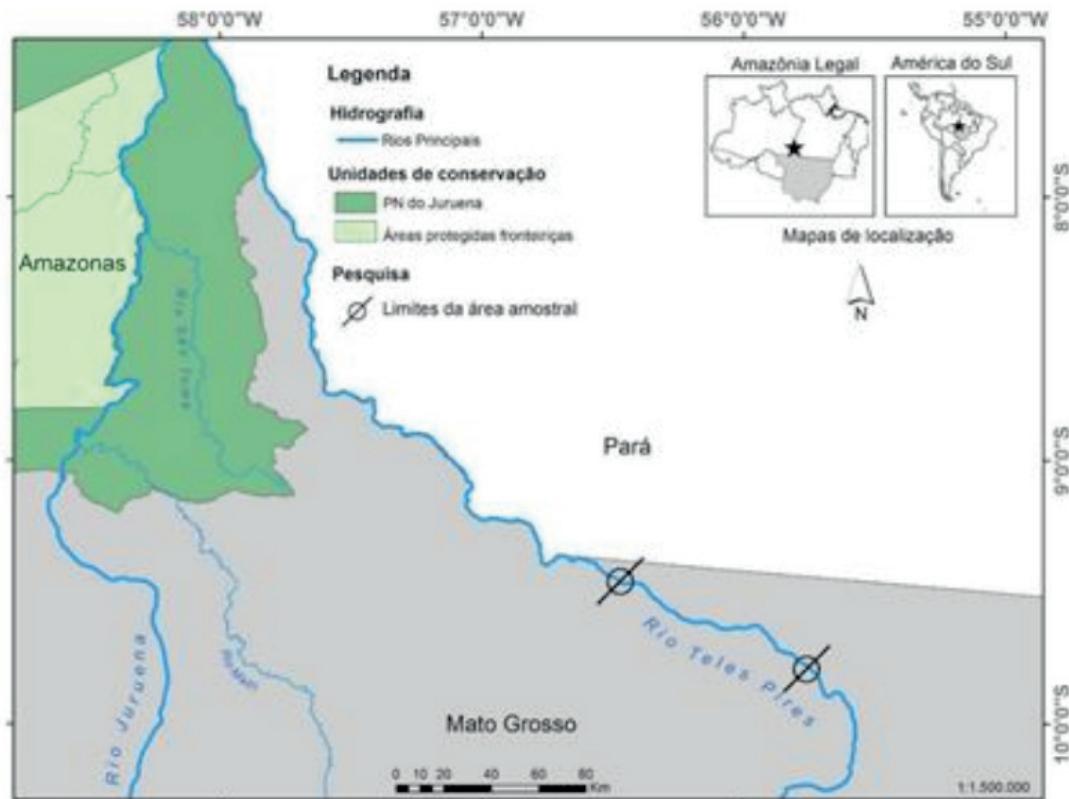


Figura 01. Área de coleta dos exemplares de *Megacyrle torquata* no rio Teles Pires-MT.

Os exemplares fazem parte do Projeto “Avaliação Ecológica do Impacto do Mercúrio sobre a Biota dos Rios Teles Pires e Juruena, próximo ao Parque Nacional do Juruena” sob licença de coleta nº 52586-2. Os espécimes foram abatidos com espingarda de pressão (licença SISBio nº 89352883), congelados e encaminhados para o laboratório de Ecotoxicologia, no Centro de Pesquisa de Limnologia, Biodiversidade e Etnobiologia do Pantanal (CELBE – PANTANAL) em Cáceres-MT.

Após coleta do material para análise de concentração de mercúrio (Hg) (penas,

músculo peitoral, estômago, fígado, rins e encéfalo), os espécimes foram fixados em formaldeído a 10% e, posteriormente, dissecados para exposição e retiradas da traqueia para descrição anatômica.

Para exposição e retirada do órgão, foi realizada incisão crânio-caudal a partir da região cervical estendendo-se até a região pélvica, para tal foram utilizados instrumentais cirúrgicos básicos (bisturi, pinças e tesouras). O órgão foi documentado com câmera fotográfica Nikon COOLPIX 360 *in situ* e *ex situ*, para visualização macroscópica da anatomia da traquéia.

### 3 | RESULTADOS

A traqueia dos espécimes analisados apresentou comprimento médio de  $9,721 \pm 0,945$  cm, apresentou forma tubular com flexibilidade usual para o órgão, constituído por anéis cartilaginosos completos. Estava localizada na região média do pescoço, ventral a coluna vertebral e esôfago, mediano aos cornos hióideos. Estendia-se da base da laringe, a partir da cartilagem cricóide, até a siringe, descrevendo um trajeto retilíneo que se desviava suavemente para direita na sua porção caudal, retornando rapidamente ao seu eixo retilíneo mediano na altura da clavícula, na entrada do tórax. A partir daí, passando ventralmente ao arco do osso coracóide até alcançar a siringe na região peitoral. O órgão se mostrou mais longo que o comprimento total do pescoço. A partir da base da siringe, localizada na cavidade torácica, cranial ao coração, a traqueia se bifurcava formando as ramificações primárias dos brônquios (Figura 02).

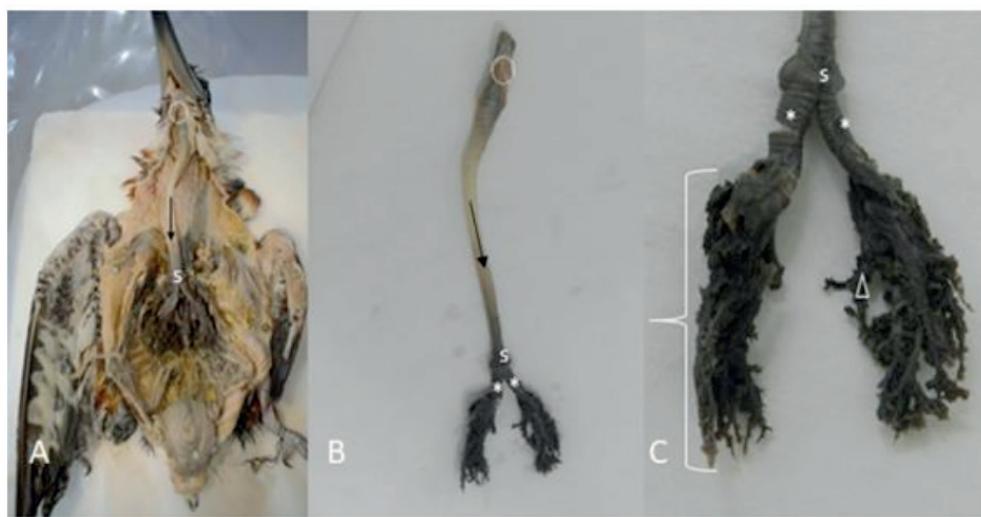


Figura 02. Visão geral do sistema respiratório de *M. torquata*. A- Vista ventral da traquéia, Extensão da Traquéia (seta preta) até a siringe (s), Laringe (círculo branco pontilhado), B- Sistema respiratório partindo da laringe (círculo branco pontilhado), traquéia completa (seta preta), siringe (s), Brônquios (\*). C- Ramificações da traquéia até o pulmão partindo da siringe (s), brônquios (\*), pulmão (chave branca), bronquíolos (triângulo branco).

Foi observado, na altura do desvio cervical-clavicular, que a traqueia estava

sustentada pelo músculo cleidotraqueal e na sua porção torácica, pelo músculo esternotraqueal (Figura 03).



Figura 03. (A) - Visão ventral localização da traqueia (Tr), Esôfago (seta preta grossa), Músculo externo traqueal (m. et); (B) - Laringe (circulo), Osso lóide (seta fina) traqueia (tr), Esôfago (seta preta grossa); (C) - traqueia (tr), Clavícula (Cl); (D) - traqueia (tr), Músculo externo traqueal (m. et), Clavícula (Cl) e veia cava caudal e cranial (círculo pontilhado); (E) traqueia (tr), Músculo cleidotraqueal (seta fina branca), Clavícula (Cl), siringe com ramificações brônquicas (triângulo) e Coração (C) Barra 1cm.

As cartilagens traqueais se mostraram como anéis completos ligados entre si por ligamentos anulares, enquanto que os que formavam as ramificações brônquicas primárias eram incompletos, em forma de C, conectados pelo músculo traqueal na sua face medial. O número de anéis traqueais variou entre 62 a 70 anéis, com média de  $65,429 \pm 3,780$ . Os diâmetros apresentados pelos anéis mostraram diâmetros diferentes entre as três regiões cranial, média e caudal da traqueia, sendo de 0,0395 cm a 0,0321 cm nas cartilagens craniais, que faziam conexão com a laringe, de 0,0204 cm a 0,0182 cm, na porção média e de 0,0175 cm a 0,0152 cm nas cartilagens que se conectam a siringe, demonstrando o afunilamento craniocaudal do órgão. As alturas das laterais dos anéis variaram entre 0,045 cm a 0,088 cm, se alternando entre a lateral direita e esquerda, formando uma engrenagem que permitia pequena movimentação entre as cartilagens (Figura 04).

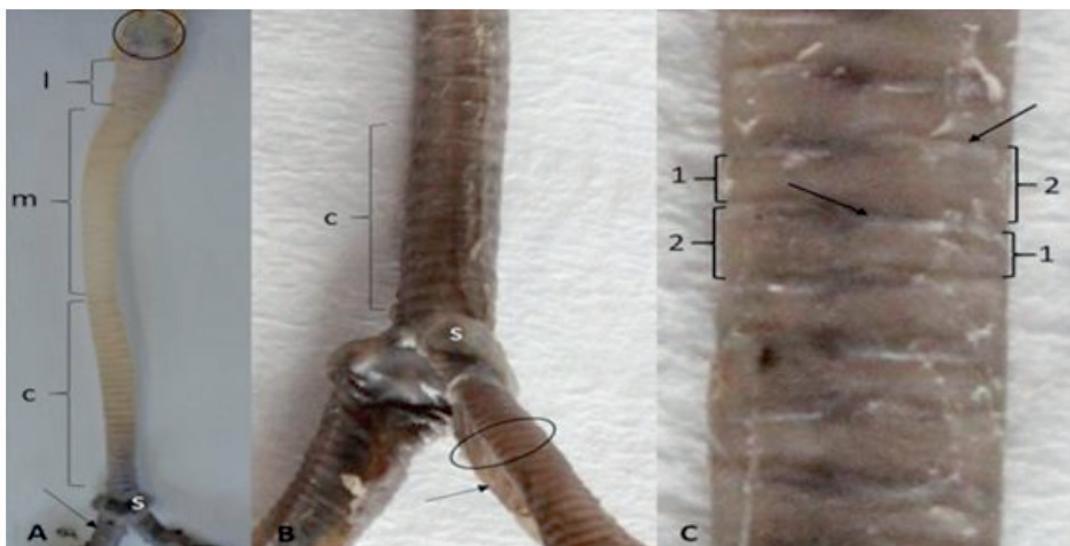


Figura 04. (A) Comprimento Total por região I (Inicial), M (média) e C (caudal), laringe (circulo), ramificação brônquica (seta fina preta), Siringe (s); B- Região caudal (C), Ramificação brônquica (circulo) e membrana interanelar (seta fina), Sirige (s); C- Anéis traqueais mostrando a sobreposição dos anéis.

## 4 | DISCUSSÃO

O sistema respiratório das aves apresenta algumas características peculiares entre os vertebrados, tanto na sua estrutura como na forma de desempenhar sua função, como a presença de sacos aéreos, constituída por anéis cartilaginosos intercalados, o que corrobora com nossos achados. As aves apresentam uma extrema eficácia e mais complexos em seu sistema respiratório, que outros vertebrados de respiração aérea, divergem dos pulmões dos répteis e mamíferos, deste modo se adaptando, satisfazendo as necessidades metabólicas do vôo. A traqueia se ramifica em brônquio direito e esquerdo, que se estendem em finas ramificações formando os bronquíolos ou parabronquios tubulares, através dos quais o ar flui continuamente (HICKMAN et al., 2004).

A mudança na formação do suporte esquelético do tubo respiratório na região caudal da traqueia forma a siringe, órgão responsável pela vocalização das aves (RAPOSO et al., 2006). Há uma grande variabilidade na conformação da siringe entre as diferentes espécies das aves, as musculaturas da traqueia e da siringe atuam na produção dos diferentes sons das espécies. (BOTTINO et al., 2007).

Os pulmões das aves são relativamente pequenos e compactos, sem capacidade de grande expansão, no entanto são interligados a nove sacos aéreos, o que difere em *M. torquata*, pois não encontramos sacos aéreos, os quais exercem a função de reservatório, já que não há revestimento de epitélio respiratório.

A traqueia é um órgão do sistema respiratório, nas aves é constituída por anéis cartilaginosos completos (DYCE et al., 1990), localizada centralmente a coluna vertebral, seguindo o esôfago no percurso cervical (MCLELLAND, 1989). Estas características também foram descritas para *P. martinicus* (OLIVEIRA et al., 2016) e *A. domesticus* (SANTOS et al., 2008) e observado em *M. torquata*. De acordo com Portman (1950), a traqueia pode ser mais longa que o pescoço, criando curvas na entrada do tórax, característica de aves de pescoço longo. Em algumas espécies, por seu prolongamento, enovelava-se na região esternal em uma fenda óssea do esterno, apresentando em alguns casos, as alças intraesternais da traqueia (LIMA, 2001). O que difere de *M. torquata*, que se mostrou reta, não adentrando na cavidade torácica.

Este grupo possui a traqueia composta de anéis cartilaginosos completos (DYCE et al., 1990), acompanha o esôfago no seu segmento cervical, ventral à coluna vertebral (MCLELLAND, 1989). O número de anéis traqueais varia consideravelmente em função do comprimento do pescoço (MCLELLAND, 1989) e entre machos e fêmeas (SANTOS et al., 2008). Os anéis conectam-se através do

ligamento anular e a traqueia termina por bifurcar-se na altura da caixa de voz das aves, a siringe (KOCH, 1973).

Devido a função característica do ciclo de ventilação de respiração das aves, estas transportam mais oxigênio que os mamíferos em cada movimento respiratório. Sendo assim, a traqueia apresenta diferenças significativas em relação aos outros, visto que nas aves os anéis são intercalados, o que lhe permite um alto grau de flexibilidade, desse modo para se observar completamente os anéis traqueais é necessária à extensão completa do órgão (GILL, 1995; MCLELLAND, 1989).

King e White (1975) relatam que a organização tridimensional dos anéis traqueias completa em gansos, se assemelham com os encontrados em aves em geral, havendo uma sobreposição de parte de cada anel com seus anéis vizinhos cranial e caudalmente.

De acordo com Bottino et al (2007), os números de anéis da traqueia do periquito (*Touist sp.*) teve uma variação entre macho e fêmea, o comprimento também variou respectivamente, para machos e fêmeas. Mostrando-se diferente em relação ao número e comprimento do *Megacyrle torquata* em que não houve variação significativa entre macho e fêmea.

## 5 | CONCLUSÃO

As características anatômicas da traqueia de *Megacyrle torquata* foram similares a descrições encontradas em outras espécies de aves neotropicais. Assim nossos estudos, apontam a relação da morfologia do sistema respiratório de outras aves.

## REFERÊNCIAS

- BOTTINO, F.; ARTONI, S. M. B.; OLICEIRA, D.; PACHECO, M. R.; AMOROSO, L.; TOVAR, M. C. H.; SAGULA, A. **Dimorfismo sexual da traqueia e siringe de periquito** (*Touist sp.*). Arquivo Brasileiro de Medicina
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.663, 1990.
- FRISCH, D. **Aves brasileiras**. São Paulo: Dalgas-Ecoltec Ecologia Técnica e Comércio, p.353, 1981.
- GILL, F. B. **Ornithology**. 2<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman e Company, New York, USA, p.766, 1995.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de Zoologia**. 11<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.158, 2004.
- KING, A. S.; WHITE, S. S. Sistema respiratório das aves. In: Getty, R. (ed.) Sisson & Grossman – **Anatomia dos animais domésticos**. 5<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, v.2, p.1764-1797, 1975.

KOCH, T. **Anatomy of the chicken and domestic birds**. Iowa University Press, Ames, USA, p.84-88, 1973.

LIMA, R. G. **Anatomia comparada da siringe de alguns representantes da tribo Arini (Aves, Psittacidae)**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MENDÉZ, A. C.; HÖFLING, E. **Osteologia craniana de Cerylinae (Coraciiformes: Alcedinidae)**. Bol. Mus. Para Emilio Goeldi, Zool. Belém, v. 2, n. 1, p. 155 – 182, 2007.

MÜLLER, J. P. **On Certain Variation in the Vocal Organs of the Passeres That Have Hitherto Escaped Notice**. (Translation Bell, F.J.). MacMillan, London, 1878.

MCLELLAND, J.; LARYNX.; TRACHEA. In KING, A. S.; McLELLAND, J (Eds). **Form and Function in Birds**. Academic Press, London, Inglaterra, p.69-103, 1989.

NAIFF, R. H.; AGUIAR, K. M. O.; ARAÚJO, A. S.; CAMPOS, C. E. C. **Biologia reprodutiva de Megaceryle torquata (aves; alcedinidae) em fragmento de floresta da Universidade Federal do Amapá**. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v.1, n.2, p.1-7, 2011.

OLIVEIRA, J. C. L.; COSTA, L.T.; DAMACENA, M. I. S.; LIMA, M.; COSTA, G. M. **Descrição da anatomia da traqueia e da siringe de Porphyrio martinicus (Frango-d'água-azul)**. IV Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, leguminosas: importância econômica, ecológica e na alimentação humana. Universidade do Estado de Mato Grosso. Alta Floresta, 2016.

PASCOTTO, M. C.; HÖFLING, E.; DONATELLI, R. J. **The Ringed Kingfisher, Ceryle or Megaceryle torquata (Cerylinae, Alcedinidae, Coraciiformes) An osteological view**. Ornitologogia Neotropical, v. 17, p. 481 – 490, 2006.

PORTMAN, A. Les organes respiratoires. In: **Grassé. Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie**. Tome XV, Masson, Paris, França, p.257-269, 1950.

RAPOSO, M. A.; HÖFLING, E.; GABAN-LIMA, R.; STOPIGLIA, R.; FORMOZO, P. **Anatomia da siringe dos Dendrocolaptidae (Aves, Passeriformes)**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v.64, n.2, p.181-191, 2006.

SANTOS, T. C.; TRUJILLO, H. A. G.; ALBERTO, M. L. V.; PEREIRA, C. C. H.; FERRARI, C. C.; MENCONI, A. M.; BOMBONATTO, P. P. **Aspectos morfológicos e morfométricos da traquéia em gansos domésticos**. Revista Biotemas, v.21, p.91-96, 2008.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Edição revista e ampliada. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

SICK, Helmut. **Ornitologia Brasileira**. Editora Nova Fronteira, p.295-296, 2001.

## MUTUALISMO ENTRE A MACROALGA *Chara vulgaris* Linnaeus 1753 e a MACRÓFITA AQUÁTICA *Lemna cf. valdiviana* PHIL, NA ÉPOCA DA ENCHENTE, MÂNCIO LIMA, ACRE

Data de aceite: 12/12/2019

### **Jocilene Braga dos Santos**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Licenciatura em Ciências Biológicas, Km 12,  
Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco,  
Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4151500917422182>

### **João Lucas Correa de Souza**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Km 12,  
Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco,  
Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/6377633385084191>

### **Erlei Cassiano Keppeler**

Universidade Federal do Acre, Campus Floresta,  
Centro Multidisciplinar, Km 12, Gleba Formoso,  
Lote 245, Colônia São Francisco, Cruzeiro do Sul,  
Acre, Brasil

E-mail: [erleikeppeler@gmail.com](mailto:erleikeppeler@gmail.com)

**RESUMO:** Mutualismo é um tipo de relação simbiótica essencial, em que ambos os organismos se beneficiam na relação. Em uma propriedade rural localizada na Comunidade São Pedro em Mâncio Lima, Acre (7°42'11.9"S 72°46'22.7"W), em um reservatório de água que depois de esvaziado e enchido completamente e recebido 400 (quatrocentos) tambaquis (*Colossoma macropomum*), estabeleceu-se nele, o habitat de duas comunidades de

produtores *Chara vulgaris* e *Lemna cf. valdiviana*, que têm uma relação inter-específica. Foram também analisados dados meteorológicos, como temperatura, umidade, pluviometria e radiação solar, observando a diferença entre duas épocas sazonais, considerando um período de 30 (trinta) dias, para temperatura, umidade, radiação e precipitação. Observou-se na época da enchente que, o reservatório continha uma extensa massa da macrófita *Lemna cf. valdiviana*, considerada como responsável pela produtividade biológica do ambiente, que pareceu ser extremamente vulnerável aos impactos da poluição ocasionada pelo material inorgânico oriundo da suinocultura e bovinocultura, cujos dejetos são arrastados pela erosão dos solos e carregados pelas chuvas.. Concluiu-se que, os indivíduos de *Lemna cf. valdiviana* não se desenvolveram na época da vazante, mas somente na enchente onde houve muita luz solar, possibilitando o desenvolvimento da macroalga *Chara vulgaris* que pareceu ser sensível à alta intensidade solar, que foi moderada pela presença da macrófita.

**PALAVRAS-CHAVE:** Luz solar; reservatório; simbiose.

**MUTUALISM BETWEEN THE MACROALGAE *Chara vulgaris* Linnaeus 1753 AND THE**

## AQUATIC MACROPHYTE *Lemna cf. valdiviana* PHIL, AT THE TIME OF THE FLOOD, IN MÂNCIO LIMA, ACRE

**ABSTRACT:** Mutualism is a kind of essential symbiotic relationship, in which both organisms benefit from the relationship. In this work, it was established a habitat community of *Chara vulgaris* and *Lemna cf. valdiviana*, which present an interspecies relationship, in a reservoir of water that, after emptied and filled completely, received 400 (four hundred) Tambaquis (*Colossoma macropomum*). The experiment was carried out at a rural property located in the Community São Pedro, in Mâncio Lima, Acre, 7°42' 11.9"S 72°46' 22.7"W (Brazil). Meteorological data such as temperature, humidity, rainfall, and solar radiation were also analyzed, observing the difference between two seasonal seasons, considering a period of 30 (thirty) days. It was observed at the time of the flood that the reservoir contained an extensive mass of the macrophyte *Lemna cf. valdiviana*, considered responsible for the biological productivity of the environment, which appeared to be extremely vulnerable to the impacts of pollution caused by inorganic material originating from swine and bovine farming, whose waste is dragged by soil erosion and laden by rainfall. Temperature, humidity, radiation, and precipitation showed no statistical differences between the flooding and the ebb time. It was concluded that the individuals of *Lemna cf. valdiviana* did not develop at the time of the ebb, but only in the flood time, where there was high incidence of sunlight, allowing the development of the macroalga *Chara vulgaris* that appeared to be sensitive to high solar intensity, which was moderated by the presence of the macrophyte.

**KEYWORDS:** Sunlight; Reservoir; symbiosis

### 1 | INTRODUÇÃO

O Mutualismo é um tipo de relação simbiótica essencial, em que ambos os organismos se beneficiam na relação. É uma interação ecológica interespecífica, ou seja, entre organismos de diferentes espécies, ocorrendo de forma obrigatória e harmoniosa, permitindo vantagens recíprocas para as espécies envolvidas (RIBEIRO, 2019). Essa associação é permanente causando dependência indispensável à sobrevivência das partes, não podendo desvincular um do outro, em razão da colaboração que cada um exerce sobre o metabolismo de seu dependente, provavelmente prejudicial caso estivessem separados. Este estudo hipotetiza que algas, representada pela *Chara vulgaris* e macrófitas, representada por *Lemna cf. valdiviana*, podem estabelecer uma relação simbiótica, especialmente em ambientes de águas residuais, onde tais organismos possam proliferar.

Em Lemnas pode ocorrer a reprodução em águas residuárias, por serem ricas em nutrientes (BRANCO; BERNARDES, 1983). Pode ocorrer tanto a reprodução sexuada como assexuada (SKILLICORN *et al.*, 1993). A reprodução sexuada é incomum devido à floração de lemnas ser atípica. No decorrer do seu ciclo de vida, que pode englobar de 10 dias a várias semanas, uma única fronde dispõe

da competência reprodutiva de 20 a 50 vezes ciclos de vida (SKILLICORN *et al.*, 1993), logo possui elevadas taxas de crescimento, duplicando sua biomassa em poucos dias. A reprodução assexuada ocorre por brotamento e, dessa maneira, as *Lemnas* propagam-se vegetativamente e são encontradas comumente na superfície de águas onde encontram abundância em nutrientes (SOUZA; LORENZI, 2005).

*Chara* representa o gênero de espécies que crescem como plantas que são totalmente submersas na água, que as raízes crescem em sedimento através de rizoides incolores com eixo fotossintético na coluna de água (CASANOVA, 2015). São cosmopolitas, habitando lagos, lagoas, rios, reservatórios e córregos de água doce ou salobra e estão distribuídas em quase todos os continentes, em áreas temperadas e tropicais, exceto na Antártica (WOOD; IMAHORI, 1965; MEIERS *et al.* 1999).

A hipótese principal deste trabalho consiste em afirmar que, a época sazonal propicia o estabelecimento de espécies aquáticas exóticas invasoras, de dois produtores *Chara vulgaris* e *Lemna cf. valdiviana*, que desenvolvem uma relação de simbiose.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma propriedade rural localizada na comunidade São Pedro (Figuras 1a,b) em Mâncio Lima, Acre ( $7^{\circ}42'11.9''S$  e  $72^{\circ}46'22.7''W$ ). Esta propriedade apresentava um reservatório de água que depois de esvaziado e enchido completamente, e recebeu 400 (quatrocentos) tambaquis (*Colossoma macropomum*).

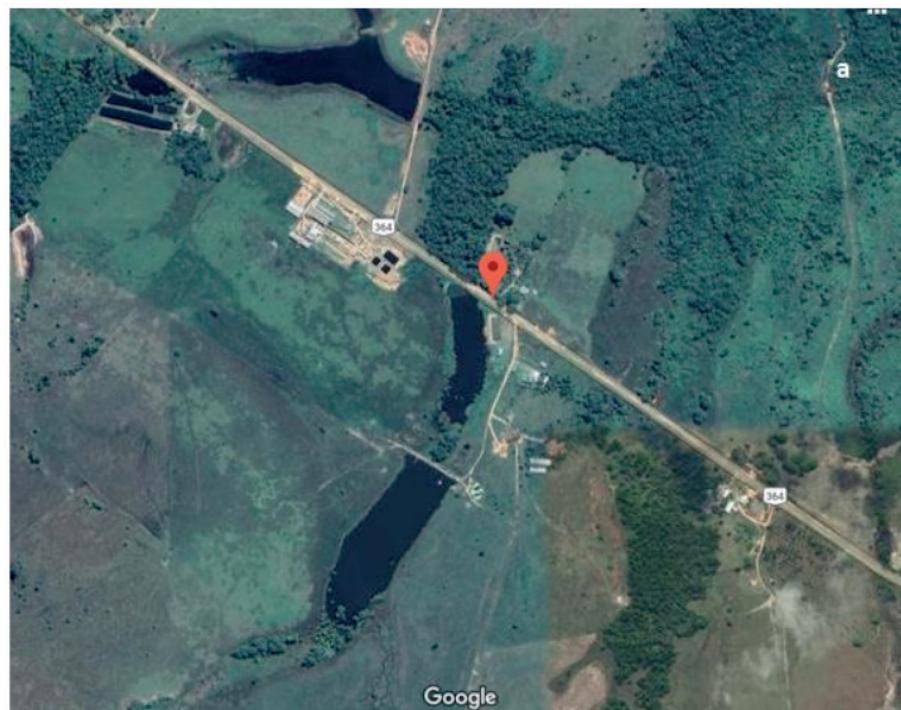


Figura 1a. Reservatório da Propriedade da área de estudo ( $7^{\circ}42'11.9''S$  e  $72^{\circ}46'22.7''W$ ).



Figura 1b. Reservatório do Frigorífico em Mâncio Lima ( $7^{\circ}42'11.9''S$  e  $72^{\circ}46'22.7''W$ )  
Google Earth, 2012

As variáveis ambientais, temperatura, umidade, pluviometria e radiação solar foram obtidas da estação meteorológica de Cruzeiro do Sul, Acre, cujos dados foram coligidos para um período de 30 (trinta) dias, a partir do Instituto de Meteorologia, [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br).

Para a análise dos dados foi utilizado o Teste  $t$  de Student ou Teste de Mann Whitney, conforme a normalidade e variância dos dados (ZAR, 2010).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 2a e 2b mostram a *Chara vulgaris* e *Lemna cf. valdiviana* coletada do frigorífico.



Figura 2a. *Chara vulgaris* e *Lemna* cf. *valdiviana*



Figura 2b. Mutualismo entre *Chara vulgaris* e *Lemna* cf. *valdiviana*

A temperatura, umidade, radiação e precipitação não apresentaram diferença estatística, entre a enchente e vazante ( $p < 0,05$ ). Todavia, a umidade foi a variável

que se apresentou mais irregular ao longo do mês de ocorrência da associação da alga (Figura 4) com a macrófita, apresentando uma alta variância (32,64).

Parâmetro	Temperatura		Radiação		Precipitação		Umidade	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
N	30	30	30	30	30	30	30	30
Mínimo	24,22	24,51	276,58	438,66	0	0	71,82	80,25
Máximo	28,62	27,26	1021,96	911,65	0,98	1,03	92,57	90,93
Média	25,91	25,99	739,71	662,87	0,22	0,21	83,81	85,11
Erro padrão	0,22	0,14	41,13	25,18	0,056	0,06	1,04	0,58
Variância	1,45	0,57	50769,6	19023,32	0,100	0,10	32,64	10,03
Desvio padrão	1,20	0,76	225,32	137,93	0,31	0,31	5,71	3,17
Mediana	25,65	25,99	749,77	662,14	0,06	0,04	85,81	85,28
Coeficiente de variação	4,64	2,91	30,46	20,81	143,17	151,79	6,82	3,72

Tabela 1. Variáveis ambientais do Ar em Mâncio Lima, Acre

A absorção de nutrientes das macrófitas se dá totalmente a partir da água e geralmente estão restritas aos habitats abrigados e dos cursos de água de corrente fraca (CAMARGO.; ESTEVES, 1996). Estas algas fornecem importante serviços ecossistêmicos, por exemplo, como espécies colonizadoras, como agentes biológicos para purificar as águas, ou como a base da cadeia alimentar (McCOURT *et al.*, 2016). As espécies ocorrem em habitats de água doce, especialmente nas zonas de substrato calcário nas zonas temperadas do Hemisfério Norte (KRAUSE *et al.*, 1997). As Chara têm depósitos de sais de cálcio, na parede celular e os processos metabólicos associados com esta deposição dão frequentemente a ela um odor característico e desagradável, o sulfato de hidrogênio (ROUND, 1966).

Macrófita flutuante livre cresce em diversos corpos d'água, principalmente em condições eutróficas. No campo ambiental, pode se considerar *Lemna* como uma espécie valiosa no tratamento de águas residuais, na absorção de contaminantes. E para o ambiente onde existe um frigorífico ela se ajusta a esta perfeição (ARROYAVE, 2004). Possivelmente, neste ambiente não existiu predadores de *Lemna*, como por exemplo os citados, por Arroyave (2004), entre os principais animais utilizados, que são peixes, moluscos e mamíferos.

A simbiose é uma relação em que ambos os organismos se beneficiam, e é um relacionamento onde um organismo vive em ou em outro, ou pode ser usado para descrever casos em que os organismos estão relacionados por comportamentos estereotipados mútuos (PARACER; AHMADJIAN, 2000). Segundo Ricklefs (2012), a simbiose, significa viver junto, que se refere aos indivíduos de espécies diferentes que vivem em associação íntima e os indivíduos de diferentes espécies podem

colaborar em interações mutualísticas.

A alga faz fotossíntese e fornece nutrientes para a *Lemna*, enquanto a *Lemna* a protege e possibilita o seu desenvolvimento de maneira facilitada. Por outro lado, nossos resultados indicam que as algas epífitas e o aumento da concentração de nitrato-N na coluna de água poderiam, de forma diversa ou sinérgica, impor efeitos adversos à fisiologia das macrófitas submersas e são fatores-chave que levam ao declínio das macrófitas submersas (MIN *et al.*, 2017).

A alga se estabeleceu num ambiente que existia excessiva abundância de *Lemna*. Segundo Kovtun-Kante *et al.* (2014), carófitas são capazes de se adaptar há uma luz fraca do ambiente e recuperar seu desempenho fotossintético dentro de um curto período, em condições estressantes quando em água salobra.

Concluiu-se que, os indivíduos de *Lemna* cf. *valdiviana* não se desenvolveram na época da vazante, mas somente na enchente onde houve muita luz solar, possibilitando o desenvolvimento e adaptação da macroalga *Chara vulgaris* que pareceu ser sensível à alta intensidade solar, moderada pela presença da macrófita.

## REFERÊNCIAS

- ARROYAVE, M. P. La Lenteja de agua (*Lemna minor*) L.: Una planta acuática promisoria. *Revista EIA Escuela Ingeniera de Antioquia [online]*. n.1, pp.33-38. 2004.
- BRANCO, S.M.; BERNARDES, R.S. Culturas hidropônicas como forma de remoção e reciclagem de nutrientes minerais dos efluentes de sistemas de tratamento de esgotos. *Revista. DAE*, 134: 113-115, 1983.
- CAMARGO, A.F.M.; ESTEVES, F. A. Influence of water level variation on biomass and chemical composition of the aquatic macrophyte *Eichhornia azurea* (Kunth) in an oxbow lake of the Mogi-Guaçu River (São Paulo, Brazil), *Archives of Hydrobiology*, v. 135, n. 3, p.423-432, 1996.
- CASANOVA, M. A revision of *Chara* sect. *Charopsis* (Characeae: Charophyceae) in Australia, including specimens collected for Bush Blitz. *Australian Systematic Botany*, 2015.
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: [Andlt;http://www.inmet.gov.br/portal/Andgt;](http://www.inmet.gov.br/portal/). Acesso em 15 de junho de 2019.
- KOVTUN-KANTE, A.; TORN, K.; KOTTA, J. In situ production of Charophyte communities under reduced light conditions in a brackish-water ecosystem. *Estonian Journal of Ecology*, 63, I., 28-38. 2014.
- KRAUSE, W. *Characeen als Bioindikatoren für den Gewässerzustand Limnologia* Berlin, 13, pp. 399 – 418. 1981.
- LANDOLT, E.; KANDELER, R. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) – The family of Lemnaceae - a monographic study v.2. *Veröff. Geobot. Inst.*, Zürich, v.95: 1-638, 1987.
- McCOURT *et al.* 2016.
- MEIERS S.T.; PROCTOR, V.W.; CHAPMAN, R.L. Phylogeny and biogeography of *Chara* (Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences. *Australian Journal of Botany* v. 47, p. 347-360. 1999.

MEURER, T.; BUENO, N. C. The genera Chara and Nitella (Chlorophyta, Characeae) in the subtropical Itaipu Reservoir, Brazil. **Brazilian Journal Botanica**, São Paulo , v. 35, n. 2, p. 219-232, 2012. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042012000200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042012000200009&lng=en&nrm=iso)>. access on 20 Nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042012000200009>.

PARACER, S.; AHMADJIAN, V. **Symbiosis: An Introduction to Biological Associations**. Oxford University Press. 2nd ed. 2000. access on 24 July 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201869432>.

RIBEIRO, K. D. K. da F. **"Simbiose": Brasil Escola**. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/biologia/simbiose.htm>. Acesso em 24 de julho de 2019.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ROUND, F. E. **The Biology of the algae**. Ernst. Arnold, 1966.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brasil. 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th Edition. Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, xiii, 944p. 2010.

WOOD, R.D.; IMAHORI, K. **A revision of the Characeae, 1: monograph of the Characeae**. J. Cramer, Weinhen. 904p., 1965.

## PRODUTOS NATURAIS APLICADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 20/11/2019

### Beatriz Santana Rocha

Departamento de Biofísica e Radiobiologia -  
UFPE

Recife-Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/4768357427600074>

### Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Departamento de Biofísica e Radiobiologia -  
UFPE

Recife-Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/2371995765980164>

### Ricardo Yara

Departamento de Engenharia Biomédica - UFPE  
Recife-Pernambuco

<http://lattes.cnpq.br/0851707453185143>

**RESUMO:** A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste numa técnica que promove a morte de células tumorais e/ou micro-organismos a partir de reações fotoquímicas envolvendo luz, oxigênio e um agente fotossensibilizador (FTS). O FTS acumula-se no tecido-alvo e sairá do estado fundamental a partir da irradiação de luz em um comprimento de onda específico, interagindo com o oxigênio disponível do meio, gerando produtos oxidados que produzem o efeito citotóxico. O presente estudo teve como objetivo fazer levantamento das pesquisas

que utilizaram produtos naturais como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, no intuito de verificar quais as principais aplicações da técnica, além de identificar as espécies mais utilizadas, bem como se há correlação entre estas. Trata-se de uma revisão integrada da literatura utilizando como base os bancos de Dados: Pubmed, Scielo e Lilacs. Concluiu-se que o ano de 2019 foi o ano que mais publicou-se, evidenciando a importância crescente do tema. Dentre os trabalhos avaliados, a maior parte teve como alvo células tumorais. As pesquisas fizeram uso principalmente de extratos, enquanto uma pequena minoria optou por utilizar substâncias isoladas. Dentre as espécies utilizadas nos trabalhos, destacaram-se *Curcuma sp.* e *Hypericum perforatum*, bem como, seus respectivos isolados, Curcumina e Hipericina, juntas, somam mais de um quarto de todos os trabalhos. Além disso, as famílias Amaranthaceae, Lamiaceae, Bignoniaceae e Polygonaceae, abrangearam mais de uma espécie com propriedades fotoinativadoras, com capacidade de eliminar diferentes células-alvos. Neste sentido, entende-se que estas são boas alternativas para a pesquisa de novos FTS de origem natural.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fototerapia; Fotossensibilizador; Fotoinativação; Produtos Naturais.

# NATURAL PRODUCTS APPLIED AS PHOTOSENSITIZERS IN PHOTODYNAMIC THERAPY: A REVIEW

**ABSTRACT:** Photodynamic Therapy (PDT) is a technique that promotes the death of tumor cells and/or microorganisms from photochemical reactions involving light, oxygen and a photosensitizing agent (PTS). PTS accumulates in the target tissue and will exit the ground state from light irradiation at a specific wavelength, interacting with the available oxygen in the medium, generating oxidized products that produce the cytotoxic effect. This study aimed to survey the research that used natural products as photosensitizers in Photodynamic Therapy, in order to verify the main applications of the technique, and identify the most used species, as well as if there is correlation between them. This is an integrated literature review based on the following databases: Pubmed, Scielo and Lilacs. It was concluded that the year 2019 was the year that was most published, highlighting the growing importance of the theme. Among the studies evaluated, most targeted tumor cells. Research has mainly used extracts, while a small minority have chosen to use isolated substances. Among the species used in the works, *Curcuma* sp. and *Hypericum perforatum*, as well as their respective isolates Curcumin and Hypericin together account for more than a quarter of all work. In addition Amaranthaceae, Lamiaceae, Bignoniaceae and Polygonaceae families comprised more than one species with photoinactivating properties, capable of eliminating different target cells. In this sense, it is understood that these are good alternatives for the search for new PTS of natural origin.

**KEYWORDS:** Phototherapy; Photosensitizer; Photoinactivation; Natural products.

## 1 | INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de sintetizar metabólitos secundários, que asseguram a estas mecanismos de adaptação para competição, aumentando as suas chances de sobrevivência (VIZZOTO *et al.*, 2010). Ao longo do tempo, foi observado que essas substâncias têm propriedades biológicas importantes também para o homem, sendo então introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje na composição de diversos medicamentos (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Por seu turno, a Terapia Fotodinâmica (TFD) foi a primeira técnica aprovada pelo órgão estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) que utiliza a combinação de luz e um agente fototerápico (RODRIGUES, 2014). O processo consiste na eliminação de células cancerígenas e/ou micro-organismos por apoptose e/ou necrose a partir de uma reação química resultante da combinação de luz, oxigênio e um fotossensibilizador (FTS) (RIBEIRO *et al.*, 2005).

O FTS acumula-se no tecido-alvo e sairá do estado fundamental a partir da irradiação de luz em um comprimento de onda específico, podendo seguir dois mecanismos principais de reação. O primeiro ocorre quando o FTS no estado tripleto interage com componentes do sistema gerando íons radicais que reagem com o

oxigênio disponível no meio. Enquanto o segundo consiste na geração de oxigênio singuleto a partir de trocas de energia com FTS (MACHADO, 2000). Desse modo, geram produtos oxidados que podem provocar a morte celular (ALVES, 2014).

Neste sentido, é crescente o número de trabalhos que fazem uso de produtos naturais como FTS, estes trabalhos têm demonstrado a importância dos recursos naturais além da importância desta emergente tecnologia TFD. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo fazer levantamento das pesquisas que utilizaram produtos naturais como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, no intuito de verificar quais as principais aplicações da técnica, além de identificar as espécies mais utilizadas, bem como se há correlação entre estas.

## 2 | REFENCIAL TEÓRICO

Os primeiros registros do uso dos princípios da terapia datam de antes de 2.000 AC, onde, egípcios faziam uso de plantas e luz solar no tratamento de doenças como o vitiligo (SIMPLICIO, MAIONCHI & HIOKA 2002). No início do século XX, em Munique, pesquisadores observaram os efeitos decorrentes de fotossensibilização de *Paramecium caudatum*, onde, foi observada a morte do protozoário após exposição à luz na presença do corante acridina. Tempos depois, o mesmo grupo de pesquisa foi responsável pela descoberta da necessidade da presença do oxigênio para a reação, bem como a criação do termo “*Photodynamic Therapy (PDT)*” ou Terapia Fotodinâmica (TFD) (ISSA & MANELA-AZULAY, 2010).

Em 1907, Von Tappeiner e Jodlbauer publicaram um livro, onde, definiram a TFD como processo de fotoinativação de tumores e patógenos, sendo atribuída à eles a primeira aplicação da terapia na Medicina. A obra conta ainda com o relato dos experimentos que o grupo de pesquisa realizou com eosina e luz artificial para tratamento de câncer cutâneo não melanoma e de outras dermatoses (ISSA & MANELA-AZULAY, 2010).

A partir da década de 60, iniciaram as pesquisas em busca de novos FTS a serem aplicados na terapia. Os primeiros trabalhos foram realizados a partir moléculas que tinham em comum a porfirina (heterociclos aromáticos constituídos por quatro unidades pirrólicas ligadas por de pontes meso-metínicas) em sua estrutura, classificados como FTS de primeira geração (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Nesse sentido, foram sintetizados, a partir da purificação da hematoporfirina, o derivado hematoporfirina, bem como, a protoporfirina IX (ISSA & MANELA-AZULAY, 2010). Derivados porfirínicos ainda são utilizados na clínica médica em diferentes tipos de tumores, como por exemplo, carcinoma do colo uterino e câncer de cabeça e pescoço, sendo utilizados como FTS o Photogem® (Rússia) e Photosan® (Alemanha), respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Os FTS descobertos até hoje podem ser classificados em quatro famílias:

Derivados porfirínicos (hematoporfirinas, bezoporfirinas e texafirinas), derivados da clorofila (clorinas, pupurinas e bacterioclorinas) e corantes (ftalocianinas e naftalocianinas) (ALVES, 2014).

Atualmente, já estão sendo aplicados na clínica os FTS de segunda geração (Clorinas), estes, possuem menor tempo de permanência, bem como, melhor solubilidade em meio fisiológico. A presença de bandas de absorção em comprimentos de onda maiores que 650 nm possibilita o uso de fontes de luz com maior poder de penetração nos tecidos, permitindo tratamentos de lesões mais profundas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A TFD destaca-se por causar efeitos colaterais menos agressivos a pacientes oncológicos do que os procedimentos convencionais (ALVES, 2014). Além disso, é uma alternativa emergente para contornar o problema da resistência bacteriana (ALFENAS *et al.*, 2011), podendo atuar ainda na eliminação de vírus (TOME *et al.*, 2007), descontaminação de materiais e no tratamento de infecções (BONNETT, 2000).

Atualmente, os FTS utilizados na clínica médica ainda apresentam algumas desvantagens como: efeitos colaterais, alto custo e lenta eliminação pelo organismo (RIBEIRO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Neste sentido, por serem mais baratos e de fácil acesso, os Produtos Naturais (PN) são uma alternativa emergente para contornar tais problemas (GASPARETTO *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho é verificar o atual cenário da pesquisa e uso de Produtos Naturais (PN) na PDT. Para tanto objetiva-se constatar a taxa anual de publicação deste tema; quais são as famílias botânicas mais exploradas para estudos de FTS; quais as áreas de aplicação sugerida da técnica; quais substâncias purificadas a partir de PN para aplicação em TFD e se existe produtos comercializados para este fim de extratos ou de ativos purificados.

### 3 | METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica, na qual foram utilizadas as bases de dados pubmed, scielo e lilacs entre 2003 e 2019. O levantamento foi realizado através de trabalhos nacionais e internacionais e nas áreas de cancerologia, odontologia, biofísica, biologia e afins. Os descritores utilizados foram: Terapia fotodinâmica, Fototerapia, fotoinativação, Produtos Naturais, bem como seus correspondentes em inglês (*Photodynamic Therapy, Phototherapy, Photoinactivation, Natural Products*). Como critérios de inclusão foram considerados artigos os quais abordavam informações a respeito de pesquisas que utilizaram produtos naturais como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, e enquadrado nos critérios de exclusão estão artigos científicos não que continham informações sobre a espécie utilizada, bem como, os que configuraram autoplágio, sendo considerado apenas um dos trabalhos publicados.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após triagem, resultou-se em 34 trabalhos publicados entre 2003 e 2019. Como pode ser visualizado no Figura 01, mesmo ainda não concluído, o ano de 2019 foi o ano que mais publicou-se trabalhos com o tema, evidenciando a importância que o uso de produtos naturais tem ganhado no campo da Terapia Fotodinâmica. Entretanto apesar de crescente a pesquisa ainda é incipiente levando em conta que somente a base Pubmed possui no mesmo período 19.374 resultados quando é utilizado o termo “*Photodynamic Therapy*”.

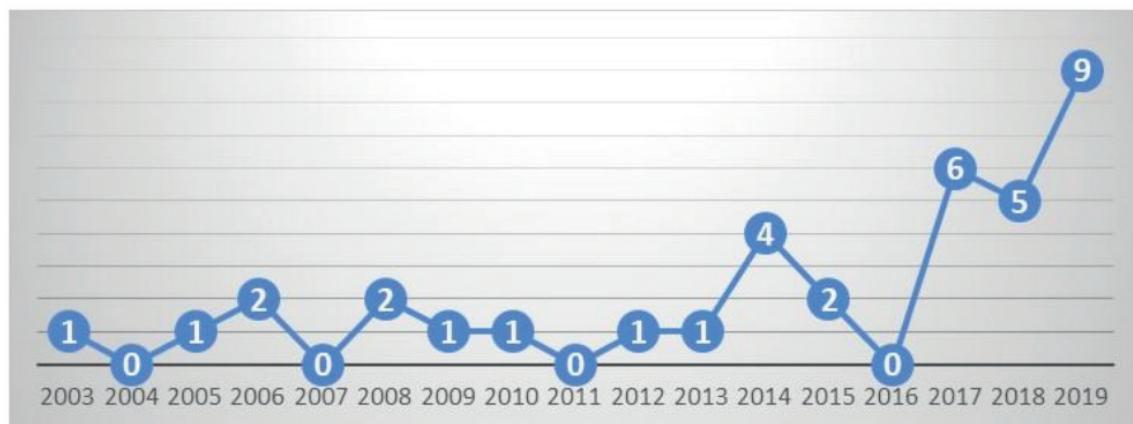


Figura 01. Número de publicações de acordo com o ano.

Fonte: Arquivo pessoal.

No levantamento constatou-se que foram utilizadas espécies vegetais e fúngica (SIEWERT *et al.*, 2019), veiculadas nas formulações desde extrato (CHO *et al.*, 2018), gel (SILVA *et al.*, 2019), até nanopartículas (PIETRA *et al.*, 2017). Grande parte elegeu as folhas (DE MENEZES *et al.*, 2017), porém alguns também utilizadas cascas (FORMIGA *et al.*, 2015) e sementes (SILVA *et al.*, 2019).

O levantamento também indicou que a pesquisa tem abordado diversas famílias botânicas para o estudo de novos FTS a partir de PN (Figura 02), não ocorrendo neste levantamento mais que dois gêneros por família abordada, isto indica que a bioprospecção de novos ativos para TFD é um tema em aberto. A listagem dos gêneros e espécies encontradas neste levantamento estão relacionados na Tabela 01 nos anexos.

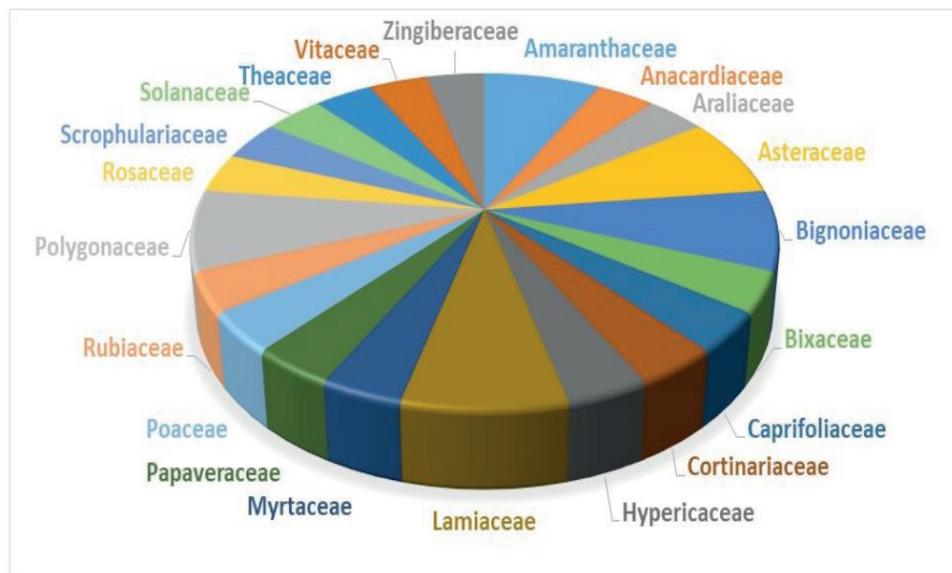


Figura 02. Distribuição dos estudos PN como FTS por família botânica

Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser observado na Figura 03, dos trabalhos selecionados, 19 (54%) utilizaram produtos naturais como fotossensibilizadores na terapia que tinham como alvo células tumorais, como por exemplo, fotoinativação de células HeLa (WAROWICKA *et al.*, 2019) e CH27 (LEUNG *et al.*, 2008).

Já em relação a fotoinativação bacteriana (29%), foram encontrados 10 trabalhos, utilizando a TFD em bactérias Gram-positivas (AKYUZ *et al.*, 2019) e Gram-negativas (SAITAWEE *et al.*, 2018). Enquanto que, tratando-se de fotoatividade antifúngica, foram encontrados três trabalhos (8%), todos avaliaram a morte de espécies de *Candida* (GASPARETTO *et al.*, 2010; POSTIGO *et al.*, 2019; PIETRA *et al.*, 2017) e um destes ainda realizou experimentos com *Cryptococcus neoformans* (PIETRA *et al.*, 2017).

Além disso, foram identificados 2 trabalhos que realizaram a fotoinativação de protozoários (6%), sendo estes, *Leishmania sp.* (TAYLOR *et al.*, 2013) e *Trypanosoma cruzi* (MIRANDA *et al.*, 2017). Já em relação a terapia aplicada a morte de vírus, foi encontrado apenas 1 trabalho que realizou experimentos com Herpes-vírus (HSV) 1 e 2, bem como Adenovírus (ADV) (3%) (MONJO *et al.*, 2018).

Os detalhes de quais as espécies vegetais utilizadas nestes estudos e qual ação avaliada foram listados na Tabela 02 do anexo. Em relação a atividade destes FTS frente a os modelos experimentais estudados estes estão relacionados na Tabela 3 do anexo.

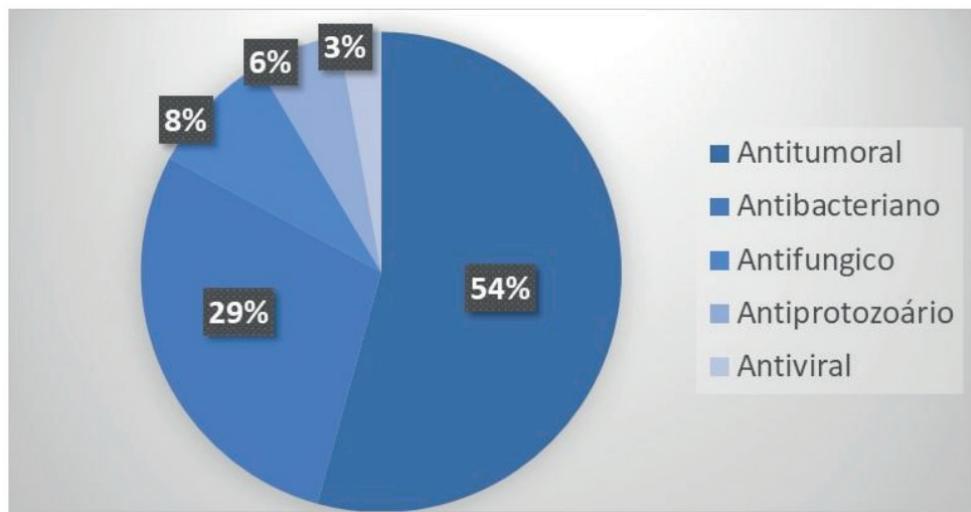


Figura 03 Classificação dos trabalhos encontrados em relação às células alvo da Terapia Fotodinâmica.

Fonte: Arquivo pessoal.

Dentre as espécies utilizadas nos trabalhos, destacaram-se *Curcuma sp.* e *Hypericum perforatum*, bem como, seus respectivos isolados, Curcumina (PICCO *et al.*, 2019; SANTEZI, REINA, & DOVIGO, 2018) e Hipericina (JENDŽELOVSKÁ *et al.*, 2016), juntas, somam mais de um quarto de todos os trabalhos, como pode ser visualizado no Tabela 2 anexo.

*H. perforatum* também chamou atenção por ser uma das espécies identificada com mais de uma atividade TFD documentada: antiprotozoário (TAYLOR *et al.*, 2013) e antitumoral em diferentes tipos de tumores (KLEEMANN *et al.*, 2014; KACEROVSKÁ *et al.*, 2008; STAVROPOULOS *et al.*, 2006; KAPSOKALYVAS *et al.*, 2005). Segundo Zhang e colaboradores (2017) a hipericina é uma quinona policíclica e um fotossensibilizador de ocorrência natural, ainda do mesmo autor, na medicina tradicional tem sido usado como tratamento para depressão e infecções virais. A atividade como FTS ocorre em torno de 599 nm e apresenta vantagens como rendimento quântico, espectro de absorção intenso na região visível, baixo foto branqueamento e meia-vida curta (27 horas mesmo na dosagem de 1500 µg / kg) e ampla faixa de excitação.

Por outro lado, Santezi e colaboradores (2018) em revisão sobre o potencial da curcumina como FTS descrevem este composto sendo fenólico, membro da família curcumínóide, extraído dos rizomas da *Curcuma longa*. Os autores relatam ainda que esta possui diversas ações farmacológica *per se* como efeitos anti-inflamatórios, anti-sépticos, antivirais e antitumorais. Além de atuar como agente anti-neuroinflamatório, beneficiando pacientes diagnosticados com Alzheimer, Esclerose Múltipla e Demência causada pelo HIV.

Em relação FTS, a curcumina absorve a luz azul, sendo aplicado na TFD como antimicrobiano, alguns estudam sugerem a curcumina como eficaz na redução de células tumorais, além de possuir baixa citotoxicidade. Entretanto, os mesmos

autores relatam a falta de protocolos clínicos.

Em relação a comercialização de extratos vegetais para TFD a empresa PhotoDynamic (<https://www.photo-dynamic.com/>) (Halifax, Canadá) tem como foco o desenvolvendo de um produto antibacteriano de higiene bucal para eliminação de placas bacterianas por TFD utilizando extrato de raiz de *Polygonum cuspidatum* como FTS, este produto foi denominado de Orthoquin™ (MONJO *et al.*, 2018). Neste mesmo trabalho, os autores analisaram o perfil fitoquímico por HPLC do extrato da raiz de *P. cuspidatum* e encontraram como composto majoritário polidatina (63 µg.mg<sup>-1</sup>), resveratrol (60 µg.mg<sup>-1</sup>), emodina (50 µg.mg<sup>-1</sup>), antraglicósido B (12 µg.mg<sup>-1</sup>), parietina (10 µg.mg<sup>-1</sup>).e ácido cássico (5,6 µg.mg<sup>-1</sup>).

Estes trabalhos indicam em seu conjunto a demanda de biosprospectar de forma mais sistemática o potencial de FTS da biodiversidade brasileira, indicando ainda uma janela de oportunidades nesta área.

## 5 | CONCLUSÃO

As principais vantagens do uso de produtos naturais frente aos fotossensibilizadores já utilizados na clínica são o baixo custo e o fácil acesso. Mesmo ainda não concluído, o ano de 2019 foi o ano que mais publicou-se trabalhos com o tema, evidenciando a importância que o uso de produtos naturais tem ganhado no campo da Terapia Fotodinâmica. Entretanto o tema participa com baixa participação geral, sendo que os relatos descritos utilizam diversas famílias botânicas. Entre os trabalhos avaliados, a maior parte (54%) teve como alvo células tumorais. As pesquisas fizeram uso principalmente de extratos, enquanto uma pequena minoria optou por utilizar substâncias isoladas.

Dentre as espécies utilizadas nos trabalhos, destacaram-se *Curcuma* sp. e *Hypericum perforatum*, bem como, seus respectivos isolados, Curcumina e Hipericina, juntas, somam mais de um quarto de todos os trabalhos, entretanto iniciativas de lançamento de produtos baseados em extratos também foram detectados. Neste sentido, entende-se que estas são boas alternativas para a pesquisa de novos FTS de origem natural e que o tema representa uma janela de oportunidade para exploração da biodiversidade.

## REFERÊNCIAS

AKYUZ, S. et al. **Antibacterial and photodynamic effects of some plant extracts for cavity disinfection.** Photodiagnosis Photodyn Ther ; 26: 48-52, Jun, 2019.

ALFENAS, C. F. et al. **Terapia fotodinâmica na redução de micro-organismos no sistema de canais radiculares.** Rev. bras. odontol., Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 68-71, 2011.

ALVES, J. F. S. et al. **Porfirinas e Terapia Fotodinâmica em Neoplasias.** Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2014.

AZIZI, A. et al. **Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on *Streptococcus mutans* bacterial colonies.** Photodiagnosis Photodyn Ther. sep;27:203-209, 2019.

BONNETT, R. et al. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.** Londres, Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

CHO, H. et al. **Development of Novel Photosensitizer Using the *Buddleja officinalis* Extract for Head and Neck Cancer.** Evid Based Complement Alternat Med ; 2018: 6917590, 2018.

DE MENEZES, C. et al. ***Tectona grandis* leaf extract, free and associated with nanoemulsions, as a possible photosensitizer of mouse melanoma B16 cell.** J Photochem Photobiol B ; 167: 242-248, Feb, 2017.

DOS SANTOS, D. P. et al. **Efficacy of photoactivated *Myrciaria cauliflora* extract against *Staphylococcus aureus* infection - A pilot study.** J Photochem Photobiol B. Feb;191:107-115, 2019.

FORMIGA, A. L. et. al. **In Vitro Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated with Hydroalcoholic Extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl.: New Therapeutic Perspectives.** Photomed Laser Surg. 2015 May;33(5):240-5. Epub Apr 13, 2015.

GASPARETTO, A. et al. **Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT).** J Photochem Photobiol B. 2010 Apr 2;99(1):15-20. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.01.009. Epub Jan 25, 2010.

GEORGE, B.; ABRAHAMSE, H.; HEMMARAGALA, N. **Anticancer effects elicited by combination of *Rubus* extract with phthalocyanine photosensitiser on MCF-7 human breast cancer cells.** Photodiagnosis Photodyn Ther ; 19: 266-273, Sep. 2017.

GONÇALVES, G. et al. **Photodynamic therapy with *Bixa orellana* extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial.** Trials. Oct 29;19(1):590, 2018.

HOI, S. et al. **Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and-independent apoptotic pathways in *in vitro* and *in vivo* models.** Phytother Res ; 26(5): 734-42, May, 2012.

ISSA, M; MANELA-AZULAY, M. **Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica.** An. Bras. Dermatol. Rio de Janeiro , v. 85, n. 4, p. 501-511, Aug. 2010.

JENDŽELOVSKÁ Z. et al. **Hypericinin the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin.** Front. PlantSci.7:560. doi: 10.3389/fpls.2016.00560, 2016.

JUAN, M; MINHU, C; YUN, L. **Enhancing the efficacy of photodynamic therapy by a chinese herbal medicine for hepatocellular carcinoma.** Cancer Biol Ther. Sep;5(9):1117-9. Epub 2006 Sep 23, 2006.

KACEROVKÁ, D. et al. **Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical *Hypericum perforatum* extract-a pilot study.** Photochem Photobiol. May-Jun;84(3):779-85. Epub 2008 Jan 7, 2008.

KAPSOKALYVAS, D. et al. **Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy?** J Photochem Photobiol B. Sep 1;80(3):208-16, 2005.

KIM, K; KAWANO, Y; YAMAZAKI, Y. **A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines.** Anticancer Res ; 23(3B): 2355-61, May-Jun, 2003.

KLEEMANN, B. et al. **St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death.** PLoS One ; 9(7): e103762, 2014.

LEUNG, H. et al. **P38-associated pathway involvement in apoptosis induced by photodynamic therapy with *Lonicera japonica* in human lung squamous carcinoma CH27 cells.** Food Chem Toxicol. Nov;46(11):3389-400, 2008.

- MAMONE, L. et al. **Photodynamic inactivation of Gram-positive bacteria employing natural resources.** J Photochem Photobiol B. Apr 5;133:80-9, 2014.
- MIRANDA, N. et al. **Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of *Arrabidaea chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*.** Photodiagnosis Photodyn Ther. Sep;19:256-265. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.05.004. Epub 2017 Jun 3, 2017.
- MONJO, A. et al. **Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex Viruses.** Viruses. Sep 29;10(10). pii: E532, 2018.
- OLIVEIRA, K. et al. **Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies.** Rev. Virtual Quim., 2015
- PAN, L. et al. **A novel composite hydrogel initiated by *Spinacia oleracea* L. extract on Hela cells for localized photodynamic therapy.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. Jun 1;75:1448-1455, 2017.
- PEMMARAJU, D. et al. **Chlorophyll rich biomolecular fraction of *A. cadamba* loaded into polymeric nanosystem coupled with Photothermal Therapy: A synergistic approach for cancer theranostics.** Int J Biol Macromo.; 110: 383-391, Apr 15, 2018.
- PEREIRA, R.; CARDOSO, M. **Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. Journal of Biotechnology and Biodiversity.** Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November, 2012.
- PIETRA, R et al. **Evaluation of polymeric PLGA nanoparticles conjugated to curcumin for use in a PDT.** Braz. J. Pharm. Sci., São Paulo, v. 53, n. 2, e16043, 2017.
- POSTIGO, A. et al. **Mechanistic studies of *Candida albicans* photodynamic inactivation with *Porophyllum obscurum* hexanic extract and its isolated thiophenic compounds.** Photodiagnosis Photodyn Ther. Jun;26:420-429, 2019.
- RIBEIRO, J.; et al. **Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer.** Physicae. v.5, n.2, p.5, 2005.
- RODRIGUES, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajá e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro.** xxi, 118 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- SAITAWEE, D. et al. **Photodynamic therapy of *Curcuma longa* extract stimulated with blue light against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.** Photodiagnosis Photodyn Ther. Jun;22:101-105, 2018.
- SANTEZI, C.; REINA, B.; DOVIGO, L. **Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review.** Photodiagnosis and photodynamic therapy, 21, 409-415, 2018.
- SHI, S. et al. **Acanthopanax Cortex extract: A novel photosensitizer for head and neck squamous cell carcinoma therapy.** Photodiagnosis Photodyn Ther ; 26: 142-149, 2019.
- SILVA, Z. et al. **The effects of photodynamic therapy with blue light and papain-based gel associated with Urucum, on collagen and fibroblasts: a spectroscopic and cytotoxicity analysis.** Lasers Med Sci. Aug 12. doi: 10.1007/s10103-019-02857-7, 2019.
- SIMPLOCIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos.** Quím. Nova, São Paulo , v. 25, n. 5, p. 801-807, Sept. 2002.
- SIEWERT, et al. **A convenient workflow to spot photosensitizers revealed photo-activity in basidiomycetes.** RSC Advances, issue 8, 2019.
- STAVROPOULOS, N. et al. ***Hypericum perforatum* L. extract - novel photosensitizer against**

human bladder cancer cells. *J Photochem Photobiol B* ; 84(1): 64-9, Jul 03, 2006.

SUDENE - Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste. **Desenvolvimento da Cadeia Biossustentável de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em Pernambuco - Qualidade Botânica Tradicional e por Imagem, Molecular, Química e Microbiológica**. Pernambuco, 2016.

TAYLOR, V.; RIOS, Y. R.; LEON, D. **Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: hipericina, una alternativa prometedora**. *Infect.*, Bogotá , v. 17, n. 2, p. 90-102, June, 2013.

TOFFOLI, D. J. **Caracterização espectroscópica de complexos Hipocrelina B: Lantanídeos para uso em terapia fotodinâmica**. Dissertação - Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TOMANKOVA, K. **Study of the photodynamic effect on the A549 cell line by atomic force microscopy and the influence of green tea extract on the production of reactive oxygen species**. *Ann N Y Acad Sci* ; 1171: 549-58, Aug, 2009.

TOME, J. et al. **Synthesis of Neutral and Cationic Tripyridylporphyrin-DGalactose Conjugates and the Photoinactivation of HSV-1**. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, pp. 4705-4713, 2007.

VIZZOTO, M.; KROLOW, C.; WEBER, G. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WAROWICKA, A. et al. **Protoberberine compounds extracted from *Chelidonium majus* L. as novel natural photosensitizers for cancer therapy**. *Phytomedicine*. Apr 9;64:152919, 2019.

WEN , W. et al. **Application of the Ethyl Acetate Extract of *Cichorium* as a Potential Photosensitizer in Photodynamic Therapy Induces Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer Cell Lines via the Protein Kinase R-Like Endoplasmic Reticulum Kinase Pathway**. *J Biomed Nanotechnol*. Sep 1;15(9):1867-1880, 2019.

ZHANG, K. **Hypericin-photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes cell line MH7A**. *Iran J Basic Med Sci*; 21:130-137, 2018.

## APÊNDICE

Família	Espécie
Amaranthaceae	<i>Alternanthera maritima</i> <i>Spinacia oleracea L.</i>
Anacardiaceae	<i>Schinopsis brasiliensis</i>
Araliaceae	<i>Acanthopanax</i>
Asteraceae	<i>Cichorium sp.</i> <i>Porophyllum obscurum</i>
Bignoniaceae	<i>Arrabidaea chica</i> <i>Tecoma stans</i>
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>
Caprifoliaceae	<i>Lonicera japonica</i>
Cortinariaceae	<i>Cortinarius croceus</i>
Hypericaceae	<i>Hypericum perforatum</i>
Lamiaceae	<i>Scutellaria Barbata</i> <i>Tectona grandis</i>
Myrtaceae	<i>Myrciaria cauliflora</i>

Papaveraceae	<i>Chelidonium majus L.</i>
Poaceae	<i>Phyllostachys nigra</i>
Rubiaceae	<i>Anthocephalus cadamba</i>
Polygonaceae	<i>Polygonum cuspidatum (Orthoquin)</i> <i>Rumex cristatus DC.</i>
Rosaceae	<i>Rubus sp.</i>
Scrophulariaceae	<i>Buddleja officinalis</i>
Solanaceae	<i>Solanum verbascifolium</i>
Theaceae	<i>Camellia sp.</i>
Vitaceae	<i>Cissus verticillata</i>
Zingiberaceae	<i>Curcuma sp.</i>

Tabela 01. Classificação das espécies de acordo com as Famílias.

Fonte: Arquivo pessoal.

Espécie / Isolado	Atividades biológicas	Autores
<i>Acanthopanax cortex</i>	Antitumoral	Shi <i>et al.</i> , 2019
<i>Alternanthera maritima</i>	Antifúngico	Gasparetto <i>et al.</i> , 2010
<i>Anthocephalus cadamba</i>	Antitumoral	Pemmaraju <i>et al.</i> , 2018
<i>Arrabidaea chica</i>	Antiprotozoário	Miranda <i>et al.</i> , 2017
<i>Phyllostachys nigra</i>	Antitumoral	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Bixa orellana</i>	Antibacteriano	Silva <i>et al.</i> , 2019 Gonçalves <i>et al.</i> , 2018
<i>Buddleja officinalis</i>	Antitumoral	Cho <i>et al.</i> , 2018
<i>Chá verde</i>	Antitumoral	Tomankova <i>et al.</i> , 2009
<i>Chelidonium majus L.</i>	Antitumoral	Warowicka <i>et al.</i> , 2019
<i>Cichorium sp.</i>	Antitumoral	Wen <i>et al.</i> , 2019
<i>Cissus verticillata root.</i>	Antibacteriano	Mamone <i>et al.</i> , 2014
<i>Cortinarius croceus</i>	Antitumoral	Siewert <i>et al.</i> , 2019
<i>Curcuma sp. e Curcumina</i>	Antibacteriano Antifúngico	Azizi <i>et al.</i> , 2019 Saitawee <i>et al.</i> , 2018 Pietra <i>et al.</i> , 2017 Lee <i>et al.</i> , 2017
<i>Hypericum perforatum e Hipericina</i>	Antiprotozoário Antitumoral	Taylor <i>et al.</i> , 2013. Kleemann <i>et al.</i> , 2014 Kacerovská <i>et al.</i> , 2008 Stavropoulos <i>et al.</i> , 2006 Kapsokalyvas <i>et al.</i> , 2005
<i>Lonicera japonica</i>	Antitumoral	Leung <i>et al.</i> , 2008
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Antibacteriano	Dos Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>Polygonum cuspidatum (Orthoquin)</i>	Antiviral	Monjo <i>et al.</i> , 2018
<i>Porophyllum obscurum</i>	Antifúngico	Postigo <i>et al.</i> , 2019

<i>Rubus</i>	Antitumoral	George <i>et al.</i> , 2017
<i>Rumex cristatus DC. extrair</i>	Antibacteriano	Akyuz <i>et al.</i> , 2019
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Antibacteriano	Formiga <i>et al.</i> , 2015
<i>Scutellaria Barbata</i>	Antitumoral	Juan <i>et al.</i> , 2006 Hoi <i>et al.</i> , 2012
<i>Solanum verbascifolium</i>	Antibacteriano	Mamone <i>et al.</i> , 2014
<i>Spinacia oleracea L.</i>	Antitumoral	Pan <i>et al.</i> , 2017
<i>Tecoma stans</i>	Antibacteriano	Mamone <i>et al.</i> , 2014
<i>Tectona grandis</i>	Antitumoral	De Menezes <i>et al.</i> , 2017

Tabela 02. Classificação das espécies de acordo com os efeitos biológicos avaliados nos trabalhos.

Fonte: Arquivo Pessoal

<b>Tipo</b>	<b>Célula-alvo</b>
Antitumoral	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (KB e Hep-2) Câncer de pele (A431) Leucemia (CMK-7) Câncer de cabeça e pescoço Carcinoma do pulmão (A549 e CH27) Câncer cervical (HeLa e C33A) Carcinoma colorretal (HCT116 e SW620) Queratose actínica Carcinoma basocelular Morbus Bowen (carcinoma <i>in situ</i> ) Câncer de bexiga humana (T24 e RT4) Melanoma (A375, 501mel, UCT Mel-1 e B16) Leucemia (HL6) Câncer de mama (MCF-7) Carcinoma hepatocelular
Antibacteriano	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Antifúngico	<i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida sp.</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>
Antiprotozoário	<i>Leishmania sp.</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
Antiviral	Adenovírus Herpes-vírus 1 e 2

Tabela 03. Classificação das aplicações da Terapia de acordo com a células-alvo.

Fonte: Arquivo pessoal.

## O USO DE MODELOS NO PROCESSO ENSINO/APRENDIZAGEM APLICADOS À PARASITOLOGIA E ENTOMOLOGIA

Data de aceite: 12/12/2019

### **Sílvia Maria Santos Carvalho**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas. Ilhéus -  
Bahia.

### **Kaique Santos Reis**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências da Saúde. Ilhéus -  
Bahia.

### **Raquel dos Santos Damasceno**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências da Saúde. Ilhéus -  
Bahia.

### **Juliana Almeida da Silva**

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de  
Inovações em Terapias, Ensino e Bioproductos –  
LITEB.  
Rio de Janeiro, RJ.

**RESUMO:** Com o passar do tempo, a humanidade tem presenciado novas formas de aprendizado, já que a interatividade, especialmente com o uso das redes sociais e tantas outras ferramentas, tem interferido no modo como a informação é disseminada. Repensar a construção do ensino é uma forma de acompanhar as mudanças recorrentes no cotidiano, sem necessariamente abandonar metodologias tradicionais. O ensino em Ciências exige interatividade, ludicidade e criticidade no

desenvolvimento de estratégias que constroem o fazer educativo. A importância disso na aprendizagem impacta na compreensão e transformação da realidade do indivíduo. Nessa perspectiva, este trabalho objetivou apresentar a utilização de material instrucional produzido com massas de biscuit nas aulas de Parasitologia e Entomologia, para produção de modelos biológicos, como importante ferramenta para a construção do aprendizado no ambiente acadêmico e utilização nos trabalhos em comunidades. Este modelo metodológico adotado promoveu melhor aprendizado dos estudantes que cursaram as disciplinas, já que tiveram a oportunidade de exercitar competências e habilidades, especialmente no estudo da morfologia de parasitas e insetos vetores. Nas comunidades, os modelos apresentados serviram para falar de Educação em Saúde e da necessidade da adoção de medidas preventivas. Estratégias de ensino quando bem aplicadas se prestam ao propósito de promover um melhor aprendizado de modo dinâmico, interessante, usando a ludicidade como o atrativo necessário para a construção dos saberes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ludicidade. Dinamização. Modelos analógicos. Aprendizado.

THE USE OF MODELS IN THE TEACHING/  
LEARNING PROCESS APPLIED TO

**ABSTRACT:** Over time, humanity has seen new forms of learning, as interactivity, especially with the use of social networks and so many other tools, has interfered with the way information is disseminated. Rethinking the construction of teaching is a way to keep up with recurring changes in daily life, without necessarily abandoning traditional methodologies. Science education requires interactivity, playfulness and criticality in the development of strategies that build educational practice. The importance of this in learning impacts the understanding and transformation of the individual's reality. From this perspective, this work aimed to present the use of instructional material produced with modelling clay in Parasitology and Entomology classes, for the production of biological models, as an important tool for the construction of learning in the academic environment and use in community work. This adopted methodological model promoted better learning of students who attended the disciplines, since they had the opportunity to exercise competences and skills, especially in the study of parasite and insect vector morphology. In the communities, the models presented served to talk about Health Education and the need to adopt preventive measures. Well-applied teaching strategies serve the purpose of promoting better learning in a dynamic, interesting way, using playfulness as the necessary attraction for the construction of knowledge.

**KEYWORDS:** Playfulness. Dynamization. Analog models. Learning.

## 1 | INTRODUÇÃO

O uso de materiais didáticos para aplicação no ensino é um assunto que muito se fala ao longo da história da educação. Instrumentos educacionais como réplicas em madeira e o flanelógrafo eram utilizados como recursos meramente ilustrativos, com o objetivo de visualização e memorização. No início do século XVII, a comunidade passou a se questionar a respeito do protagonismo dos alunos nesse processo. Nesse cenário, o reconhecido filósofo Rousseau, no século XVIII, propõe a valorização do trabalho manual e de jogos didáticos para o desenvolvimento cognitivo da criança (SOUZA, 2007). O uso de modelos analógicos que se propõem a trabalhar o lúdico na construção do conhecimento científico tem se tornado uma importante ferramenta metodológica aplicada a uma diversidade de público, em diferentes faixas etárias.

Esse trabalho trata da apresentação e discussão das atividades relacionadas ao projeto de ensino intitulado: “O uso de modelos no processo ensino/aprendizagem aplicados à Parasitologia e Entomologia”. A intenção foi promover o alinhamento entre Ensino X Pesquisa X Extensão, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA. O material produzido em ambiente acadêmico foi levado para apresentação às comunidades junto ao projeto de extensão que trabalha a parasitologia na comunidade. Em adicional, a pesquisa foi realizada especialmente

através da realização de exames parasitológicos de fezes para delineamento do perfil epidemiológico de cada comunidade, para plicação na proposta de Educação em Saúde. Com base no exposto, esse trabalho objetivou promover o uso de metodologias ativas através de modelos analógicos para trabalhar, no viés da ludicidade, o processo ensino/aprendizagem aplicados à Parasitologia e à Entomologia.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia de trabalho se baseou na confecção de modelos analógicos produzidos com massas de biscuit para aplicação no aprendizado das aulas de Parasitologia e Entomologia, no exercício do estudo da morfologia de parasitas e insetos vetores, e discussão de aspectos epidemiológicos; e apresentação em comunidades carentes de serviços de saúde, para falar de Educação em Saúde. Todo o trabalho se construiu a partir do ano de 2013, atendendo a este público diverso (acadêmicos e comunidades extramuros), para fins distintos.

A estratégia de realizar grupos de oficinas também foi adotada para aumentar a produção das peças e fomentar a formação de agentes multiplicadores.

Nesse período, além dos modelos produzidos (Fig.1), houve a necessidade da confecção de um estúdio fotográfico adaptado para captura das imagens dos modelos, com lâmpadas especiais; e aquisição de material necessário para dar o formato final às peças, como lâminas, agulhas, pinças, moldes e tintas (Fig. 2).

A pesquisa bibliográfica se deu a partir de livros, artigos científicos, textos específicos que tratavam da temática, discutindo as estratégias de ensino.



Figura 1. Peças confeccionadas com material em biscuit.

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Material utilizado para confecção das peças em biscuit.

Fonte: Arquivo pessoal.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em sua análise, Marcondes (1972) já afirmava que a educação não deveria ficar restrita ao conhecimento, mas deveria estar debruçada sobre a motivação do aprendizado. Nessa perspectiva, surgiu a intenção do trabalho com modelos metodológicos diferenciados buscando uma linguagem científica de fácil compreensão, na utilização do uso de massa de biscuit, a fim de promover a interação entre docente e estagiários deste projeto de ensino, na confecção das peças; docentes e discentes, nas aulas práticas; e docentes, discentes e comunidades, nas palestras educativas nos trabalhos extensionistas, e de pesquisa em campo. Essa proposta pode ser bem traduzida como construção, transmissão e recepção do conhecimento, no alinhamento entre Ensino X Pesquisa X e Extensão.

Ao longo deste período de atividades com o projeto, foram realizadas oficinas no Laboratório de Parasitologia da UESC, envolvendo discentes dos cursos da área de saúde e biológica; bem como realização de oficina no 6º CBEU (Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2014), na cidade de Belém do Pará. As oficinas permitiram uma maior produção de modelos que se prestaram, também, à cessão para escolas e empréstimos para demais projetos que fizeram a solicitação, quando da apresentação em comunidades. Em análise observacional ficou perceptível que as atividades com o público acadêmico sempre foram bem avaliadas entre os envolvidos, onde a possibilidade de estudar a morfologia dos parasitas e fatores epidemiológicos foram considerados os pontos fortes da proposta. Entre aqueles indivíduos das comunidades atendidas pelo projeto para quem as peças eram apresentadas, o ponto forte sempre foi a discussão acerca dos problemas de saúde e a importância de profilaxia e controle das doenças parasitárias.

No mais, quando se refere às vantagens do uso desse tipo de material, é necessário pontuar a durabilidade da peça, graças ao uso da massa de biscuit; além

do que o seu manuseio não deforma a peça com o passar do tempo, dada a sua rigidez. Já quando se fala em vantagens no aprendizado, é importante citar Krasilchik (1996), quando menciona que o aluno que aprende com modelos recuperam mais facilmente conceitos e geram mais soluções criativas quando expostos a problemas.

Figueiredo (2008, apud ALVES, 2010) aponta a ludicidade como uma necessidade do ser humano em qualquer idade. De fato, a aplicação de metodologias facilitadoras da disseminação do conhecimento deve estar em prática em todos os níveis do processo educacional, desde a primeira infância até o ambiente acadêmico.

E, mesmo na Universidade, a busca por aprendizados diferenciados deve ser estimulada. A experimentação da construção dos modelos analógicos em biscuit permitiu, no ambiente acadêmico, não só o exercício de novos saberes através de trabalho manual, estudando morfologia e discutindo ciclo biológico de parasitas; mas tirou o discente do papel de espectador para a função de protagonista do conhecimento, alinhando o conteúdo teórico adquirido em sala de aula, ao prático, adquirido em laboratório, nas aulas de microscopia.

Mais que essa experimentação, a possibilidade de pensar de modo interdisciplinar – estar em torno de uma bancada confeccionando o material permite, em concomitante, a formação de uma roda de conversa. Produzir formas evolutivas diferentes de um mesmo parasita, por exemplo, significa falar da sua localização no corpo humano, quadro clínico que pode ser produzido no paciente, patogenia, ciclo biológico, epidemiologia, distribuição geográfica, ação farmacológica de quimioterápicos; ou seja, é também uma ação interdisciplinar, muitas vezes relacionada à vivência individual. Para Morin (2000) o conhecimento contextualizado, por fazer parte da realidade dos estudantes, possibilita o envolvimento intelectual e afetivo com o que é aprendido.

É entendimento que os objetivos propostos com o desenvolvimento deste trabalho foram alcançados até o presente. A replicação desse material instrucional permitiu um saber dinâmico e investigativo; e talvez aí esteja o sucesso da proposta, que continua em andamento (SOUZA e cols., 2013; SANTOS-FILHO e cols., 2013; CARVALHO e cols., 2013).

Obviamente que o ensino tradicional que estimula o indivíduo ao raciocínio crítico tem o seu papel reconhecido. É, sobretudo, necessário ressaltar que as estratégias inovadoras devem estar em consonância com os modelos já utilizados como proposta para uma boa aprendizagem (RODRIGUES, 2014). Vale comentar que as disciplinas que adotaram esse modelo de trabalho continuam com aulas expositivas, mas incorporaram outras estratégias, como produção de jogos, histórias, montagem de peças teatrais, além do próprio biscuit. Isso porque se entende que essas ferramentas que se utilizam de falar da Parasitologia e da Entomologia geram a oportunidade de discutir questões econômicas e sanitárias; mas, sobretudo,

políticas públicas e negligenciamento da saúde. Para além dessa constatação, a possibilidade de exercitar competências e habilidades de discentes da área de saúde e prestar atendimento às comunidades.

## 4 | CONCLUSÃO

Conclui-se que é necessário fomentar o uso de metodologias ativas que estimulem ao processo de ensino-aprendizagem de forma dinâmica e estimulante, fazendo com que a população e profissionais, assim como estudantes, atuem na construção de saberes.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais aos discentes envolvidos com este projeto, que foram bolsistas e voluntários ao longo deste período, bem como às comunidades que sempre tão bem recebem a proposta e participam ativamente.

## REFERÊNCIAS

- CARVALHO, S. M. S.; SANTOS-FILHO, Paulo Sérgio ; GÓES, Laís Mendes dos Santos ; SILVA, R. M. R. ; BARRETO, Cilene Souza ; BONFIM, Milena Alves. **O uso de modelos no processo ensino-aprendizagem aplicados à Parasitologia e Entomologia.** 19º Seminário de Iniciação Científica: Ética e Pesquisa. Ilhéus, BA. 06 a 08 de Novembro de 2013 (Apresentação de trabalho/Congresso).
- KRASILCHIK, M. **Prática de Ensino de Biologia.** Harbra. São Paulo, 1996.
- MARCONDES, R.S. **Educação em saúde na escola.** Revista de Saúde Pública. V. 6, 1972.
- MORIN, E. **Os sete saberes necessários à educação do futuro.** São Paulo: Cortez; Brasília, DF: UNESCO, 2000.
- RODRIGUES, M. C. S. **Estratégias do ensino em ciências aplicadas à parasitologia: ferramentas e propostas inovadoras.** Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Ciências Biológicas EaD) - Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014.
- SANTOS FILHO, P. S.; SOUZA, H. K. O., **GÓES, L. M. ; SILVA, R. M. R.; BONFIM, M. A. ; BARRETO, C. S ; CARVALHO, S. M. S . Confecção de modelos em biscuit para aplicação no processo ensino-aprendizagem em parasitologia.** XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia. Florianópolis, SC. 22 a 26 de outubro de 2013 (Apresentação de trabalho/Congresso).
- SOUZA<sup>1</sup>, H. K. O.; SANTOS FILHO<sup>1</sup>, P. S. B.; PAIXÃO<sup>1</sup> M. S.; SANTOS<sup>2</sup>, P. C. M.; SILVA<sup>3</sup>, J. A.; CARVALHO<sup>4</sup>, S. M. S.; **modelos em biscuit na promoção do conhecimento em Parasitologia nas comunidades.** Simpósio Nordestino de Biomedicina. Aracaju, SE. 14 a 16 de novembro de 2013
- SOUZA, S.E. **O uso de recursos didáticos no ensino escolar.** Arq Mudi. 2007; 11(Supl.2):110-4.

## PRODUÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO HISTOLÓGICO PARA OS CURSOS DE GRADUAÇÃO DA ÁREA DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

Data de aceite: 12/12/2019

Data de Submissão: 12/10/2019

### **Krisnayne Santos Ribeiro**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Discente do Curso de Ciências Biológicas,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-BA.  
<http://lattes.cnpq.br/8235318954038902>

### **Hudson Sá Sodré**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Discente do Curso de Medicina, Departamento  
de Saúde, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/6317881281751640>

### **Rhuan Victor Pereira Moraes**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Discente do Curso de Medicina, Departamento  
de Saúde, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/4494995419989554>

### **Ana Luísa Silva Costa**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Discente do Curso de Medicina Veterinária,  
Departamento de Ciências Agrárias e  
Ambientais, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/8354438516337121>

### **Iuri Prates Souza**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Discente do Curso de Medicina Veterinária,  
Departamento de Ciências Agrárias e  
Ambientais, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/8979425019654698>

### **Aparecida do Carmo Zerbo Tremacoldi**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Docente do Departamento de Ciências

Biológicas, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/0602769009677485>

### **Tania Barth**

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Docente do Departamento de Ciências  
Biológicas, Ilhéus-BA. <http://lattes.cnpq.br/1312807964582974>

**RESUMO:** A formação acadêmica é um processo de ensino e aprendizagem que visa o desenvolvimento de competências para a atuação profissional, sendo fundamental a interação entre o conteúdo teórico e prático. A disciplina Histologia compõe a grade curricular de cursos da área da saúde humana como Enfermagem, Biomedicina e Medicina, sendo necessária para que o aluno possa compreender as correlações anatomo-histofisiológicas dos organismos em estudo. Assim, é importante que além das aulas teóricas, os estudantes disponham de aulas práticas baseadas na análise de lâminas histológicas, fotomicrografias e outros recursos digitais, que facilitem a compreensão do assunto e tornem seu estudo mais dinâmico. Ainda, para os cursos da área de saúde humana, dispor de material histológico confeccionado com tecido humano, propicia um maior interesse dos estudantes. O objetivo do projeto de ensino foi a ampliação do acervo de material didático histológico da UESC, por meio da confecção de lâminas histológicas

com material biológico humano e da elaboração de um atlas histológico digital. Assim, as amostras de tecido humano, concedidas pelo Laboratório de Patologia do Sul da Bahia, em Itabuna, foram processadas no Laboratório de Histologia Animal (LHA) da UESC, por técnicas histológicas de rotina, com inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina (HE). Como resultados, foram produzidas mais de 600 lâminas de diferentes órgãos, disponibilizadas para uso no Laboratório de Habilidades Morfo-Funcional e no LHA da UESC. Após a análise para identificação do órgão/tecido, as lâminas foram etiquetadas e fotomicrografadas. As imagens foram incluídas no Atlas Virtual de Histologia da UESC, que conta com diversas imagens abrangendo 9 sistemas do organismo e um vídeo sobre os componentes do microscópio de luz e o manuseio correto deste, como um recurso didático adicional. A utilização das lâminas histológicas produzidas com material biológico de origem humana, tem motivado os estudantes, melhorando o processo de ensino-aprendizagem.

**PALAVRAS-CHAVE:** Histologia, Material Didático, Ensino-Aprendizagem

## HISTOLOGICAL TEACHING PRODUCTION FOR HEALTH GRADUATION COURSES OF THE STATE UNIVERSITY OF SANTA CRUZ

**ABSTRACT:** The academic formation is a teaching-learning process that aims the development of competences for professional performance, being fundamental the interaction between theoretical and practical content. The Histology is part of the curriculum of human health courses such as Nursing, Biomedicine and Medicine, being needed for the student to understand the anatomo-histo-physiological correlations of the organisms under study. Thus, it is important that in addition to lectures, students have practical classes based on analysis of histological slides, photomicrographs and other digital resources, which facilitate the understanding of the subject and make their study more dynamic. Also, for courses in the area of human health, to have histological material made with human tissue provides a greater interest of students. The objective of learning project was to expand the histological didactic material collection of UESC by making histological slides with human biological material and by elaborating a digital histological atlas. Thus, human tissue samples, granted by the Pathology Laboratory of Southern Bahia, in Itabuna, were processed at the Laboratory of Animal Histology (LHA) of UESC by routine histological techniques, including paraffin embedding and hematoxylin and eosin staining (HE). As a result, more than 600 slides from different organs were produced and available for use on Morphofunctional Laboratory and LHA. After analysis for organ / tissue identification, slides were labeled and photomicrographed. The images were included in the Virtual Histology Atlas of UESC, which has several images covering 9 organism systems and a video about the light microscope components and its correct handling, as an additional didactic resource. The use of histological slides produced with human biological material, has motivated students, improving the teaching-learning process.

**KEYWORDS:** Histology, Teaching Material, Teaching-Learning

## 1 | INTRODUÇÃO

A formação acadêmica é um processo de ensino e aprendizagem que visa o desenvolvimento de competências para a atuação profissional e este processo depende da interação entre o teórico e o prático, a fim de proporcionar um aprendizado mais consistente, crítico e investigativo. Na área da saúde, ela deve ser vista como um processo educacional que se baseia no desenvolvimento de conhecimentos e habilidades (BOTTI e REGO, 2010). O uso de material didático apropriado, incluindo o uso de tecnologias digitais, é necessário para promover o aprendizado e para estimular o interesse do aluno, contribuindo para a construção do conhecimento técnico-científico específico (BOUTONNAT et al., 2006; REZENDE, 2002; SANTA-ROSA e STRUCHINERII, 2011). A disciplina Histologia pertence ao ciclo básico de disciplinas de cursos de graduação da área da saúde, de ciências biológicas e outros e, precisa estar consolidada na formação do aluno. Assim, é necessário proporcionar o acesso a diferentes instrumentos de obtenção de conhecimento, sejam teóricos, práticos, tradicionais ou tecnológicos. Dentre os práticos, a observação de lâminas histológicas torna palpável o conhecimento teórico correspondente, tendo relevante importância no desenvolvimento do conhecimento dos estudantes e estes por sua vez, reconhecem a contribuição das aulas práticas para seu aprendizado em histologia, assim como a sua importância no desenvolvimento do curso médico (LIMA et al., 2011; HEIDGER et al., 2002; ASKEW e HEFFELINGER, 1998). Em relação aos instrumentos tecnológicos, o acesso a imagens histológicas em plataformas virtuais, é uma forma eficaz para reforçar o conhecimento adquirido de forma tradicional. A especificidade dos cursos da área da saúde implica no uso de material didático adequado, confeccionado com amostras de tecido humano e técnicas histológicas de rotina e especiais. Para o curso de Medicina da UESC, o conteúdo envolvendo a histologia faz parte de 10 módulos da grade curricular do 1º. ano e 2º. ano, compreendendo 8 turmas práticas e atendendo 80 alunos anualmente. Nos cursos de Enfermagem, Biomedicina e Ciências Biológicas da UESC, anualmente, esta disciplina atende, em média, 10 turmas práticas e 180 alunos. Considerando que ao longo da disciplina de Histologia são abordados aproximadamente 50 assuntos e que cada turma prática atende em torno de 15 alunos, seria necessário ter disponível semestralmente 750 lâminas por disciplina. Embora a aquisição comercial de lâminas histológicas seja possível, isto se torna bastante oneroso, pois é um material que requer constante reposição. Por outro lado, a possibilidade de confeccionar lâminas histológicas na instituição, é também uma oportunidade de aprendizado para nossos alunos. Dessa forma, foi proposto um projeto de ensino tendo como objetivo a ampliação e manutenção do acervo de material didático histológico da UESC, por meio da confecção de lâminas histológicas com material biológico humano e da

elaboração de um atlas histológico digital.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de material biológico humano utilizadas no projeto de ensino foram concedidas pelo Laboratório de Patologia do Sul da Bahia, em Itabuna. As amostras obtidas a partir de biópsias realizadas em procedimentos cirúrgicos hospitalares, foram fixadas em formol 10%, enviadas para o laboratório de patologia e submetidas à macroscopia. Após a seleção da área de interesse pelo laboratório de patologia, fragmentos menores foram encaminhados ao Laboratório de Histologia Animal (LHA), sem qualquer tipo de identificação ou informação sobre os pacientes submetidos às biópsias.

No LHA, as amostras foram transferidas do fixador para o álcool 50% e desidratadas em uma série crescente de álcoois até o álcool 100%. Após, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina líquida. Os blocos de parafina foram cortados (5-7 $\mu$ m) em micrótomo rotativo manual e as lâminas obtidas neste processo foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (BEHMER et al, 1976) para identificação geral dos tecidos. As lâminas coradas foram montadas com bálsamo do Canadá e etiquetadas com as seguintes informações: nome do tecido ou órgão, origem do material biológico (ou seja, de origem humana), técnica de coloração empregada e o laboratório onde foram confeccionadas. As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio (Leica DM 2500) no Centro de Microscopia Eletrônica da UESC. As imagens foram utilizadas para a elaboração do Atlas Virtual de Histologia, após serem editadas (software Power Point) para ressaltar as estruturas mais importantes a serem observadas nas imagens, incluindo sua respectiva legenda. As lâminas foram organizadas nos laminários do Laboratório de Habilidades Morfo-Funcionais (LH) e do LHA para uso nas aulas práticas de Histologia, em estudos extra-classe e nas monitorias para diversas disciplinas dos cursos de graduação da área da saúde.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto de ensino foi motivado pela necessidade de ampliar o acervo de material didático histológico, bem como, de adequá-lo às necessidades específicas dos cursos de graduação da área da saúde humana, utilizando amostras de tecido humano no preparo das lâminas. O uso de material didático apropriado é imprescindível para promover o aprendizado e para estimular o interesse do aluno em busca de um conhecimento mais amplo (SANTA-ROSA e STRUCHINERII, 2011). Ao longo do projeto, foram produzidas em torno de 600 lâminas histológicas disponíveis para uso em aulas práticas, compreendendo diferentes sistemas do corpo (Fig. 1), além

de 237 lâminas excedentes e amostras em diferentes fases de processamento. Ao mesmo tempo, verificamos a necessidade de continuar produzindo as lâminas, pois nem todos os assuntos foram contemplados até o momento, devido às dificuldades para a obtenção de amostras de tecido humano.

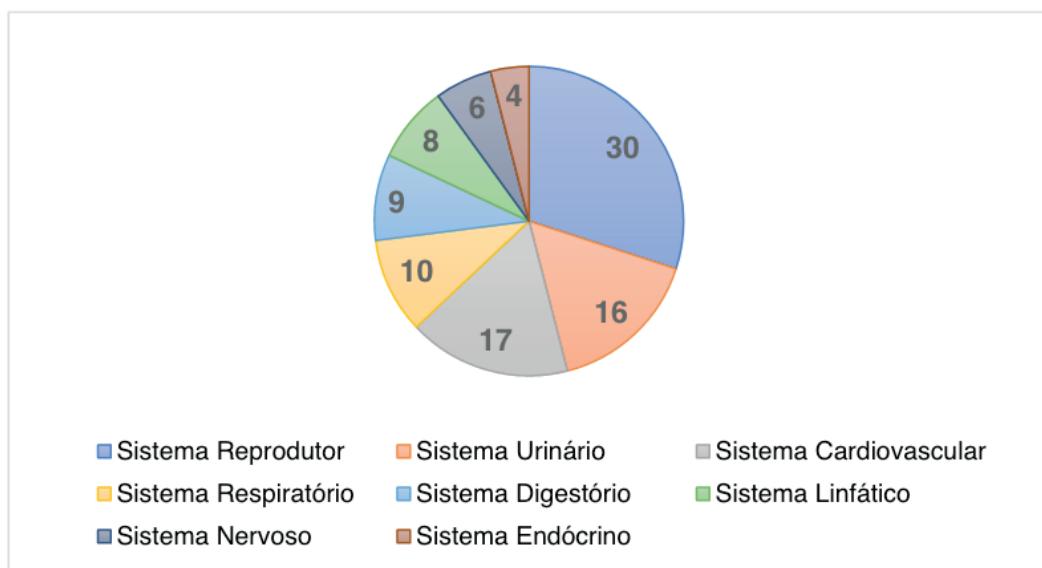


Figura 1. Distribuição em porcentagem, das lâminas histológicas produzidas para cada sistema.

O uso da tecnologia na educação tem sido estudado e apontado como uma ferramenta importante para o processo de ensino e aprendizagem, embora os métodos tradicionais no estudo da histologia não devem ser substituídos por ela (REZENDE, 2002). Para a elaboração do Atlas Virtual de Histologia, já disponível no site da UESC (<http://www.uesc.br/projetos/atlas-histologia/>), as lâminas produzidas foram fotomicrografadas e legendadas, incluindo as principais estruturas a serem visualizadas. Atualmente, o atlas contém diversas imagens (Fig. 2) que abrangem 9 sistemas do organismo e um vídeo sobre os principais componentes do microscópio de luz e o manuseio correto deste, como um recurso didático adicional. Além disto, com o propósito de incentivar a participação dos alunos de graduação, um espaço para a inclusão de imagens obtidas por eles durante as aulas práticas foi disponibilizado no atlas.

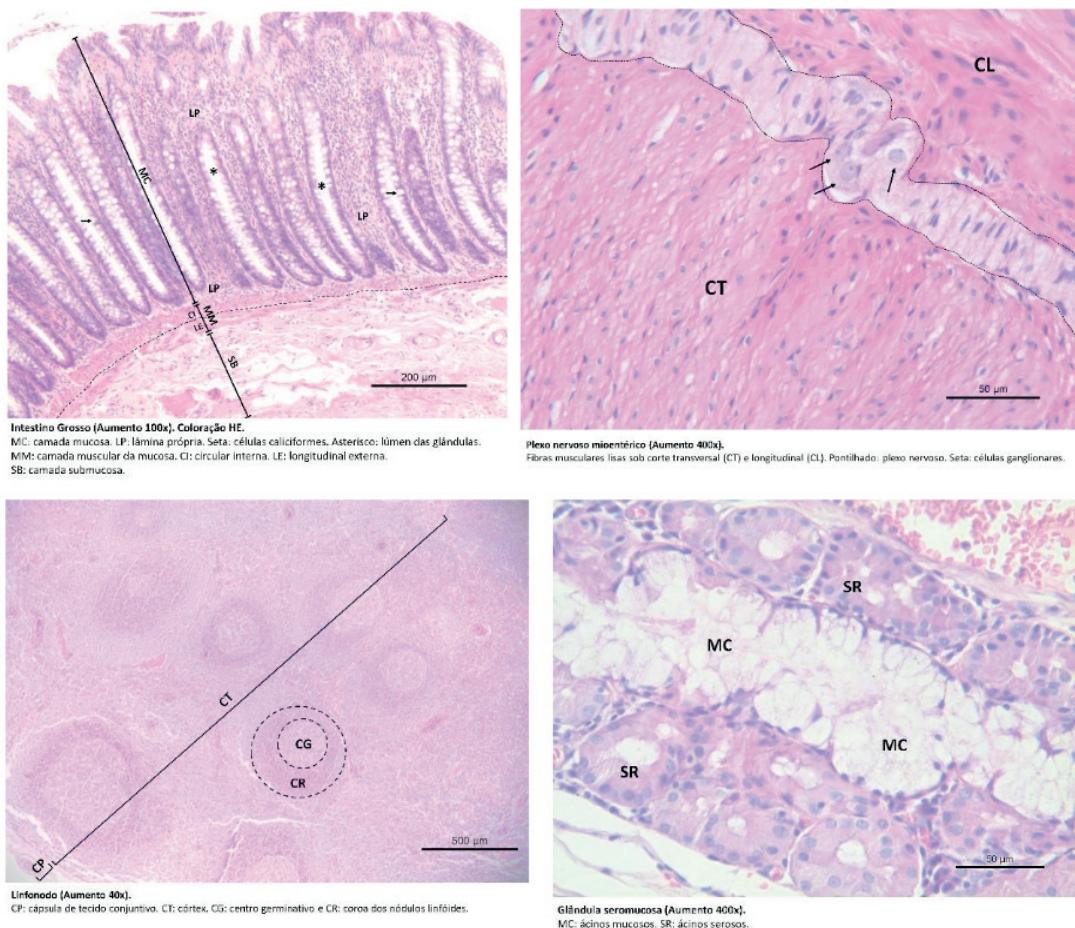


Figura 2. Fotomicrografias representativas do Atlas Virtual de Histologia da UESC, obtidas a partir das lâminas histológicas produzidas.

## 4 | CONCLUSÕES

A análise de lâminas histológicas nas aulas práticas de histologia, em estudos extra-classe e nas monitorias, representa uma importante ferramenta para o processo de ensino-aprendizagem. A produção própria de lâminas histológicas contribui de forma expressiva para a manutenção do acervo histológico, bem como, para o treinamento técnico-científico de bolsistas e o envolvimento de alunos neste processo. Adicionalmente, sendo livre o acesso ao Atlas Virtual de Histologia, um número maior de usuários pode se beneficiar deste recurso didático.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de apoio ao ensino de graduação (PAEG) da UESC, pelo apoio financeiro concedido para a realização do projeto de ensino.

## REFERÊNCIAS

ASKEW, D. S.; HEFFELFINGER, S. **Graduate education in microscopic anatomy.** The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists. v. 253, n. 5, p. 143–146,

1998.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976, 256p.

BOTTI, S. H. O.; REGO, S. **O processo ensino-aprendizagem na residência médica**. Rev. Bras. Educ. Méd. v.34, n.1, p.132-140, 2010.

BOUTONNAT, J.; PAULIN, C.; FAURE, C.; COLLE, P. E., RONOT, X.; SEIGNEURIN, D. **A pilot study in two French medical schools for teaching histology using virtual microscopy**. Morphologie. V.90, n. 288, p.21-25, 2006.

HEIDGER, P. M.; DEE, F. JR; CONSOER, D.; LEAVEN, T., DUNCAN, J.; KREITER, C. **Integrated approach to teaching and testing in histology with real and virtual imaging**. The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists, v. 269, n. 2, p. 107–112, 2002.

LIMA, C. O.; SANTOS, E. F. de; S., GALIZA, L. E., ALENCAR, E. T. L., MACÊDO, L. M.; FONTELES, A. S. **Análise da importância das aulas práticas de histologia no processo de ensino-aprendizagem dos acadêmicos de medicina**. In: 3º. ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DA UFC NO CARIRI, 2011. Universidade Federal do Ceará, Campus Cariri, Anais...Juazeiro do Norte-CE. 2011, p.1-4.

REZENDE, F. **As novas tecnologias na prática pedagógica sob a perspectiva construtivista**. Ens. Pesqui. Educ. Ciênc. (Belo Horizonte), Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 70-87, 2000.

SANTA-ROSA, J.G.; STRUCHINERII, M. **Tecnologia educacional no contexto do ensino de histologia: pesquisa e desenvolvimento de um ambiente virtual de ensino e aprendizagem**. Rev. bras. educ. med., Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 289-298, 2011.

## SINDROMES HIPERTENSIVAS NA GRAVIDEZ

Data de aceite: 12/12/2019

### **Ana Patrícia Fonseca Coelho Galvão**

Faculdade Pitágoras São Luís, Departamento de  
Enfermagem.  
São Luís-MA.

### **Benedita Célia Leão Gomes**

Instituto Florence de Ensino, Pós Graduação em  
Nefrologia.  
São Luís-MA.

### **Joelma de Jesus Oliveira**

Instituto Florence de Ensino, Pós Graduação em  
Auditoria.  
São Luís-MA.

### **Keile de Kassia de Oliveira Mendes**

Faculdade Pitágoras São Luís, Departamento de  
Enfermagem.  
São Luís-MA.

Virtual de Saúde em sites como Scielo e Llacs, onde encontrou-se 10publicações para compor o artigo em sua íntegra. As repercussões perinatais mais destacadas neste estudo foram: deslocamento prematuro da placenta, Hemorragia intra e periventricular no recém-nascido pré-termo, pneumotórax, deficiências na respiração do RN pré-termo, morte materna pneumotórax, deficiências na respiração do RN pré-termo, enterocolite, e outras elevadas complicações fetais. Concluiu-se que o estudo veio agregar informações valiosas para os profissionais de saúde no que tange à atenção sobre os vários aspectos SHEG contribuindo para a minimização das repercussões perinatais advindas da doença no processo gestacional.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndromes hipertensivas. Gestação. Complicações perinatais.

**RESUMO:** As síndromes hipertensivas específicas da gravidez se constituem em um evento bastante comum apesar de ser um problema que traz sérias e graves consequências para a mãe e para o bebê. Neste estudo o tema tem seu objetivo voltado para destacar as repercussões perinatais mais comuns detectadas em mulheres portadoras de SHEG por meio de uma revisão de literatura. Trata-se de uma revisão de literatura cuja coleta dos dados deu-se nas Bases de Dados da Biblioteca

**ABSTRACT:** Pregnancy-specific hypertensive syndromes are a very common event despite being a problem that has serious and serious consequences for both mother and baby. In this study the theme aims to highlight the most common perinatal repercussions detected in women with SHEG through a literature review. This is a literature review whose data collection took place in the Virtual Health Library Databases on sites such as Scielo and Llacs, where 10 publications were found to compose the full article. The most prominent

perinatal repercussions in this study were: premature placental displacement, intra and periventricular haemorrhage in preterm infants, pneumothorax, preterm NB respiration, maternal pneumothorax death, preterm NB respiration, enterocolitis, and other elevated fetal complications. It was concluded that the study added valuable information to health professionals regarding the attention on the various SHEG aspects contributing to the minimization of perinatal repercussions arising from the disease in the gestational process.

**KEYWORDS:** Hypertensive syndromes. Pregnancy. Perinatal complications.

## 1 | INTRODUÇÃO

A gravidez é um dos momentos que dão à mulher sensações diversas que vão desde sentimentos de alegria perpassando por dúvidas e receios com a gestação e o parto. Apesar de ser um evento comum na vida da maioria das mulheres, o processo de gestação pode apresentar problemas sérios e/ou graves como quadros de hipertensão chamados de síndromes hipertensivas específicas da gestação (SHEG).

As síndromes hipertensivas deixam as gestantes mais vulneráveis a agravos tanto para a saúde materna quanto para o bebê, e quando isso acontece, denomina-se gestação de alto risco. Segundo o Ministério da Saúde, a gestação de risco refere-se “àquela na qual a vida ou a saúde da mãe e/ou do feto e/ou do recém-nascido têm maiores chances de serem atingidas que as da média da população considerada”. Esse tipo de gestação representa cerca de 15% do total de mulheres (BRASIL, 2010).

São comuns para a gestação de alto risco, e caracteriza-se por quadros de Hipertensão na mulher, sendo uma das doenças que oferecem mais perigo para as mulheres nesse estado.

Caracteriza-se pela presença de pressão arterial diastólica de 90mmhg ou mais, em duas tomadas, com intervalo de no mínimo 4 horas, ou pela presença de pressão arterial diastólica de 110mmhg em uma única tomada ou na presença de aumento pressórico de 30mmhg na pressão arterial sistólica e 15mmhg na pressão arterial diastólica, após a 20<sup>a</sup> semana, nas gestantes com níveis tensionais muito baixos (80x50mmhg) (DE MORAES, 2012).

Diante de um quadro de síndrome hipertensiva os profissionais de saúde ter conhecimento teórico e prático para atender de forma correta e precisa, a gestante no momento em que esta procura atendimento, sendo o enfermeiro, o profissional que assiste a gestante no primeiro momento e também, durante toda a permanência desta mulher no hospital, de forma a minimizar seu quadro de hipertensão e assim contribuir para a continuidade da gestação normalizada.

Alertamos para o diagnóstico preciso e precoce já que a demora na assistência

contribui para o aparecimento de complicações sérias como insuficiência renal aguda, edema agudo de pulmão ou ruptura hepática, levando ao óbito. Com essas características a gestante deve ser acompanhada com vigilância permanente observando-se a variação pressórica.

A justificativa para discorrer sobre o tema fundamentou-se em alguns aspectos considerados cruciais como as complicações da necessidade de se conhecer as repercussões perinatais decorrentes.

A hipótese que se levanta sobre um problema grave para a mulher grávida, faz-se necessário conhecer as complicações trazidas pela doença, cabendo ao enfermeiro na área de obstetrícia, ter conhecimento dessas complicações, e esteja habilitado para oferecer uma assistência de qualidade com segurança contribuindo para reduzir os índices de mortalidade materna e fetal decorrentes da doença.

## 2 | METODOLOGIA

O método escolhido para abordar o tema foi a revisão bibliográfica, sendo o estudo do tipo exploratório, descritivo, narrativo, com base no levantamento de dados na literatura vigente.

O estudo foi realizado no período de abril a junho de 2019, perpassando-se as etapas da revisão de literatura que compreende: identificação do problema, elaboração da pergunta norteadora, estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão, coleta de dados em bases científicas, seleção de artigos, análise e interpretação dos dados.

A coleta dos dados será feita em publicações selecionadas nas bases de dados da biblioteca virtual de Saúde (BVS) em sites como SciELO Brasil - (*Scientific Electronic Library Online*), e *Lilacs*.

Os critérios para a seleção dos dados foram publicações datadas dos últimos dez anos, em língua portuguesa, cujo conteúdo estava de acordo com o assunto a ser abordado. Os critérios de exclusão deram-se entre as publicações que estejam fora do que foi estipulado para o estudo como ano de publicação com mais de dez anos, conteúdos repetidos e aquelas cujo conteúdo não contemplarem os objetivos do estudo.

A seleção da amostra foi realizada por meio de descritores constantes no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde): síndromes hipertensivas, gestação, complicações perinatais.

Foram encontradas primeiramente 84 publicações dentre artigos, monografias e periódicos sobre o tema na internet. Após leitura dos resumos, selecionou-se 08 publicações que continham em seu conteúdo aspectos das síndromes hipertensivas relacionados às repercussões perinatais mais comuns em gestantes, descritas em publicações científicas.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as repercussões perinatais este estudo destacou cinco estudos que abordavam em seu conteúdo sobre crescimento intrauterino (CIUR), infecção neonatal e síndrome da aspiração meconial, prematuridade, Hemorragia intra e periventricular, presença de pneumotórax, e outros (Tabela 3).

Autor/Ano	Título	Base de Dados	Tipo de estudo
<b>Gomes, NR, Gardhenghi, G, 2013</b>	Prevalência de complicações maternas e neonatais em gestações que apresentaram síndromes hipertensivas	Scielo	Estudo de campo
<b>Oliveira ACM, et al 2015</b>	Fatores maternos e resultados perinatais adversos em portadoras de pré-eclâmpsia em Maceió-Alagoas	Scielo	Estudo de campo
<b>Santos EMF, et al, 2012</b>	Perfil de risco gestacional e metabólico no serviço de pré-natal de maternidade pública do Nordeste do Brasil	Scielo	Estudo de campo, quantitativo e qualitativo.
<b>Morais, FM, et al., 2013</b>	Uma revisão do perfil clínico-epidemiológico e das repercussões perinatais em portadoras de síndrome hipertensiva gestacional	Scielo	Revisão integrativa de literatura
<b>Zanatelli C, et al, 2016</b>	Síndromes hipertensivas na gestação: estratégias para a redução da mortalidade materna.	Scielo	Revisão bibliográfica.
<b>Guimarães et al, 2009</b>	Alterações histopatológicas em placenta humanas relacionadas às síndromes hipertensivas.	Scielo	Revisão de literatura
<b>De Moraes et al., 2012</b>	Distúrbio hipertensivo gestacional. A importância do pré-natal na prevenção, evolução e danos renais atribuídos a pré-eclâmpsia.	Lilacs	Revisão de literatura
<b>Rolim et al., 2014</b>	Agravos à saúde do recém-nascido. Relacionados à doença hipertensiva da gravidez: conhecimento da enfermeira.	Scielo	Estudo de campo, qualitativo

Tabela 1 - Demonstrativo dos artigos selecionados referentes as repercussões perinatais decorrentes da Síndrome hipertensiva.

O crescimento intrauterino restrito (CIUR) e o descolamento prematuro de placenta (DPP) destaca-se em quadros de hipertensão gestacional, em cerca de 1/20 casos, enquanto nas gestantes normotensas em apenas em 1/130. A DPP é ocasionada pela hipertensão gestacional promovendo lesões nos vasos ocasionando roturas intra e extra-vasculares, com exsudatos sanguíneos na placenta contribuindo para o aparecimento de infartos hemorrágicos na crise de eclampsia (GOMES; GARDHENGHI, 2012).

O descolamento prematuro da placenta também foi destacado como uma das complicações causadas por distúrbios hipertensivos da gestação no estudo de

Guimarães et al (2009). A oclusão parcial ou total dos vasos placentários é a causa do estado hipoxêmico placentário e é a base desta complicaçāo gestacional.

Bebês prematuros foram evidenciados em um estudo realizado em uma maternidade pública do Rio de Janeiro onde houve o maior risco de nascimento de RN PIG, infecção neonatal e síndrome da aspiração meconial. Houveram elevadas frequências de desvios de peso ao nascer e da via de parto cesariana. No mesmo estudo, ao estudarem as repercussões perinatais de mulheres que tiveram o parto na Maternidade Escola da Universidade do Rio de Janeiro, encontraram um maior risco para Apgar baixo no 1º e no 5º minuto nas mulheres com diagnóstico de PE (OLIVEIRA et al., 2016)

Corroborando com esse resultado estudos de Santos et al (2012) encontraram como repercussões perinatais bebês prematuros com peso bem abaixo do esperado. Ainda nesse mesmo estudo os resultados materno-fetais da SHEG incluíram PE (4,5%), DMG (3,4%), prematuridade (4,4%) e partos cesarianos (40,1%). Como repercussões perinatais no recém-nascido, foram encontrados RNs grandes para a idade gestacional (GIG) e pequenos para a idade gestacional (PIG).

A Hemorragia intra e periventricular no recém-nascido pré-termo, tem incidência de 20% a 45%, sendo uma das complicações perinatais, classificada como grave com possíveis repercussões neurológicas. As lesões podem evoluir para paralisia cerebral, déficit intelectual e desordem apoplética que tem repercussões por toda a vida do indivíduo (MORAES et al., 2013).

Ainda segundo Morais et al (2013) foram observadas presença de pneumotórax, deficiências na respiração do RN pré-termo que são apontados como importante repercussão perinatal em casos de SHEG. Desfechos desfavoráveis como morte materna e elevada taxa de morbimortalidade perinatal, assim como a insuficiência útero-placentária com repercussões cruciais sobre o conceito, estão as complicações fetais destacam crescimento restrito, prematuridade e mortalidade fetal e neonatal.

Neonatos que nascem de mães com quadro de SHEG são mais vulneráveis a doenças associadas à prematuridade, como: síndrome da angústia respiratória, hemorragia intraventricular e enterocolite necrotizante, sendo que a evolução do quadro para piores resultados perinatais, associa-se à gravidade da hipertensão estacional (ZANATELLI et al, 2016).

Os vasos placentários podem ser afetados pela necrose, hialinização da parede vascular e ocluídos por macrófagos, geralmente presentes quando a pressão sanguínea materna está elevada, caracterizando a aterose, há o risco de infartos, coágulos, hematomas, menor peso e volume placentário, vistos como problemas sérios decorrentes da SHEG (DEZ MORAES et al 2012).

Complicações foram encontradas na pesquisa de Rolim et al (2014), havendo prevalência de complicações pós parto nos recém nascidos, onde observaram que

as mães desses bebês foram acometidas por quadros e hipertensão durante a gestação, associadas a redução do fluxo uteroplacentário ou do infarto, crescimento uterino restrito, muitos desses bebês apresentaram asfixia ao nascimento, síndrome de aspiração e neurodesenvolvimento deficiente.

## 4 | CONCLUSÃO

O estudo trouxe melhor entendimento sobre as síndromes hipertensivas específicas da gestação onde foi possível entender que esta é uma doença frequente na clínica obstétrica, sendo sua compreensão, de grande importância, para os profissionais da área de obstetrícia, haja vista que a patologia traz repercussões e/ou desfechos negativos para a mãe e o bebê.

As repercussões perinatais mais destacadas neste estudo referiram-se a:deslocamento prematuro da placenta, hemorragia intra e periventricular no recém-nascido pré-termo, pneumotórax, deficiências na respiração do RN pré-termo, morte materna pneumotórax, deficiências na respiração do RN pré-termo, enterocolite, e outras elevadas complicações fetais.

Concluiu-se que o estudo veio agregar informações valiosas para os profissionais de saúde no que tange à atenção sobre os vários aspectos SHEG contribuindo para a minimização das repercussões perinatais advindas da doença no processo gestacional.

## REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de alto risco**: manual técnico. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. 5. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

DE MORAES, CAet al., Distúrbio hipertensivo gestacional. A importância do pré-natal na prevenção, evolução e danos renais atribuídos a pré-eclampsia. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúdem**, v. 16, n. 1, 2012.

GOMES, NR; GARDENGHI, G. Prevalência de complicações maternas e neonatais em gestações que apresentaram síndromes hipertensivas. **Revista Eletrônica Saúde e Ciência RESC. 03.v.3, n.1, jan., jun, 2013.**

GUIMARÃES, L. et al. Alterações histopatológicas em placenta humanas relacionadas às síndromes hipertensivas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.31, n.1, 2009.

MORAIS FMet al. Uma revisão do perfil clínico-epidemiológico e das repercussões perinatais em portadoras de síndrome hipertensiva gestacional. **Revista EIXO**, Brasília, DF, v. 2, n. 1, jan./jun. 2013.

NEME B. Doença hipertensiva específica da gestação: pré-eclâmpsia e eclampsia. **Obstetrícia básica** 3. Ed. São Paulo, Sarvier, 2009.

OLIVEIRA, ACM de et al. Fatores Maternos e Resultados Perinatais Adversos em Portadoras de Pré-

eclâmpsia em Maceió, Alagoas. **Arq Bras Cardiol.** v 1, n 50, 2015.

ROLIM, KC, et al. Agravos à saúde do recém-nascido relacionados à doença hipertensiva da gravidez: conhecimento da enfermeira. **Rev Enferm Atenção Saúdev.** 3, n.2, jul/dez 2014.

SANTOS, EMF et al. Perfil de risco gestacional e metabólico no serviço de pré-natal de maternidade pública do Nordeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 34, n. 3, 2012.

ZANATELLI C, et al. Síndromes hipertensivas na gestação: estratégias para a redução da mortalidade materna. **Revista Saúde integrada.** v. 9, n. 17, 2016.

## TOXICOLOGIA ORAL AGUDA DE *Bacillus thuringiensis* EM RATOS WISTAR

Data de aceite: 12/12/2019

### **Shana Letícia Felice Wiest**

PPG - Biologia, UNISINOS, Av. Unisinos, 950,  
São Leopoldo, RS, CEP: 93022-000

### **Harry Luiz Pilz Júnior**

ICBS - Departamento de Parasitologia, UFRGS,  
Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP  
90050-170

### **Natascha Horn**

PPG - Biologia, UNISINOS, Av. Unisinos, 950,  
São Leopoldo, RS CEP: 93022-000

### **Diouneia Lisiane Berlitz**

DLB Soluções Biológicas. R. Heitor Arlindo Berg,  
nº 1158, Rolante, RS. Cep 95690-000

### **Lidia Mariana Fiuza**

ICB BIOAGRITEC LTDA. Rua Arabutã, nº 386,  
Navegantes, Porto Alegre, RS. Cep 90240-470.

Email: fiuzalm@gmail.com

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito toxicológico, *in vivo*, de duas novas cepas de *Bacillus thuringiensis* (MTox 2638-1 e MTox 2974-11) em ratos, via oral. Os ratos Wistar machos foram tratados com a suspensão bacteriana, o sobrenadante e as proteínas sintetizadas pelas cepas, assim como o controle com *BTh Thuricide* 63, nos intervalos: 0; 24; 48h. Utilizou-se 5 ratos/tratamento, individualizados, com livre acesso à ração e água. Após 48h da aplicação dos tratamentos (HAT), os animais

foram eutanasiados e o conteúdo estomacal e estômagos coletados para observação em estereomicroscópio. As fezes foram coletadas em 24 e 48 HAT e as amostras foram analisadas em eletroforese, em gel de poliacrilamida a 10%. Foi avaliada a presença de esporos de *B. thuringiensis* no trato gastrointestinal, cada animal foi pesado no início e no final dos tratamentos e avaliou-se o consumo de ração e água. Os resultados mostraram que nenhum dos tratamentos foi tóxico, sendo que os ratos não apresentaram sintomas de intoxicação ou alterações morfológicas nos estômagos. Não foram observadas diferenças significativas na perda ou no ganho de peso, bem como no consumo de água entre o grupo controle e os tratamentos. O consumo de ração variou significativamente apenas entre os ratos tratados com MTox 2638-1. A eletroforese SDS-PAGE revelou proteínas Cry nas amostras, e também foram observados esporos bacterianos no trato gastrointestinal e nas fezes dos animais. Assim, em ensaios de administração oral aguda, as cepas de *B. thuringiensis* avaliadas mostraram-se inócuas a esse grupo de vertebrados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biopesticidas, mamíferos, toxicidade, gastrointestinal.

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the *in vivo* toxicological effect of two new strains of *Bacillus thuringiensis* (MTox

2638-1 and MTox 2974-11) in rats orally. Male Wistar rats were treated with the bacterial suspension, supernatant and protein synthesized by the strains, as well as the BTh Thuricide 63 control at the intervals: 0; 24; 48h Five individualized rats / treatment with free access to feed and water were used. After 48h of the application of the treatments (HAT), the animals were euthanized and the stomach contents and stomachs collected for observation in stereomicroscope. The feces were collected at 24 and 48 HAT and the samples were analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE 10%. The presence of *B. thuringiensis* spores in the gastrointestinal tract was evaluated, each animal was weighed at the beginning and at the end of the treatments and the feed and water consumption were evaluated. The results showed that none of the treatments was toxic, and the rats showed no symptoms of intoxication or morphological changes in their stomachs. No significant differences were observed in weight loss or gain, as well as in water consumption between the control group and the treatments. Feed intake varied significantly only among rats treated with MTox 2638-1. SDS-PAGE electrophoresis revealed Cry proteins in the samples, and bacterial spores were also observed in the gastrointestinal tract and animal feces. Thus, in acute oral administration assays, the *B. thuringiensis* strains evaluated were safe to this vertebrate group.

**KEYWORDS:** Biopesticides, mammals, toxicity, gastrointestinal.

## 1 | INTRODUÇÃO

A característica entomopatogênica atribuída às cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) (*Bt*) está associada a sua capacidade de produzir proteínas que são altamente tóxicas e eficazes contra diversas ordens de insetos, considerados pragas agrícolas ou florestais, ou ainda vetores de doenças de grande relevância sanitária como a dengue e a malária (BERLITZ et al., 2012; BRAVO et al., 2012; CAMPANINI et al., 2012; PARDO-LÓPEZ et al., 2013). Com alta especificidade de hospedeiros, as proteínas tóxicas de *B. thuringiensis*, juntamente com seus esporos, são empregadas no combate das fases larvais de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga e também no controle de nematoides, platelmintos e protozoários (BRAVO et al., 2012; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

Para diminuir os impactos causados por esses insetos, a bactéria *B. thuringiensis* é amplamente utilizada na formulação de biopesticidas e no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que expressam os genes sintetizadores de suas proteínas tóxicas (GOUFFON et al., 2011; SHARMA et al., 2010). O grupo mais bem estudado e utilizado de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* é o das δ-endotoxinas, que compreende duas famílias multigênicas de inclusões cristalinas paraesporais: as proteínas cristais (Cry), que exibem efeito tóxico para organismos alvo e na forma inativa apresentam massa molecular entre 130 e 140 kDa, e as

toxinas citolíticas (Cyt), que apresentam atividade hemolítica (SOBERÓN et al., 2010). A maioria das δ-endotoxinas é sintetizada durante a fase de esporulação por genes localizados em plasmídeos auto transmissíveis (SANAHUJA et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

No entanto, algumas subespécies de *B. thuringiensis* são capazes de sintetizar thuringiensinas, também conhecidas como β-exotoxinas, que são toxinas não proteicas, com baixo peso molecular (701 Da), produzidas durante a fase vegetativa e secretadas no meio de cultura onde a bactéria estiver inoculada (OBEIDAT et al., 2012). Análogas ao nucleotídeo adenina, as β-exotoxinas inibem a RNA polimerase através da competição com ATP, bloqueando a ação de nucleases, impedindo a biossíntese de RNA e prejudicando a formação do fuso mitótico, afetando etapas críticas da metamorfose e, assim, apresentam amplo espectro de toxicidade não específica (BELDER & ELDERSON, 2010; OBEIDAT et al., 2012). Devido à sua toxicidade a vertebrados, especialmente no que se refere aos efeitos teratogênicos e mutagênicos em mamíferos, desde 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que as cepas de *B. thuringiensis* que produzem β-exotoxinas não devem ser usadas no controle de insetos (CORRÊA, 2012; DE MACEDO, 2012).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito toxicológico, *in vivo*, de duas novas cepas de *B. thuringiensis* em ratos *Wistar*, através da verificação de dose-efeito, com ensaios de administração via oral.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), que possui constituição, deveres e responsabilidades regidos pela Lei nº 11.794, de 2008. Todas as práticas foram realizadas de acordo com a Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) (BRASIL, 2008); a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos; as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA e a Resolução Unisinos 04/2013. Os experimentos foram realizados na Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.

As duas novas cepas de *B. thuringiensis* (MTox 2974-11 e MTox 2638-1) foram obtidas da Coleção do Grupo de MTAgro (CNPq/IRGA). Como controle positivo, foi utilizada a cepa *BTh Thuricide 63* (*B. thuringiensis thuringiensis*) correspondente ao produto *Thuricide®*, fornecido pelo *International Entomopathogenic Bacillus Centre* (IEBC), do Instituto Pasteur, Paris, França. O crescimento bacteriano foi realizado em meio usual glicosado líquido (DE BARJAC & LECADET, 1976). As suspensões bacterianas foram diluídas em tampão PBS de fosfato de sódio. Os sobrenadantes das culturas de cada cepa foram autoclavados a 121°C, durante 20 minutos, conforme

descrito por Liu et al. (2014), para que fossem mantidas apenas as  $\beta$ -exotoxinas, quando sintetizadas. A semipurificação das proteínas foi realizada através de uma série de lavagens das suspensões bacterianas em tampão fosfato e tampão fosfato suplementado com NaCl. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Foram utilizados 50 ratos machos adultos, da linhagem *Wistar*, com idade variando entre 80 a 115 dias, obtidos no biotério da Unisinos. Os animais foram mantidos individualizados, em caixas de polipropileno, com livre acesso à água e comida, em condições controladas de 21° C e fotoperíodo de 12 h.

Os ratos *Wistar* receberam os seguintes tratamentos: T1 (suspensão da cepa MTox 2974-11); T2 (suspensão da cepa MTox 2638-1); T3 (suspensão da cepa *BTh Thuricide* 63); T4 (sobrenadante da cepa MTox 2974-11); T5 (sobrenadante da cepa MTox 2638-1); T6 (sobrenadante da cepa *BTh Thuricide* 63); T7 (proteína semipurificada da cepa MTox 2974-11); T8 (proteína semipurificada da cepa MTox 2638-1); T9 (proteína semipurificada da cepa *BTh Thuricide* 63); T10 (controle PBS de sódio pH 7,4). Cada tratamento foi composto por 5 animais, sendo a dose administrada equivalente a 25 mL/kg. Todos os tratamentos tiveram um volume final de 400  $\mu$ L, sendo diluídos em PBS de sódio (pH 7,4). A administração desses tratamentos foi via intragástrica, nos tempos de 0, 12 e 24 horas.

Foi realizada em 24 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT), a coleta das fezes total de cada animal. Os ratos foram sacrificados em 48 HAT, quando foi coletado o conteúdo estomacal e intestinal para análise do perfil proteico, juntamente com as fezes, em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE - 10%) (LAEMMLI, 1970). Os estômagos foram avaliados em estereomicroscopia (40x), conforme protocolo adaptado de Marroni et al. (1994). Cada animal foi pesado no início e no fim dos tratamentos. Também foi avaliado o consumo de ração e água pelos ratos, ao final dos tratamentos.

Para verificar a presença de esporos de *B. thuringiensis* no trato gastrointestinal dos ratos, o conteúdo estomacal, intestinal e as fezes coletadas dos animais foram homogeneizados em solução salina estéril e uma alíquota de 1000  $\mu$ L foi utilizada para o processo de pasteurização (12 min, a 80°C, e 5 min a 4° C), visando à seleção das bactérias esporulantes. Após foram realizadas diluições seriadas a 10<sup>-2</sup> e uma alíquota de 100  $\mu$ L foi semeada em Ágar Nutriente, em triplicatas e, incubados a 37° C, durante 24 h. As colônias crescidas foram isoladas em meio usual glicosado líquido, suplementado com penicilina, permanecendo em crescimento sob agitação (180 rpm), a 30°C, durante 24 h. As culturas bacterianas com crescimento positivo foram analisadas em microscopia de contraste de fase, para a identificação da presença de *B. thuringiensis*.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram a sobrevivência de todos os animais tratados oralmente com as suspensões, os sobrenadantes ou as proteínas das diferentes cepas de *B. thuringiensis*, bem como aqueles pertencentes ao grupo controle. Não foram observadas alterações comportamentais ou clínicas como tremores, convulsões e diarreia.

Na avaliação dos estômagos, em estereomicroscopia, com amplificação de 40 vezes, não foram observadas modificações morfológicas, como pipocas vermelhas ou raias hemorrágicas, descritas por Marroni et al. (1994), em nenhum dos tratamentos ou no grupo controle (Figura 1).

Resultados semelhantes foram observados por Bishop et al. (1999), que administraram nos ratos uma dose de  $1.10^{12}$  esporos/mL de *B. thuringiensis* por dia, durante três semanas, e também não encontraram sinais de infecção bacteriana, como vermelhidão no tecido estomacal, ou alterações comportamentais. Berlitz et al. (2012) realizaram experimentos com toxinas de *B. thuringiensis* administradas oralmente em camundongos e verificaram a ausência de sintomas como tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação ou perda de pelo. Berlitz et al. (2006) também não encontraram modificações macroscópicas nos estômagos de ratos tratados nos tempos de 0, 12 e 24 h com a suspensão bacteriana e o sobrenadante de *B. thuringiensis* var. *aizawai* e *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

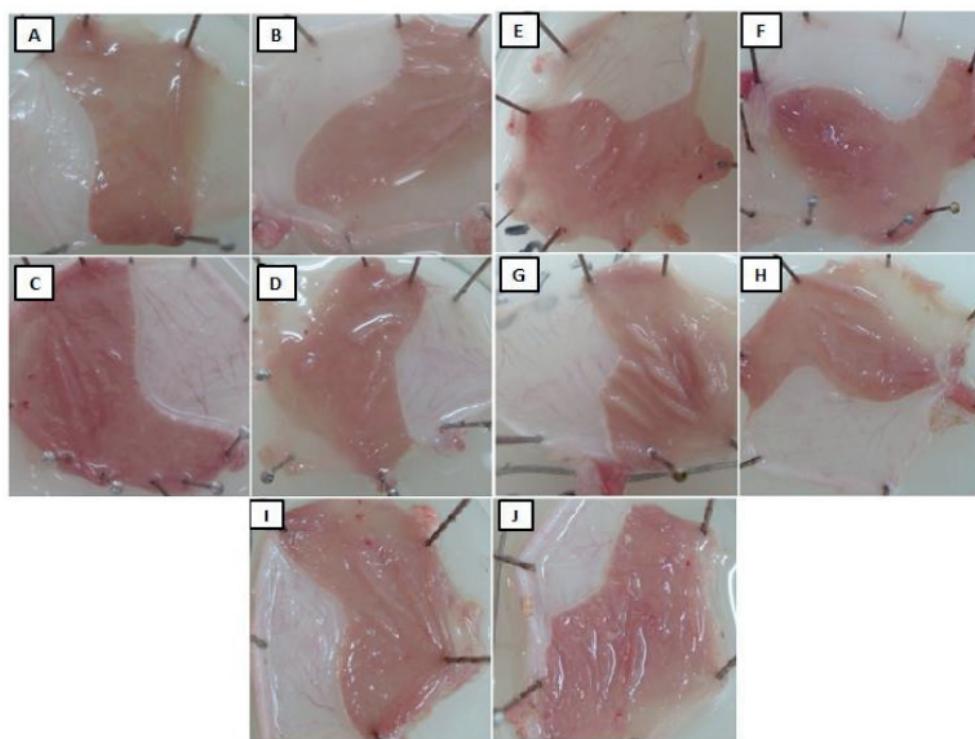


Figura 1. Estereomicroscopia (40x) dos estômagos de ratos tratados com: A - PBS de sódio (pH 7.4); B - suspensão da cepa MTox 2974-11; C - suspensão da cepa MTox 2638-1 e D - suspensão da cepa *BTh Thuricide* 63; E - sobrenadante da cultura de MTox 2974-11; F - sobrenadante da cultura de MTox 2638-1; G - sobrenadante da cultura de *BTh Thuricide* 63; H - proteínas semipurificadas de MTox 2974-11; I - proteínas semipurificadas de MTox 2638-1 e J - proteínas semipurificadas de *BTh Thuricide* 63.

Quanto ao peso dos ratos, foi observado que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $F = 1,583$ ;  $gl = 9,38$ ;  $p = 0,156$ ). Bishop et al. (1999) também indicaram que não houve diferença significativa no peso corporal dos ratos tratados com *B. thuringiensis* quando comparados com aqueles pertencentes ao grupo controle. Betz et al. (2000) citam 16 estudos de toxicidade oral aguda que foram realizados em ratos e coelhos e também não revelam mortalidades, alterações no peso corporal ou patologias, mesmo nos testes com a administração das doses mais altas de cepas *B. thuringiensis*.

Os dados relativos à alimentação dos animais, mostraram que não houve diferença significativa no consumo de ração entre os ratos tratados com a suspensão, o sobrenadante e a proteína semipurificada da cepa MTox 2974-11 ( $F = 1,002$ ;  $gl = 3,16$ ;  $p = 0,417$ ), em comparação com os ratos do grupo controle. Também não foi encontrada diferença significativa ( $F = 2,167$ ;  $gl = 3,16$ ;  $p = 0,132$ ) no consumo de ração entre os ratos que receberam os tratamentos da cepa *BTh Thuricide* 63, em comparação com os ratos do grupo controle.

Entretanto, constatou-se que o consumo médio de ração variou entre os ratos tratados com a suspensão, o sobrenadante e a proteína semipurificada da cepa MTox 2638-1 ( $H = 10,817$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,013$ ). Mais precisamente, foi possível verificar que houve diferença significativa no consumo de ração entre os ratos tratados com o sobrenadante e a proteína semipurificada de MTox 2638-1 ( $p = 0,043$ ) e entre os ratos tratados com o sobrenadante e a suspensão de MTox 2638-1 ( $p = 0,044$ ) (Figura 2).

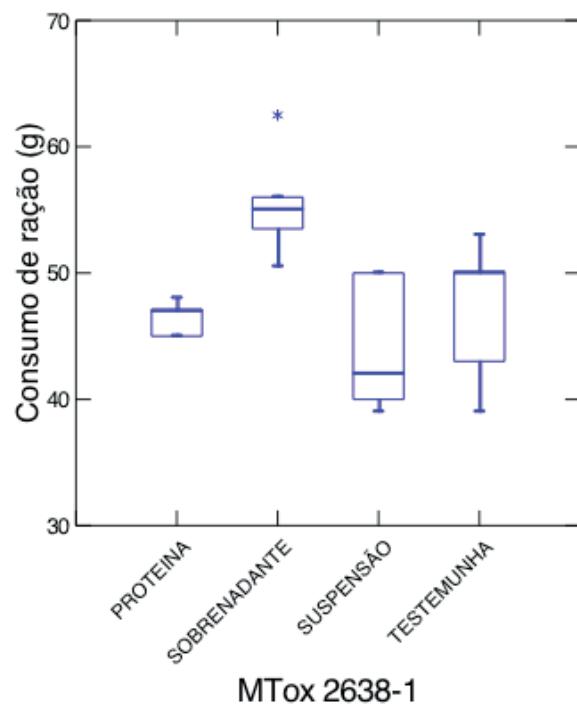


Figura 2. Consumo médio de ração (g) pelos ratos tratados com a suspensão, o sobrenadante e a proteína semipurificada da cepa MTox 2638-1 e com tampão PBS de sódio (testemunha) ( $H = 10,817$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,013$ ).

Quanto ao consumo de água, não foi observada diferença significativa entre os ratos tratados que receberam os tratamentos da cepa MTox 2974-11 ( $F = 0,997$ ;  $gl = 3,16$ ;  $p = 0,419$ ), bem como da cepa MTox 2638-1 ( $F = 1,653$ ;  $gl = 3,16$ ;  $p = 0,217$ ) e da cepa *BTh Thuricide 63* ( $F = 0,981$ ;  $gl = 3,16$ ;  $p = 0,426$ ). Em média geral, os ratos consumiram aproximadamente 47 g de ração e 90 mL de água durante as 48 h de tratamento.

Na análise do perfil proteico, observou-se que a amostra da suspensão da cepa MTox 2974-11 apresentou bandas de aproximadamente 200, 130, 100, e 55 kDa, enquanto na amostra com as proteínas semipurificadas nota-se uma banda majoritária de cerca de 130 kDa. Por outro lado, a suspensão da cepa MTox 2638-1 apresentou peptídeos com aproximadamente 210, 130, 70 e 60 kDa e a amostra contendo as proteínas semipurificadas bandas de 120, 60 e 50 kDa. Por fim, a amostra da suspensão da cepa *BTh Thuricide 63* apresentou bandas de 200, 130, 80, 60 e 50 kDa e a amostra das proteínas semipurificadas apresentou uma banda de aproximadamente 130 kDa. Nas amostras contendo os sobrenadantes das cepas, não foram visualizadas bandas (Figura 3).

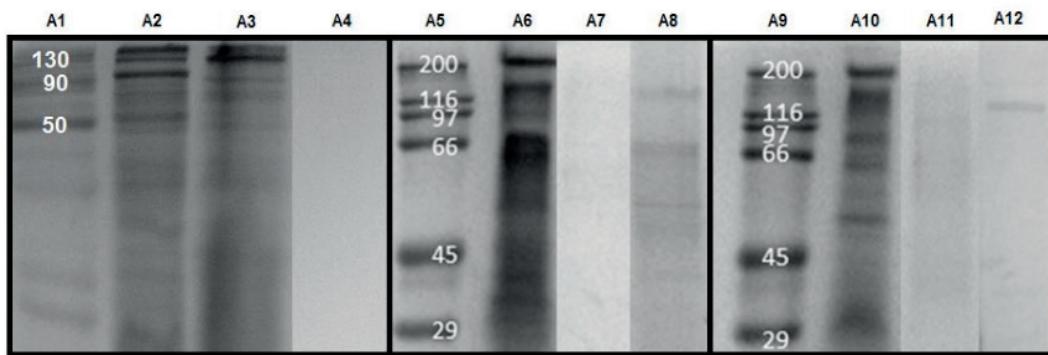


Figura 3. Perfil proteico dos tratamentos administrados oralmente nos ratos *Wistar* onde:  
 A1 - marcador de peso molecular (BenchMark – Protein Ladder - Life Technologies®);  
 A2 – suspensão de MTox 2974-11; A3 – proteínas semipurificadas de MTox 2974-11; A4 – sobrenadante de MTox 2974-11; A5 - marcador de peso molecular (MSDS 6H2 – Sigma Aldrich®); A6 - suspensão de MTox 2638-1; A7 - sobrenadante de MTox 2638-1; A8 - proteínas semipurificadas de MTox 2638-1; A9 - marcador de peso molecular (MSDS 6H2 – Sigma Aldrich®); A10 - suspensão de *BTh Thuricide 63*; A11 - sobrenadante de *BTh Thuricide 63* e A12 - proteínas semipurificadas de *BTh Thuricide 63*.

Na análise do perfil proteico do conteúdo estomacal dos ratos do grupo controle (Figura 4A), tratados somente com PBS de sódio, é possível observar a presença de bandas com aproximadamente 130, 50 e 20 kDa (Figura 4, A2). Nas amostras de conteúdo intestinal, fezes 24 h e fezes 48 h, não foi possível a observação de bandas nítidas (Figura 4: A3, A4 e A5). Esse padrão de bandas encontrado provavelmente representa o perfil proteico presente naturalmente nesses tipos de amostras de ratos sadios. A presença de uma banda com 130 kDa, no conteúdo estomacal dos ratos controle, faz com que a observação de bandas com esse mesmo peso em amostras de conteúdo estomacal nos demais tratamentos não possa ser correlacionada com

a presença de proteínas Cry.

Nas amostras de conteúdo estomacal, conteúdo intestinal e fezes (24 e 48h), de ratos tratados com as suspensões bacterianas das cepas MTox 2974-11 (Figura 4B), MTox 2638-1 (Figura 4C) e *BTh Thuricide* (Figura 4D), foi observado um perfil de bandas bastante semelhante.

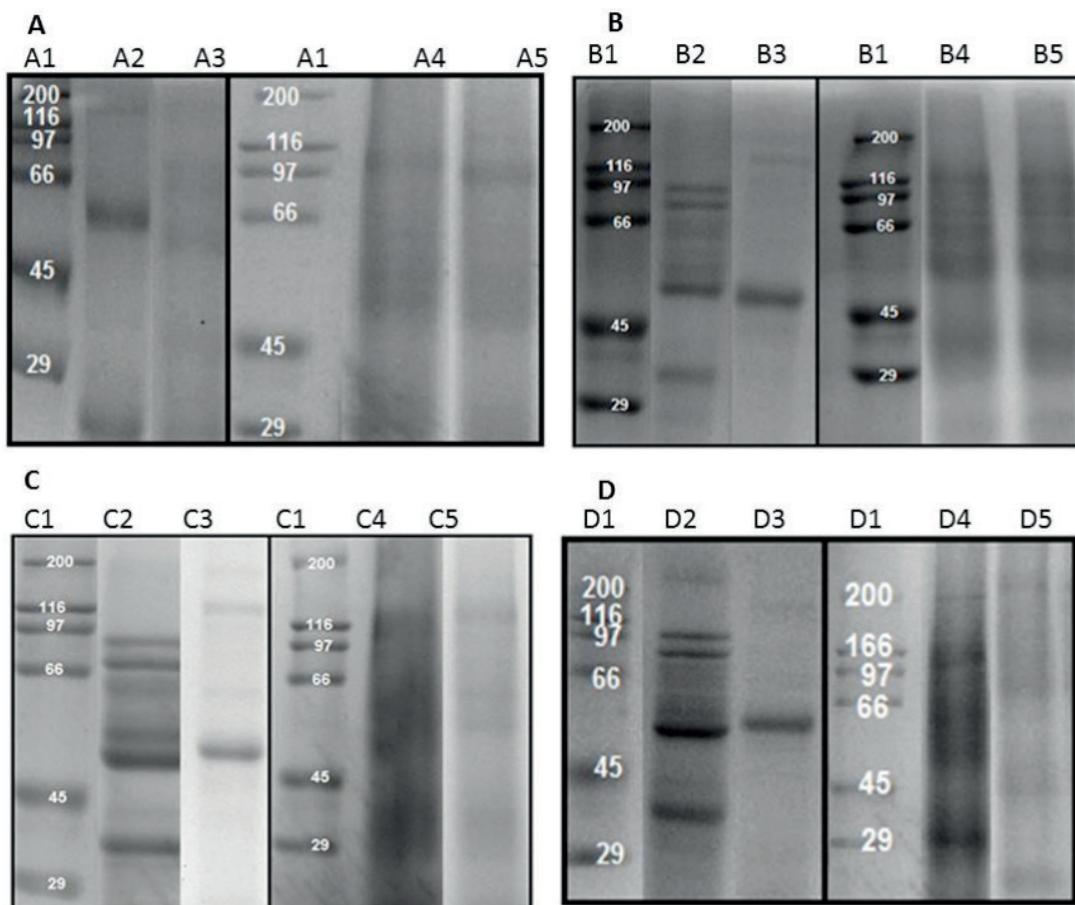


Figura 4. **A:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (A2); conteúdo intestinal (A3); fezes 24h (A4) e fezes 48h (A5) de ratos do grupo controle tratados com PBS de sódio. **B:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (B2); conteúdo intestinal (B3); fezes 24 h (B4) e fezes 48 h (B5) de ratos tratados com a suspensão bacteriana MTox 2974-11. **C:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (C2); conteúdo intestinal (C3); fezes 24 h (C4) e fezes 48 h (C5) de ratos tratados com a suspensão bacteriana MTox 2638-1. **D:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (D2); conteúdo intestinal (D3); fezes 24 h (D4) e fezes 48 h (D5) de ratos tratados com a suspensão bacteriana de *BTh Thuricide* 63. A1, B1, C1 e D1: marcador de peso molecular (MSDS 6H2 – Sigma Aldrich®).

Na análise das amostras de conteúdo estomacal, conteúdo intestinal e fezes (24 e 48 h), de ratos tratados com o sobrenadante das cepas MTox 2974-11 (Figura 5A), MTox 2638-1 (Figura 5B) e *BTh Thuricide* (Figura 5C), também pode ser observado um perfil de bandas com alta semelhança. Como no perfil proteico das amostras de sobrenadante das três cepas não havia sido constatada nenhuma banda, conforme a Figura 3, a presença de diversas bandas com menos de 90 kDa nas amostras de conteúdo estomacal, conteúdo intestinal e fezes (24 e 48 h), pode estar envolvida com a presença de proteínas na ração animal ingerida.

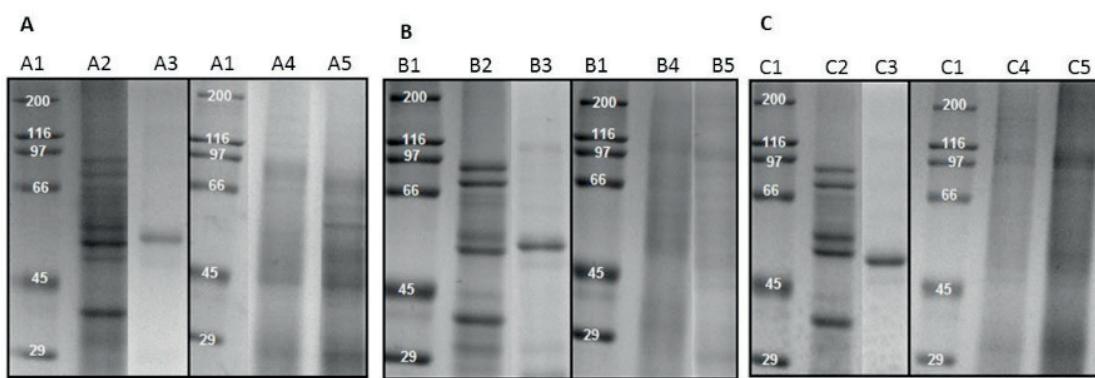


Figura 5. **A:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (A2); conteúdo intestinal (A3); fezes 24 h (A4) e fezes 48 h (A5) de ratos tratados com o sobrenadante de MTox 2974-11. **B:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (B2); conteúdo intestinal (B3); fezes 24 h (B4) e fezes 48 h (B5) de ratos tratados com o sobrenadante de MTox 2638-1. **C:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (C2); conteúdo intestinal (C3); fezes 24 h (C4) e fezes 48 h (C5) de ratos tratados com o sobrenadante da bacteriana de *BTh Thuricide* 63. A1, B1 e C1: marcador de peso molecular (MSDS 6H2 – Sigma Aldrich®).

Nas amostras de conteúdo estomacal, conteúdo intestinal e fezes (24 e 48h), de ratos tratados com as proteínas semipurificadas das cepas MTox 2974-11 (Figura 6A), MTox 2638-1 (Figura 6B) e *BTh Thuricide* (Figura 6C), não foram observadas bandas com 130 kDa, que poderiam estar correlacionadas com proteínas Cry.

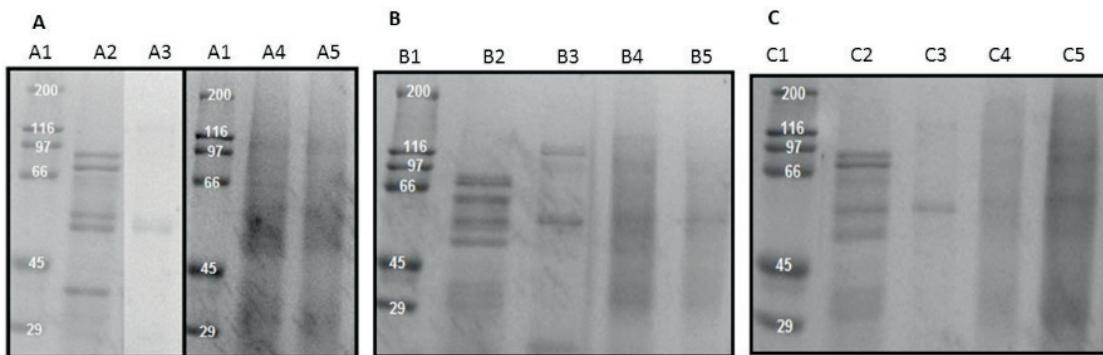


Figura 6. **A:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (A2); conteúdo intestinal (A3); fezes 24 h (A4) e fezes 48 h (A5) de ratos tratados com as proteínas semipurificadas de MTox 2974-11. **B:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (B2); conteúdo intestinal (B3); fezes 24 h (B4) e fezes 48 h (B5) de ratos tratados com as proteínas semipurificadas de MTox 2974-11. **C:** Perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal (C2); conteúdo intestinal (C3); fezes 24 h (C4) e fezes 48 h (C5) de ratos tratados com as proteínas semipurificadas de MTox 2974-11. A1, B1 e C1: marcador de peso molecular (MSDS 6H2 – Sigma Aldrich®).

Conforme os resultados do perfil proteico das amostras de conteúdo estomacal, conteúdo intestinal e fezes (24 e 48 HAT), não foram encontradas bandas de 130 kDa, sugestivas de proteínas Cry, indicando que elas podem ter sido degradadas pelo sistema digestivo dos ratos. Essa degradação pode estar associada com a acidez do conteúdo estomacal dos animais (o pH é de cerca de 3,15 em mamíferos) (VIDAL et al., 2004). Betz et al. (2000), por exemplo, relataram que proteínas Cry1, Cry2 e Cry3 foram degradadas após 30 segundos, em ensaios, *in vitro*, resultando em proteínas de 2 kDa.

Na verificação da presença de esporos de *B. thuringiensis* no trato gastrointestinal dos ratos, em microscopia de contraste de fase, foi observado que as colônias que cresceram a partir das amostras do grupo controle não eram formadas por bactérias esporulantes, descartando a possibilidade da presença de *B. thuringiensis* nos animais desse tratamento. Por outro lado, foi observado o crescimento de colônias de *Bacillus* spp. (Tabela 1) em todas as placas onde foram semeadas as amostras dos ratos tratados com as suspensões bacterianas das três cepas do estudo.

Tratamento	Amostra	Presença	Ausência
Testemunha	CE		X
Testemunha	FI		X
Testemunha	F24H		X
Testemunha	F48H		X
MTox 2974-11	CE	X	
MTox 2974-11	FI	X	
MTox 2974-11	F24H	X	
MTox 2974-11	F48H	X	
MTox 2638-1	CE	X	
MTox 2638-1	FI	X	
MTox 2638-1	F24H	X	
MTox 2638-1	F48H	X	
BTh Thuricide 63	CE	X	
BTh Thuricide 63	FI	X	
BTh Thuricide 63	F24H	X	
BTh Thuricide 63	F48H	X	

Tabela 1. Ocorrência de *Bacillus* spp. nas amostras de conteúdo estomacal (CE), fezes intestinais (FI), fezes coletadas 24 h após aplicação do tratamento (F24H) e fezes coletadas 48 h após aplicação do tratamento (F48H) nos animais tratados com PBS de sódio pH 7.4 (testemunha) e suspensões bacterianas das cepas de *B. thuringiensis* MTox 2874-11, MTox 2638-1 e *BTh Thuricide* 63.

Mancebo et al., (2011), ao avaliarem a patogenicidade de uma nova formulação de *B. thuringiensis* var *israelensis* SH-14 em ratos, por meio de administração oral em dose única, detectaram a presença de esporos viáveis nas fezes a partir de 3 h após a aplicação dos tratamentos até 48 h. Os autores também apontam que, geralmente, há um declínio no número de unidades formadoras de colônias recuperadas ao longo do tempo. Esses resultados, semelhantes aos encontrados no presente estudo, podem ser explicados pela capacidade dos esporos de *B. thuringiensis* atravessarem as barreiras do trato gastrointestinal até a sua eliminação. Bishop et al.

(1999) relataram que ratos que receberam doses orais ( $1 \times 10^{12}$  esporos/mL) durante três semanas, apresentaram resultado negativo para a presença de esporos de *B. thuringiensis* nas culturas de sangue, coração, baço e fígado. Assim, a recuperação de *B. thuringiensis* nas amostras coletadas não pode ser considerada resultado de processos infecciosos, já que não houve sinais de patogenicidade nos animais.

No presente trabalho, foi utilizada a cepa *BTh Thuricide* 63 como controle positivo, já que ela corresponde ao ingrediente ativo do produto comercial *Thuricide*®, que teve sua fabricação proibida devido à capacidade de produção de  $\beta$ -exotoxinas. A falta de toxicidade de *BTh Thuricide* 63, principalmente nos ratos tratados com o seu sobrenadante, pode estar relacionada a uma baixa concentração dessa toxina nociva. Siegel (2001) relata que 18 homens ingeriram 1000 mg de *Thuricide*®, durante 5 dias, e não apresentaram efeitos de intoxicação.

Diversos estudos apontam a segurança do uso de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas. Siegel (2001) relata que foi necessária a inalação de uma dose de  $1 \times 10^8$  esporos/mL de *B. thuringiensis* para provocar a morte de camundongos, o equivalente a  $10^{12}$  esporos/mL em seres humanos, ou seja, uma dose um bilhão de vezes maior do que o máximo que já encontrado em campo durante etapas de pulverização. Portanto, resultados encontrados no presente trabalho podem estar relacionados ao modo de ação altamente específico das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis*, que necessitam de um pH intestinal alcalino (entre 10 – 12), para a solubilização dos cristais, da presença de proteases intestinais, para a ativação das toxinas e a existência de receptores específicos, para sua ligação (SHARMA et al., 2011). Segundo Broderick et al (2006) e Gill & Ellar (2002), não são conhecidos receptores em mamíferos que sejam equivalentes aos encontrados em insetos.

As respostas positivas mostradas em alguns estudos com roedores comprovam que eles são bons modelos experimentais para avaliar a toxicidade de *B. thuringiensis* aos humanos. De acordo com os dados experimentais, e relatos na literatura, observa-se que a dose altamente letal para os insetos da ordem Lepidoptera, os principais alvos desse entomopatógeno, corresponde a  $1 \times 10^{10}$  esporos/mL das suspensões bacterianas. Nessa pesquisa, as cepas de *B. thuringiensis* MTox 2974-11 e MTox 2638-1 não apresentaram efeitos tóxicos aos ratos *Wistar*, quando administradas oralmente, em ensaios agudos de até 24 horas. A partir disso, é possível inferir que as doses letais dessas cepas a mamíferos são muito mais altas do que aquelas que seriam utilizadas em campo para provocar a letalidade dos insetos-alvo, revelando-as como seguras aos mamíferos quando indicadas para uso como biopesticidas.

## REFERÊNCIAS

BELDER, E.; ELDERSON, J. *Bacillus thuringiensis* strains and its toxicity. **Plant Research**

International. Wageningen, 2010.

BERLITZ, D. L. et al. Toxicology effects of  $\delta$ -endotoxins and  $\beta$ -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 1, n. 1, p. 35-38, 2006.

BERLITZ, D. L. et al. Toxicity intraperitoneal and intragástrica route of *Bacillus thuringiensis* and *Melia azedarach* in mice. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 79, n. 4, p. 511-517, 2012.

BETZ, F. S. et al. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*: protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 32, p. 156-173, 2000.

BISHOP, A. H. et al. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 15, p. 375-380, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, DF, 09 out. 2008, Seção 1, pág. 1. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)> acesso em 29 jun. 2015.

BRAVO, A. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**. v. 6, p. 17-26, 2012.

BRODERICK, N. et al. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **PNAS**. v. 103, p. 15196-15199, 2006.

CAMPANINI, E. B. et al. Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**. v. 71, n. 3, p. 362-369, 2012.

CORRÊA, R. F. T. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero**. 127 f. Tese de Doutorado em Biologia Celular - Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade de Brasília, 2012.

DE-BARJAC, H.; LECADET, M. M. Dosage biochimique d'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'arn-polymerases bactériennes. **Comptes Rendus de L'academie des Sciences**. v. 282, n. 1, p. 2119-2122, 1976.

DE MACEDO, C. L. et al. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n. 12, p. 1759-1765, 2012.

GILL, M.; ELLAR, D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. **Insect Molecular Biology**. v. 11, p. 619-625, 2002.

GOUFFON, C. et al. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on Heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 10, p. 3182-3188, 2011.

LAEMMLI, U. K. Smaller sample vols are better. If using large vols make the stack gel bigger. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LIU, X. et al. Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. **Toxins**. v. 6, p. 2229-2238, 2014.

MANCEBO, A. et al. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 59, p. 184–190, 2011.

MARRONI N, et al. Effects of chronic normovolemic anemia on gastric microcirculation and ethanol induced gastric damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 39, n. 4, p. 751-757, 1994.

PARDO-LÓPEZ, L. et al. A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **Fems microbiology reviews**. v. 37, p. 3-22, 2013.

OBEIDAT, M. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -exotoxins and  $\delta$ -endotoxins to *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kuhniella* and human erythrocytes. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 46, p. 10504-10512, 2012.

SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**. v. 9, p. 283–300, 2011.

SANTOS, A. C. et al. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains is not directly correlated with growth of recipient strains. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105, p. 171–175, 2010.

SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.77, p.13-21, 2001.

SHARMA, P. et al. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Letters in Applied Microbiology**. v. 51, p. 42–47, 2010.

SHARMA, P. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with brush border membrane vesicles of maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 106, p. 333–335, 2011.

SOBERÓN, M. et al. Pore formation by Cry toxins. In: ANDERLUH, G.; LAKEY, J. H. **Proteins: membrane binding and pore formation**. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, 2010, cap. 11, p. 127-142.

VIDAL, C. S. et al. Ligadura do esôfago abdominal diminui a secreção gástrica induzida por toxina de escorpião em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.3, p.166-175, 2004.

## UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA PRÁTICA DE ENSINO DE BIOQUÍMICA: UMA EXPERIÊNCIA NO ENSINO SUPERIOR

Data de aceite: 12/12/2019

**João Antônio Leal de Miranda**

Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas, Crato - Ceará.

### **Lázaro de Sousa Fideles**

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza – Ceará

### **Maria Lucianny Lima Barbosa**

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza – Ceará

### **João Vitor da Silva Alves**

Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra – Mato Grosso

### **Maria de Fátima Faustino Araújo**

Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas, Campos Sales - Ceará

### **Amanda Alves Feitosa**

Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas, Crato - Ceará

### **Luciene Ferreira de Lima**

Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas, Crato - Ceará

### **Cleidivan Afonso de Brito**

Universidade Federal do Piauí, Parnaíba – Piauí

### **Claudio Silva Teixeira**

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza – Ceará

### **Gilberto Santos Cerqueira**

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia Fortaleza - Ceará.

**RESUMO:** O estudo da bioquímica, como área interdisciplinar que permeia as mais diversas áreas, figura entre as disciplinas básicas de grande importância para o currículo dos cursos de ciências da saúde e biológicas. Entretanto, a dificuldade na verticalização do conhecimento é perceptível. O uso de metodologias ativas e diferenciadas em sala de aula tem facilitado a aprendizagem e, tornado mais interessante o ensino para o aluno. Objetivou-se com o presente estudo relacionar algumas metodologias alternativas e diferenciadas, como a monitoria acadêmica e o uso de maquetes didáticas, na abordagem do conteúdo da bioquímica de forma harmoniosa e estimulante para os acadêmicos envolvidos. Percebeu-se com o uso das maquetes e as atividades de monitoria significativa evolução no desempenho da turma em relação à qualidade do aprendizado referente aos assuntos abordados em sala de aula nas disciplinas de bioquímica, bem como estimulação do trabalho colaborativo entre os estudantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aprendizagem; Bioquímica; Maquetes; Monitoria.

**ABSTRACT:** The biochemistry's study, as an interdisciplinary area that permeates diverse areas, figure among the relevant basic disciplines to the curriculum of the courses of health sciences and biological. However, a difficulty in the verticalization of knowledge is perceptible. The use of active and differentiated methodologies in the classroom has facilitated learning and made teaching more interesting for the student. The objective of this study was to relate some alternative and differentiated methodologies, such as academic monitoring and the use of didactic mockups, to approach the content of biochemistry in a harmonious and stimulating way for the academic involved. It was perceived with the use of the models and as monitoring activities, no performance of the class about to the quality of the learned regarding the approaches addressed in the classroom in the disciplines of biochemistry, as well as stimulation of the collaborative work between the students.

**KEYWORDS:** Learning; Biochemistry; Models; Monitoring.

## 1 | INTRODUÇÃO

O processo educativo deve ser mediado por metodologias que facilitem o processo de ensino aprendizagem do aluno, tais métodos podem ser compreendidos com o conjunto de procedimentos didáticos, representados por técnicas de ensino com o objetivo de alcançar rendimento satisfatório dos discentes (BRIGHENTI et al., 2009).

O estudo e o conhecimento da bioquímica têm grande aplicabilidade no conteúdo específico das mais diversas áreas, estabelecendo-se como um campo altamente interdisciplinar (GOMES; RANGEL, 2006). No ensino superior, a Bioquímica sempre ocupou um lugar de destaque (SILVEIRA; ROCHA, 2016); figurando entre uma das disciplinas básicas de fundamental importância para o currículo dos cursos de ciências da saúde e biológicas (SHETTY et al., 2007), o que a torna um desafio no processo ensino-aprendizagem, pois precisa ser ensinado e aprendido eficientemente (VARGAS, 2001).

Nos currículos tradicionais, a disciplina de bioquímica é apresentada com critério e organização. Comumente reconhecida pelos acadêmicos, à mesma é definida pelos estudantes como um conjunto de estruturas químicas e reações difíceis de serem assimiladas e desintegradas da sua prática profissional futura (VARGAS, 2001; SANTOS; ANACLETO, 2007).

Atualmente, os avanços tecnológicos têm ampla utilização no ensino superior visando complementar o método tradicional de ensino (KELLY; BRAILSFORD, 2013). Diversas iniciativas têm sido desenvolvidas com o objetivo de facilitar e tornar mais interessante o processo de ensino-aprendizagem (SANTOS; ANACLETO, 2007).

Denominadas de metodologias ativas, as estratégias de ensino incluem trabalhos em grupo, oficinas temáticas, atividades de pesquisa, PBL (Aprendizagem Baseada em Problema), uso de jogos, podcasts, monitorias acadêmicas, palestras por videoconferências, mapas conceituais, aplicação de músicas e paródias para memorização dos assuntos relacionados à disciplina, educação assistida com o uso de computadores, também retratados como ambientes virtuais de aprendizagem e simulação em tempo real (VARGAS, 2001; MORAES; VARELA, 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2013; SHETTY et al., 2016).

Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo relacionar e aplicar métodos alternativos e diferenciados, como a monitoria acadêmica e maquetes didáticas na abordagem do conteúdo de bioquímica no nível superior.

## 2 | METODOLOGIA

O presente trabalho é composto de dois momentos ativos de ensino-aprendizagem: Atividade de monitoria acadêmica e exposição de maquetes físicas tridimensionais, ambos com conteúdo voltado à disciplina de bioquímica estrutural e metabólica.

### 2.1 Atividades de monitoria acadêmica

Por meio da monitoria acadêmica, os referidos monitores ficaram incumbidos de realizar atividades lúdicas com os estudantes regularmente matriculados nas turmas de bioquímica estrutural e metabólica do curso de Ciências Biológicas da Unidade Descentralizada Campos Sales da Universidade Regional do Cariri (URCA) por meio de gincanas, jogos voltados a temas que abrangem conhecimentos específicos, tanto de assuntos já trabalhados em sala pelo professor, quanto por assuntos apresentados pelos próprios monitores às referida turmas.

Ao final de cada atividade, com intuito de reforçar os conteúdos expostos durante as aulas, foram aplicadas avaliações de forma didática com resoluções de questões envolvendo o jogo do V (verdadeiro) ou F (falso), em que foram feitas afirmações sobre o tema abordado onde os acadêmicos deveriam analisar a veracidade das mesmas. Outra atividade desenvolvida foi a “brincadeira do repolho”, onde foi confeccionada uma bola de papel com várias camadas fazendo uma analogia a um repolho. Cada camada continha uma pergunta referente ao assunto estudado, onde os acadêmicos deveriam respondê-las corretamente.

Para a realização das atividades de monitoria, foram selecionados temas pertinentes aos assuntos ministrados em sala de aula, para que o monitor, em momento oportuno para o mesmo e para turma, explanasse sobre o tema determinado anteriormente, e ao final seriam realizadas atividades (jogos e brincadeiras), cuja

finalidade seria avaliar o aprendizado do referido assunto pela turma. O aluno-monitor da disciplina de bioquímica estrutural ficou responsável por abordar o tema “Enzimas: classificação e função”; enquanto o aluno-monitor da disciplina bioquímica metabólica ficou responsável por abordar em sala “Papel do fígado, mitocôndria e rins no metabolismo”.

## 2.2 Exposições de Maquetes

A confecção e exposição de maquetes físicas tridimensionais pelos estudantes da disciplina de bioquímica objetivaram a realização de trabalhos em grupos, a consolidação dos assuntos voltados à bioquímica, já que além de criação de maquetes os estudantes também realizaram a explanação do assunto a ser apresentado em sua maquete. Ademais, a exposição de maquetes traz uma proposta inovadora e por sua vez capaz de estimular uma visão crítica e sustentável do ambiente em que está inserido, onde no momento da confecção das maquetes os alunos teriam de reutilizar materiais que eventualmente iriam para o lixo, ou seja, as maquetes foram feitas a partir da reciclagem de materiais, permitindo com isso a criação de recursos didáticos a custo relativamente baixo.

Para a realização da atividade de exposição de maquetes, os estudantes foram segregados em cinco grupos, que serão responsáveis por representar, a critério de cada grupo, um tema já abordado em sala de aula que correspondesse sobre as características estruturas e funcionais das principais biomoléculas: carboidratos, lipídios e proteínas. Em suma, para a apresentação das maquetes, as equipes foram organizadas conforme representado na tabela 01.

Identificação das Equipes	Biomolécula estudada	Tema proposto
Equipe 1	Lipídios	Composição lipídica nas membranas biológicas: aliando teoria e prática.
Equipe 2	Lipídios	Lipídios: organização e função no interior da membrana celular.
Equipe 3	Carboidratos	A importância dos carboidratos na prevenção e controle de doenças.
Equipe 4	Carboidratos	Determinação sanguínea pelos oligossacarídeos.
Equipe 5	Aminoácidos e Proteínas	Proteínas: o estudo da composição, estrutura, organização e funcionalidade.

Tabela 01: Organograma das equipes para exposição das maquetes físicas tridimensionais na disciplina de bioquímica estrutural.

As equipes apresentaram suas maquetes físicas tridimensionais abordando temas relacionados à disciplina bioquímica estrutural na III Exposição de Maquetes do curso de Ciências Biológicas da Unidade Descentralizada Campos Sales da Universidade Regional do Cariri-Urca, sediado na cidade de Campos Sales, Ceará, Brasil.

### 3 | RESULTADOS

A partir das atividades de monitoria pode-se perceber evolução no desempenho da turma em relação à qualidade do aprendizado referente aos assuntos abordados em sala de aula nas disciplinas de bioquímica. A prática da monitoria acadêmica não somente possibilita uma relação de cooperação entre o professor e os monitores aprimorando a aprendizagem de ambos (PITANO; ROQUÉ, 2015; ELISHA; OJEKUDO, 2016), como também têm papel positivo na solidificação dos conteúdos já expostos em sala pelo professor na turma assistida com a prática de monitoria.

Nas monitorias de bioquímicas, ambas as situações foram vivenciadas no decorrer da prática deste tipo de metodologia ativa; logrando exato no seu objetivo final, a utilização de alternativas para melhorar o processo de ensino e aprendizagem.

Outro ponto observado, além dos esperados inicialmente, com as atividades de monitoria, foi o despertar de interesse na monitoria que os estudantes da disciplina de bioquímica passaram a ter, não só no quesito de compreensão do assunto abordado pelo monitor, mas também procurando aprender com o aluno-monitor o traquejo em repassar o conhecimento, almejando com isso exercer também a atividade de monitoria acadêmica, futuramente.

Com a explanação de determinados assuntos correlatos à bioquímica estrutural e metabólica, e posterior avaliação do aprendizado da turma, por meio de atividades como, a gincana do V (verdadeiro) ou F (falso), brincadeira do repolho, percebe-se que além de tornar um ambiente mais confortável e atraente de ensino e aprendizagem para o estudante, houve um melhor aproveitamento e fixação do conteúdo já repassado por aulas expositivas tradicionais anteriormente, o que torna a prática da monitoria forte aliado no processo de consolidação do conhecimento científico adquirido na academia (Figura 01).



Figura 01. Atividade de monitoria acadêmica nas disciplinas de bioquímica. **A**: Aluno-monitor da disciplina bioquímica metabólica retratando o assunto “Papel do fígado, mitocôndria e rins no metabolismo”; **B e C**: Gincana com os estudantes retratando o assunto abordado na monitoria da disciplina de bioquímica metabólica; **D**: Aluno-monitor da disciplina bioquímica estrutural retratando o assunto “Enzimas: classificação e função”; **E e F**: Brincadeira do Repolho com os estudantes retratando o assunto abordado na monitoria da disciplina de bioquímica estrutural (Fonte: Autoria própria).

Com a exposição de maquetes, pôde-se abranger as principais biomoléculas: carboidratos, lipídios, proteínas (Figura 02). Apesar da heterogeneidade dos temas a serem retratados pelas equipes, variando da abordagem simplista das estruturas de algumas biomoléculas à características funcionais e implicações à saúde humana devido à déficit de algumas dessas biomoléculas para o homeostase corpórea; ao final da atividade de exposição de maquetes físicas tridimensionais logrou-se êxito no processo de aprendizagem por partes dos estudantes, a partir deste método diferenciado.

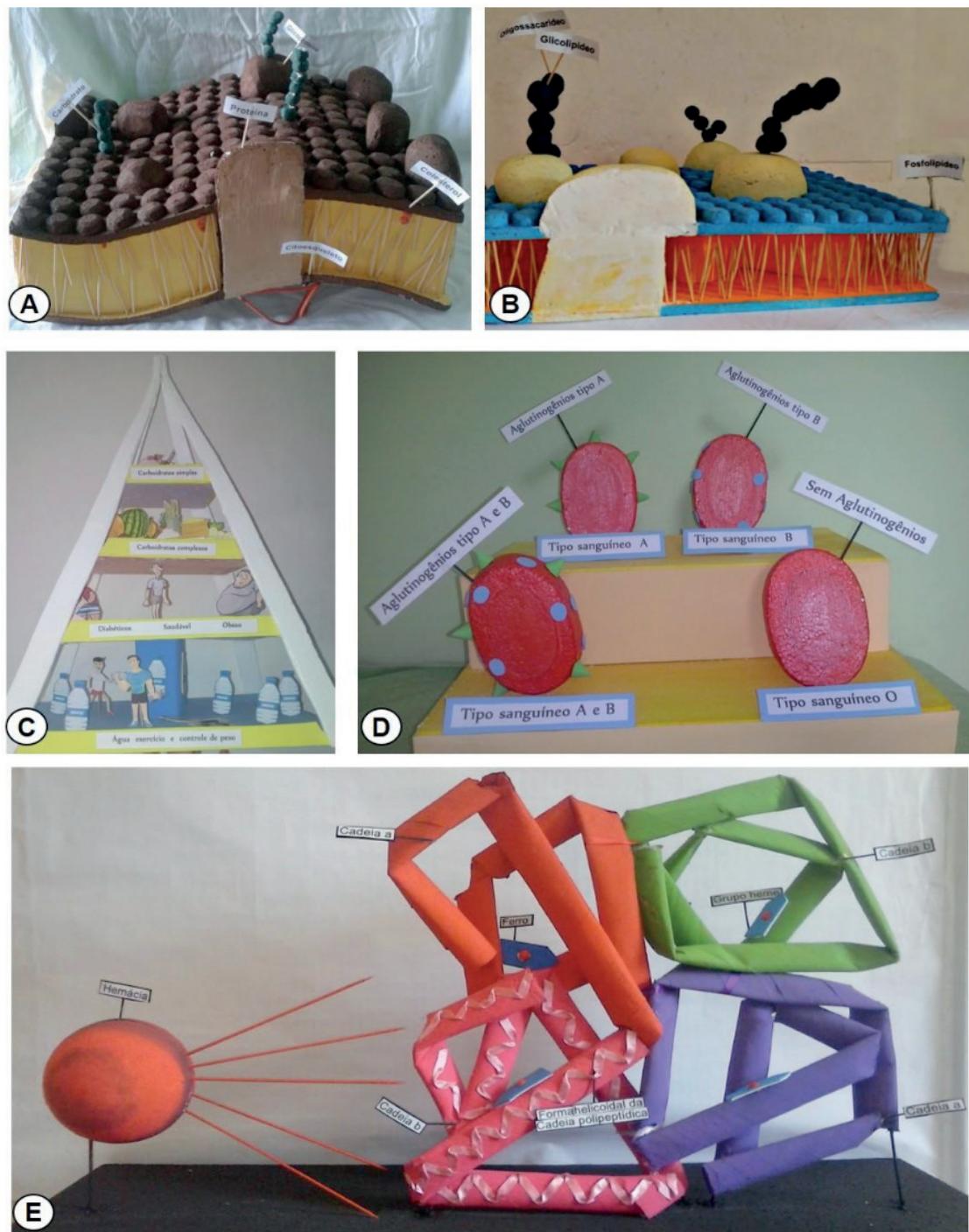


Figura 02. Exposição de Maquetes. **A:** Maquete abordada pela equipe 1; **B:** Maquete abordada pela equipe 2; **C:** Maquete abordada pela equipe 3; **D:** Maquete abordada pela equipe 4; **E:** Maquete abordada pela equipe 5 (Fonte: Autoria própria).

Em relação à exposição de maquetes, percebe-se que a confecção das mesmas estimulou o trabalho colaborativo, por meio da união dos integrantes das equipes para um fim específico, no qual, através do trabalho em equipe, diálogo com colegas do grupo, interação e integração favoreceram a realização do trabalho. No âmbito da exploração do conteúdo relacionado a ser apresentado no dia da exposição, também foi observado tal efeito colaborativo entre os estudantes.

No que tange a apresentação das maquetes, no dia em que ocorreu a apresentação das mesmas aos demais integrantes da comunidade acadêmica, os

estudantes da disciplina de bioquímica estrutural do curso de ciências biológicas, através do referido recurso didático, puderam abstrair conteúdos relacionados à bioquímica estrutural mais facilmente aos demais, aliando para tal fim, a representação visual das peças com seu conhecimento obtido em sala de aula.

O uso de maquetes físicas tridimensionais trata-se de um recurso didático e diferente, pois facilita a abstração de conteúdos relacionados em aula expositivas, podendo dinamizar a discussão da turma em sala de aula, tornando os conteúdos mais dinâmicos e interativos (NACKE; MARTINS, 2007), e com isso favorecer o processo de ensino-aprendizagem por levar à práxis, ou seja, por aliar teoria e prática (HAAG et al., 2008).

## 4 | DISCUSSÃO

Segundo Amorim et al. (2012), a monitoria é uma forma de apoio pedagógico oferecido aos alunos que tenham interesse em aprofundar conhecimentos em determinado tema ou ainda para resolver dúvidas relacionadas a disciplina ministrada em sala de aula. A prática de monitoria é de grande importância em uma disciplina complexa como a bioquímica, sendo o monitor, peça-chave na referida metodologia ativa.

O monitor tem como papel fornecer suporte e auxílio teórico-prático ao aluno com bagagem diminuta em termos e estruturas química ou para aquele com dificuldades na compreensão dos conteúdos. Para o monitor, além de ser uma atividade de exercitação de conteúdos importantes para o seu currículo acadêmico, também permite que esse aluno possa se inserir em atividades de pesquisa, extensão e ter uma experiência significativa no que diz respeito à docência (VIEIRA et al., 2011).

Assim como relatado no presente estudo, corroborando com os trabalhos de Santos et al. (2007) e Elisha; Ojekudo (2016), a monitoria acadêmica além de ser metodologia diferenciada que pode ser utilizada como ferramenta para obtenção de melhorias do ensino em Bioquímica e, que encontra-se a disposição do docente para adequá-la a sua necessidade em sala de aula, tem papel formador de futuros docentes, permitindo ao aluno-monitor melhor poder de explanação, arguição, e estimulador de olhar crítico-científico do referido monitor. Ademais, quando trabalhada com afinco, a monitoria é capaz de estimular os demais alunos em torno da disciplina em questão, bem como incitar os alunos nas atividades de monitoria a vislumbrar a prática futuramente o exercício da atividade de aluno-monitor, em semestres letivos subseqüentes (LEITE, 2016).

A heterogeneidade do conhecimento básicos em química e biologia celular dos alunos, que compõem as turmas de bioquímica, trata-se de outro percalço no ensino da disciplina; sendo necessário que o professor disponha de tempo suficiente

em sala de aula para realização de revisões conteudistas, a fim de equiparar o conhecimento das turmas e, com isso facilitar a compreensão dos assuntos que serão abordados na disciplina. Todavia, o tempo utilizado para realização de revisões pode acarretar extração da carga horária trabalhar à disciplina ou resultar em perdas de conteúdos que deveriam ser lecionados naquela a carga horária prevista da disciplina.

Neste contexto, as monitorias, que por sua vez são processos auxiliares e complementares, surgem como apoio para atenuar o problema, na qual o aluno-monitor, quando dispondo de tempo dentro da sua carga horária semanal na prática de monitoria, realiza a revisão dos conteúdos a fim de nivelar o conhecimento dos alunos (SANTOS; ANACLETO, 2007; VIEIRA, 2011).

A introdução de novas metodologias, como através da monitoria, pôde auxiliar os alunos na compreensão dos conteúdos e no entendimento da disciplina e assim, fazer com que o processo de ensino e aprendizagem viesse ser consolidado e o rendimento dos estudantes pudesse ser potencializado (SANTOS; ANACLETO, 2007; AMORIM et al., 2012).

Promover discussões e criar situações em que estimule o pensamento e olhar crítico do aluno em torno dos assuntos trabalhados em sala de aula é uma das missões do educador. Outra incumbência seria tornar tais conteúdos mais dinâmicos e interativos (PITANO; ROQUÉ, 2015). Em ambas tarefas designadas ao professor, o uso de maquetes tridimensionais, permite o educador lograr êxito, quando utilizando tal metodologia diferenciada de ensino.

Com a utilização das maquetes físicas tridimensionais voltadas aos conteúdos da disciplina de bioquímica estrutural, percebeu-se que tanto aos alunos que estavam envolvidos diretamente na confecção das maquetes, durante e ao final da produção, aumentou o interesse na disciplina e no assunto trabalhado, pela sua respectiva maquete, quanto aos alunos que estavam apenas como expectadores da confecção e apresentação das maquetes. Efeito estimulatório e instigante da aprendizagem foram vistos em Vieira et al. (2011) e Peluso; Pagno (2015), sendo evidenciado neste último, a necessidade de buscar formas de levar o aluno a querer aprender, que se dá através de novas metodologias, neste caso o uso das maquetes, e com isso lhe são disponibilizados novas maneiras de aprender, e oferecer a ele as condições propícias ao desenvolvimento de sua vontade de aprender. Em seu trabalho, Pitano; Roqué (2015), descreve que o uso da maquete tem capacidade de despertar o interesse, intensificando o processo de ensino-aprendizagem; facilitar a abstração do aluno em certos conteúdos retratados, a partir da forma de visualização tridimensional, sendo, portanto, este quesito o diferencial da maquete em relação aos outros recursos didáticos e outras metodologias ativas.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensino da bioquímica assim como as demais disciplinas das biociências no ensino superior, requerem do professor a habilidade e o traquejo ao serem trabalhadas em sala de aula. A captação das informações em sala de aula pelos estudantes, muitas das vezes, é facilitada por meio da utilização de metodologias ativas e diferenciadas com o intuito de captar a atenção do aluno e com isso galgar o grande objetivo, aliar teoria e prática na formação acadêmica, bem como melhoria na qualidade de ensino no ensino superior.

A atividade de monitoria e utilização de maquetes físicas tridimensionais, dois bons e fiéis exemplos de metodologias ativas, foram as metodologias empregadas nas disciplinas de bioquímica estrutural e metabólica no curso de ciências biológicas, logrando-se êxito na assimilação do conteúdo de bioquímica pelos acadêmicos.

Visando o aprimoramento ininterrupto na qualidade do ensino, é importante que as comunidades científicas enfatizem e incentivem a utilização de metodologias diferenciadas em ensino superior. Almeja-se que este trabalho cumpra sua parte nesse processo, servindo de suporte para outros docentes no planejamento das aulas com o uso de diferentes estratégias de ensino.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. M.; LIRA, T. H.; OLIVEIRA, M. P.; PALMEIRA, A. P. **O papel da monitoria para a formação de professores: cenários, itinerários e possibilidades no contexto atual.** Revista Exitus, v. 2, n. 2, p. 33-47, 2012.
- BRIGHENTI, J.; BIAVATTI, V. T.; SOUZA, T. R. **Metodologias de Ensino-Aprendizagem: Uma Abordagem Sob a Percepção dos alunos.** Revista Gestão Universitária na América Latina. São Paulo, v. 8, n. 3, p. 1983-4536, 2015.
- ELISHA, A. E.; OJEKUDO, N. A. **Application of Real-World Simulation: A Bridge between Theory and Practice in Higher Education in Nigeria.** IOSR Journal of Research & Method in Education, v. 6, n. 4, p. 59-70, 2016.
- GOMES, K. V. G.; RANGEL, M. **Relevância da disciplina bioquímica em diferentes cursos de graduação da UESB, na cidade Jequié.** Rev. Saúde. Com, v. 2, n. 1, p. 161-168, 2006.
- HAAG, G. S.; KOLLING, V.; SILVA, E.; MELO, S. C. B.; PINHEIRO, M. **Contribuições da monitoria no processo ensino-aprendizagem em enfermagem.** Revista Brasileira de Enfermagem, v. 61, n. 2, p. 215-220, 2008.
- KELLY, F.; BRAILSFORD, I. **The role of the disciplines: alternative methodologies in higher education.** Higher Education Research & Development, v. 32, n. 1, p. 1-4, 2013.
- LEITE, B. S. **Podcasts in the Chemistry Teaching.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 8, n. 6, p. 341-351, 2016.
- MORAES, C. R.; VARELA, S. **Motivação do aluno durante o processo de ensino-aprendizagem.** Revista eletrônica de Educação, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2007.

OLIVEIRA, R. C.; IANO, F. G.; SILVA, T. L.; BUZALAF, M. A. R. **Percepção dos alunos do curso de odontologia de uma universidade brasileira em relação à importância da disciplina de bioquímica na sua profissão.** Revista de Ensino de Bioquímica, v. 5, n. 1, p. 14-20, 2007.

PELUSO, D.; PAGNO, F. **O uso de maquetes como recurso de aprendizagem.** In: Seminário Nacional Interdisciplinar em Experiências Educativas, 5., 2015, Francisco Beltrão. Anais... Francisco Beltrão: SENIEE, 2015. p.1059-1068

PITANO, S. C.; ROQUÉ, B. B. **O uso de maquetes no processo de ensino aprendizagem segundo licenciandos em Geografia.** Educação Unisinos, v. 19, n. 2, p. 273-282, 2015.

SANTOS, A. O.; SILVA, R. P.; ANDRADE, D.; LIMA, J. P. M. **Dificuldades e motivações de aprendizagem em Química de alunos do ensino médio investigadas em ações do (PIBID/UFS/Química).** Scientia Plena, v. 9, n. 7, p. 1-6, 2013.

SANTOS, V. T.; ANACLETO, C. **Monitorias como ferramenta auxiliar para aprendizagem da disciplina bioquímica: uma análise no UNILESTE-MG.** Revista em Bioquímica, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2007.

SHETTY, J. K.; BEGUM, G. S.; GOUD, M. B. K.; ZAKI, B. **Comparison of didactic lectures and case-based learning in an undergraduate biochemistry course at RAK medical and health sciences university, UAE.** Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, v. 5, n. 50, p. 3212-3216, 2016.

SILVEIRA, J. T.; ROCHA, J. B. T. **Produção científica sobre estratégias didáticas utilizadas no ensino de Bioquímica: uma revisão sistemática.** Revista de Ensino de Bioquímica, v. 14, n. 3, p. 7-21, 2016.

VARGAS, L. H. M. **A bioquímica e a aprendizagem baseada em problemas.** Revista de Ensino de Bioquímica, v. 1, n. 1, p. 15-19, 2001.

VIEIRA, J. K.; LARCHER, J. V. M.; FERNEDA, M. C.; DIAS JUNIOR, G. D. B.; BRUM, L. S. **Uso de maquetes físicas tridimensionais para o ensino aprendizagem em desenho técnico.** In: Congresso Brasileiro de educação em Engenharia, 39., 2011, Blumenau. Anais do Congresso Brasileiro de educação em Engenharia, Blumenau: COBENGE, 2011. p.1-9.

## A RELEVÂNCIA DA IMAGINOLOGIA TORÁCICA NA INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 05/11/2019

**Vera Lúcia Teodoro dos Santos**

Centro Universitário ICESP

Brasília, DF

<http://lattes.cnpq.br/3975993359103514>

[vera.santos@icesp.edu.br](mailto:vera.santos@icesp.edu.br)

**Rosângela Silqueira Hickson Rios**

Faculdade PROMOVE de Tecnologia

Belo Horizonte, MG

<http://lattes.cnpq.br/0034196977785631>

**Vinicius dos Reis Silva**

Núcleo de Educação à distância – CEFET – MG

Belo Horizonte, MG

<http://lattes.cnpq.br/1192338650425421>

**Larissa Cristine Lopes Soares**

Centro Universitário ICESP

Brasília, DF

<http://lattes.cnpq.br/8814053751859756>

**RESUMO:** **Introdução:** O objetivo deste estudo é verificar na literatura a relevância da utilização da radiologia torácica na investigação de metástase em cadelas com neoplasias mamárias. **Materiais e Métodos:** Trata-se de uma revisão da literatura, utilizou-se a base de dados *pubmedcentral*. Como critério de inclusão estão os artigos no idioma português e inglês,

publicados no período de 2014 a 2019, que apresentaram cadelas com neoplasia mamária e metástase. Como critério de exclusão estão os artigos que não atendem ao objetivo do estudo, ou seja, publicações anteriores a 2014 e que não apresentavam cadelas com neoplasias mamárias e metástase. **Resultado e discussão:** Foram identificados, com a busca, 38 artigos, porém somente quatro atenderam ao objetivo deste estudo e aos critérios de inclusão e exclusão. Os artigos selecionados abordam as técnicas de raios-X, Ultrassonografia e a Tomografia Computadorizada. A ocorrência de metástases torácicas em cadelas que apresentam diagnóstico é realizada pelo exame de Raios-X em cerca de 10 a 15% dos casos e são constatados como malignos. **Conclusão:** Desde o estado primário do câncer de mama até ao de metástase a radiologia torácica apresenta-se relevante, com a mensuração de regiões anatômicas como no reconhecimento de aumento metastático nas neoplasias mamárias. **PALAVRAS-CHAVE:** radiologia; neoplasia mamária; neoplasia metastática; cães.

THE RELEVANCE OF THORACIC  
IMAGINOLOGY IN METASTASIS  
INVESTIGATION IN BITCHES WITH  
MAMMARY NEOPLASMS

**ABSTRACT:** Introduction: This study aims to

verify the significance use of thoracic radiology in bitches investigation with breast metastasis neoplasms. Methods: It treats about literature review, in which the central pubmed database was used. The published articles in Portuguese and in English from 2014 to 2019, suggesting mammary neoplasia and metastasis in these animals were used as inclusion criterion in this work. And the exclusion one, those published prior to 2014 which did not show the bitches with breast neoplasia and metastasis. Results: A total of 38 articles were recognized, however, only four met the present research goal and its inclusion/exclusion criteria. The chosen paper allude the X-rays, Ultrasound and Computed Tomography techniques. The thoracic metastasis incidence in bitches with this diagnosis is achieved with the X-rays exam in about 10 to 15% of the cases and they are confirmed to be malignant. Conclusions: The thoracic radiologic is primordial from primary breast cancer to metastasis with the anatomical region estimation in its neoplasm acknowledgment.

**KEYWORDS:** radiology; breast neoplasm; metastatic neoplasia; dogs.

## INTRODUÇÃO

Na medicina veterinaria a especialidade oncologica possui representatividade decorrente da prevalência de neoplasias mamarias em cadelas, sendo uma das principais causas de mortalidade em animais. Nessa perspectiva, as neoplasias mamárias representam cerca de 52% dos casos em cadelas que são atendidas em clínicas e hospitais veterinários, sendo 50% delas malígnas (SANTOS et al., 2013).

Evidencia-se que a epidemiologia das neoplasias pode auxiliar na verificação dos fatores de risco relacionados à sua ocorrência, que depende da raça, idade e sexo do animal. A classificação das neoplasias está relacionada à localização e ao diagnóstico histopatológico (CHOI; YOON; JEONG, 2016).

A metástase das neoplasias mamárias pode irradiar pela circulação sanguínea e pelos vasos linfáticos. O diagnóstico impreciso ou negativo para metástase pode significar que não foram encontrados traços no momento do exame, porém focos microscópios, talvez, não sejam identificados e podem desenvolver posteriormente (SILVA, 2007).

Os meios de diagnóstico por imagem possibilitam a constatação das neoplasias em sua extensão e a presença de metástase. Os exames utilizados são radiografia, cintilografia, ultrassonografia, endoscopia, tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Em relação aos custos, a radiografia e a ultrassonografia são mais utilizadas no Brasil, porém, um é complementar ao outro (HORA, 2012).

Além disso, a radiografia é um exame complementar para avaliação de metástase pulmonar, principalmente, para paciente com histórico de câncer na mama, assim permite várias informações da avaliação do tórax, pelo seu contraste natural (BARROSO, 2005).

Com isso, ao identificar a relação entre à utilização de meios radiológicos da região torácica na identificação do tamanho da região acometida pela neoplasia mamária e na verificação da difusão dos sítios secundários, possibilitando assim gerar a metástases. No presente artigo, objetivou-se verificar na literatura a relevância da utilização da radiologia torácica na investigação de metástase em cadelas com neoplasias mamárias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão da literatura que se utiliza de um processo de busca de informações, que as analisa e descreve (FERENHOF; FERNANDES, 2016). Foi realizado o levantamento dos dados na base Pubmed Central (PMC). Foram utilizados os descritores radiology, breast neoplasms, neoplasm metastasis e dogs. A busca utilizou o operador booleano AND, que caracterizou por (((\*Radiology) AND Breast Neoplasms) AND Neoplasm Metastasis) AND dogs.

Critérios de Inclusão foram estudos nos idiomas português e inglês, que apresentaram cadelas com neoplasia mamária e metástase, que foram publicados entre 2014 a 2019.

Os artigos que não atenderem ao objetivo do estudo, publicações anteriores a 2014 e que não apresentam cadelas com neoplasias mamárias e metástase.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados, com a busca, 38 artigos, porém somente quatro atenderam ao objetivo do estudo e aos critérios de inclusão e exclusão (tabela 1).

Título	Ano	Local	Autor
Resultados clínicos de tumores espontâneos geridos cirurgicamente em 114 cães de posse do cliente.	2016	Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Konkuk, Coreia do Sul.	Choi; Yoon; Jeong (2016)
Estadiamento clínico em cadelas com tumores mamários: influência do tipo e grau histológico	2016	Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.	Gundim <i>et al.</i> (2016)
Ultrassonografia para identificação de metástase em linfonodos em cadelas com neoplasias mamárias	2018	Departamento de clinica veterinaria, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Brasil.	Silva <i>et al.</i> (2018)
Avaliação da metástase de linfonodo sentinel em tumores de glândula mamária canina usando linfografia indireta	2017	Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Aristóteles de Thessaloniki, Thessaloniki, Grécia.	Soultani <i>et al.</i> (2017)

Tabela 1 – Caracterização dos artigos selecionados para análise.

Fonte: dados da pesquisa.

Os artigos abordam as técnicas de Raios-X, Ultrassonografia e a Tomografia Computadorizada (TC). Choi; Yoon; Jeong (2016) utilizou em seu estudo radiografias torácicas em três vias e abdominais, considerando que o exame radiográfico ainda é o mais utilizado para avaliar o tórax na medicina veterinária e em pequenos animais. Em relação à radiografia de tórax que permite verificar os campos pulmonares, espaço pleural e regiões mediastinais (PINTO, 2003).

Gundim et al. (2016), para a determinação do caso clínico tumoral, realizaram radiografias de tórax com projeções ventro-dorsal e látero-lateral direita e esquerda. O posicionamento em latero-lateral direita, pode ser representado pela sigla LLD. O paciente é posicionado em decúbito lateral com lado direito encostado na mesa, os membros torácicos esticados para região cranial, evitando-se, assim, que os mesmos apareçam na região cranial do tórax. É importante que, na imagem, apareça os dois membros sobrepostos (BARROSO, 2005).

O posicionamento em latero-lateral esquerda, pode ser representado pela sigla LLE. O paciente é posicionado em decúbito lateral com o lado esquerdo encostado na mesa, seguindo as mesmas recomendações anteriores para os membros torácicos (BARROSO, 2005). Já o posicionamento em ventro-dorsal pode ser representado pela sigla VD. O paciente é posicionado em decúbito dorsal, com os membros esticados para região cranial, evitando-se a sobreposição da parte cranial do tórax. A figura 1 mostram as projeções radiológicas para mensuração clínica tumoral.

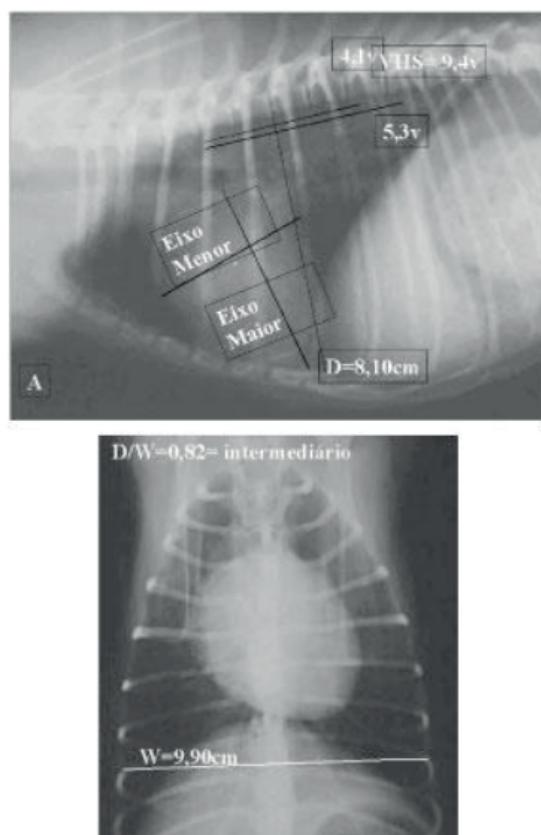


Figura 1: Radiografia projeção látero-lateral (A) e ventro-dorsal (B).

Fonte: PINTO; IWASAKI (2004)

O exame radiológico realizado no pré-operatório em destaque, o de tórax, apresenta grande relevância para o melhor planejamento terapêutico do caso clínico do animal (DALECK et al., 1998). Uma rotina comum dentro do radiodiagnóstico são as imagens de tórax, sendo uma das mais importantes na medicina veterinária, por se tratar de um exame acessível (PIRES, 2011). A ocorrência de metástases torácicas em cadelas que apresentam diagnóstico é realizada pelo exame de Raios-X em cerca de 10 a 15% dos casos e são constatados como malignos (SILVA, 2007).

Silva et al. (2018) aborda a ultrassonografia em diferentes técnicas, tais como a B-mode, Doppler e ARFI-elastografia que são utilizadas para o diagnóstico de metástase em cadelas. O B-mode (figura 2) consiste em imagens transversais que possibilitam delimitar os tecidos e órgãos, gerando ecos, que são formados pela reflexão das ondas do ultrassom que resultam em um mapa com escalas dos ecos, a claridade está relacionada com a intensidade ou amplitude da formação do eco, com isso possibilita apresentar o termo B-mode, ou seja, modo brilho.

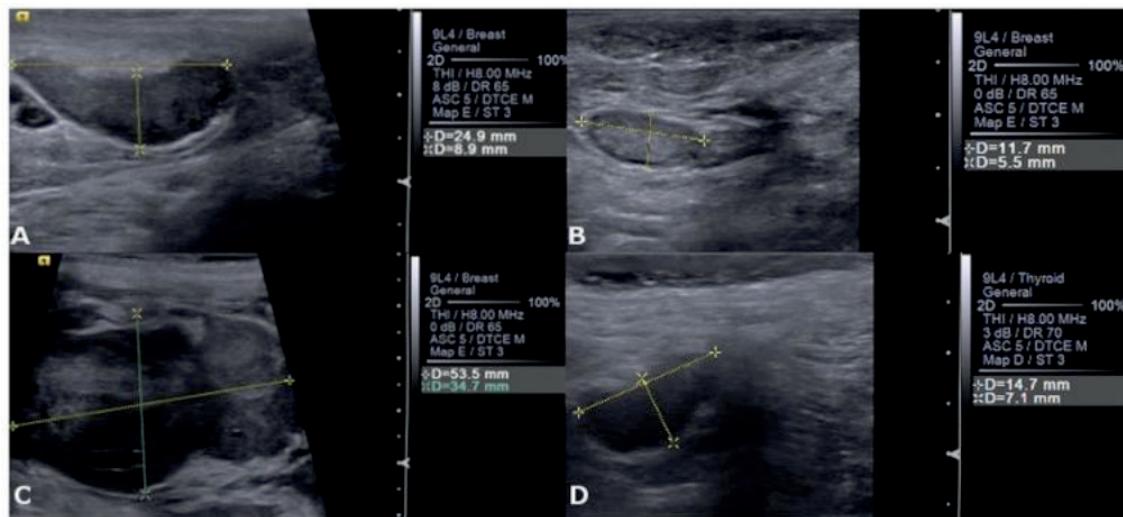


Figura 2 – Imagens de ultrassonografia B-mode de gânglios caninos.

(A) linfonodo inguinal com metástase (B) linfonodo inguinal normal. (C) linfonodo axilar com metástase. (D) linfonodo axilar normal.

Fonte: SILVA et al. (2018)

O Doppler (figura 3) é um método novo na medicina veterinária. A ferramenta fornece dados, em tempo real, do arcabouço vascular e a aparência hemodinâmica dos vasos dos órgãos. (CARVALHO; CHAMMAS; CERRI, 2007).

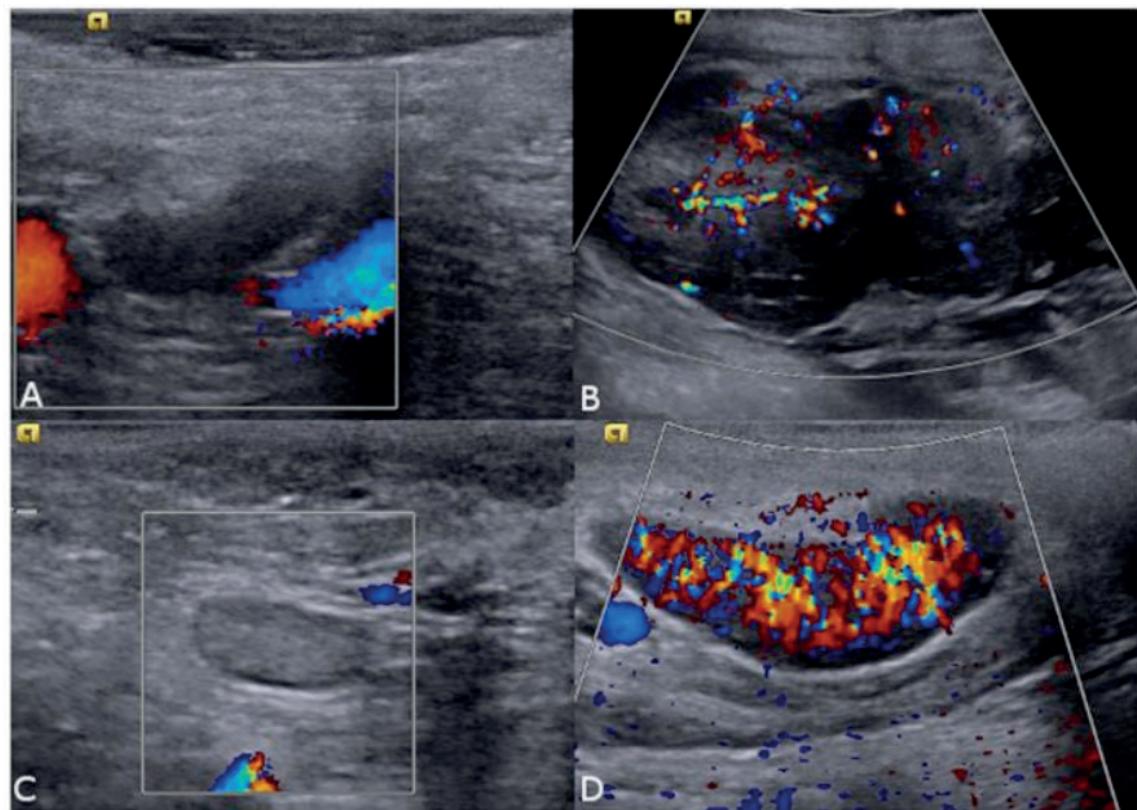


Figura 3 - Imagens de ultrassonografia Doppler colorido de linfonodos loco-regionais caninos.

(A) axilar normal. (B) Linfonodo axilar com metástase (C) linfonodo inguinal normal (D) linfonodo inguinal nó com metástase e presença de neovascularização.

Fonte: SILVA et al. (2018)

A elastografia (figura 4) é um exame que utiliza vibrações sonoras e mensura a velocidade de propagação das ondas pelos tecidos. Silva et al. (2018) apresenta que o B-mode permite identificar neoplasias mamárias com precisão moderada. A ARFI-elastografia demonstrou precisão extraordinária, porém, o Doppler colorido não apresentou nenhuma característica que determinasse a metástase.

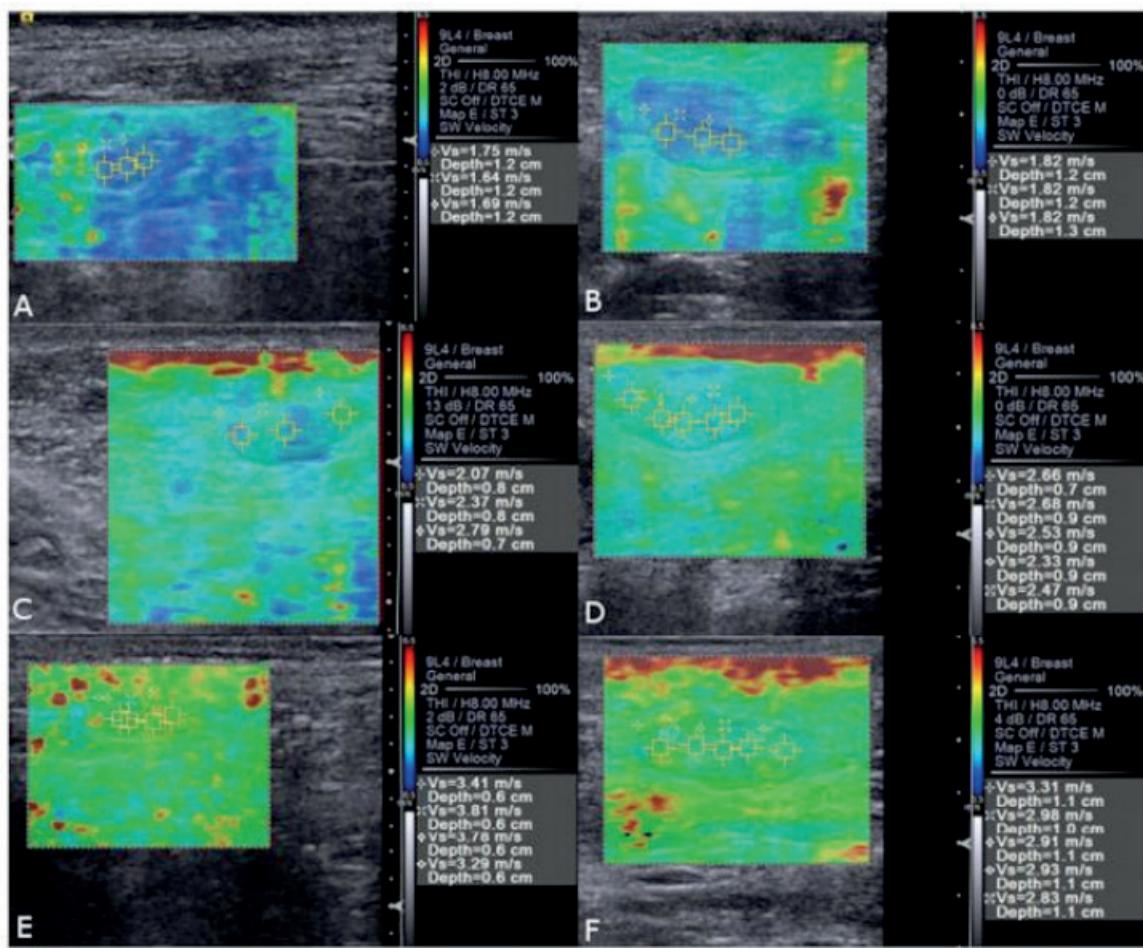


Figura 4: Imagens qualitativas e quantitativas de ARFI-elastografia.

(A) linfonodo axilar normal, (B) linfonodo inguinal normal com padrão homogêneo e SWV em m / s. (C) Linfonodo axilar reativo, (D) linfonodo inguinal reativo com padrão heterogêneo e SWV em m / s. (E) Linfonodo axilar com metástase, (F) linfonodo inguinal com metástase com padrão heterogêneo.

Fonte: SILVA et al. (2018)

Soultani et al. (2017) relata que a ultrassonografia é utilizada para descrever padrões linfonodos metastáticos em cães. Para o autor, Soultani et al. (2017) o procedimento é limitado devido à dificuldade de análise de estruturas pequenas ou as que são mais profundas. A TC é uma técnica de imagem utilizada desde o início da década de 70, que se baseia em Raios-X, onde as fontes de radiação ionizante que são disparadas simultaneamente em movimentos circulares ao redor do paciente (SILVA; OLIVEIRA, 2017). Soultani et al. (2017) utilizou da TC com infografia indireta tomográfica, onde os cães foram sedados e colocados em decúbito dorsal com uma espessura de 3 mm, com o tomógrafo helicoidal.

Na figura 5 foi encontrado padrão heterogêneo, apresentando regiões desiguais na distribuição do agente de contraste e opacidade em algumas regiões.

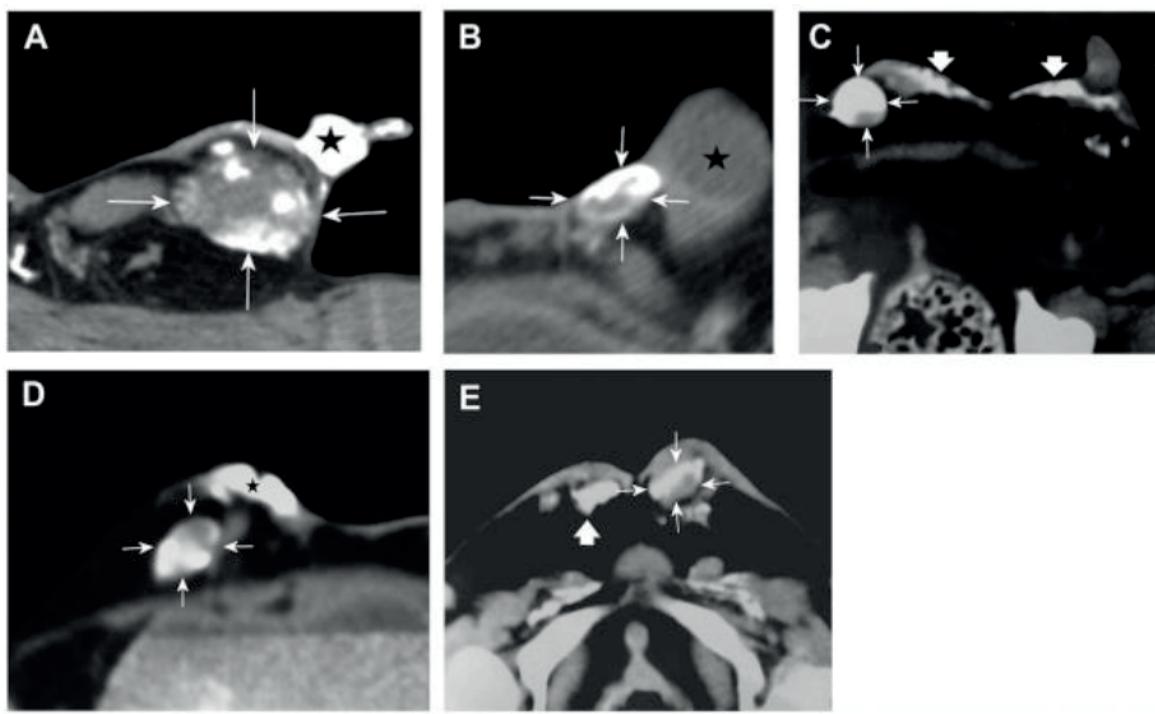


Figura 5 - Imagens transversais de CT-LG (cães em decúbito dorsal) mostrando tipos de padrões de opacificação pós-contraste não uniformes de histopatologicamente confirmados SLNs inguinais superficiais neoplásicos (setas delinear as margens dos SLNs).

(A) Aparência manchada de um SLN ampliado (o asterisco indica quinta glândula mamária com meio de contraste). (B) opacificação periférica (asterisco indica a quinta glândula mamária). (C) Defeito de enchimento (setas grossas indicam linfáticos para SLNs). (D e E) Opacificação parcial (asterisco indica a quinta glândula mamária com meio de contraste; seta grossa indica opacificação normal SLN do lado oposto).

Fonte: Soultani et al. (2017)

A linfografia é um exame radiológico que verifica o sistema linfático utilizando contraste. O sistema linfático protege o organismo das macromoléculas estranhas, bactérias e outros agentes nocivos (MONTANARI, 2016). As cadelas apresentam um complexo mamário que são interligados por cadeias linfáticas que possibilitam a difusão da metástase mamária (SILVA, 2007).

A figura 6 apresenta o modelo esquemático do complexo mamário e linfático que estão interligados possibilitando a metástase em decorrência das neoplasias mamárias em cadelas.

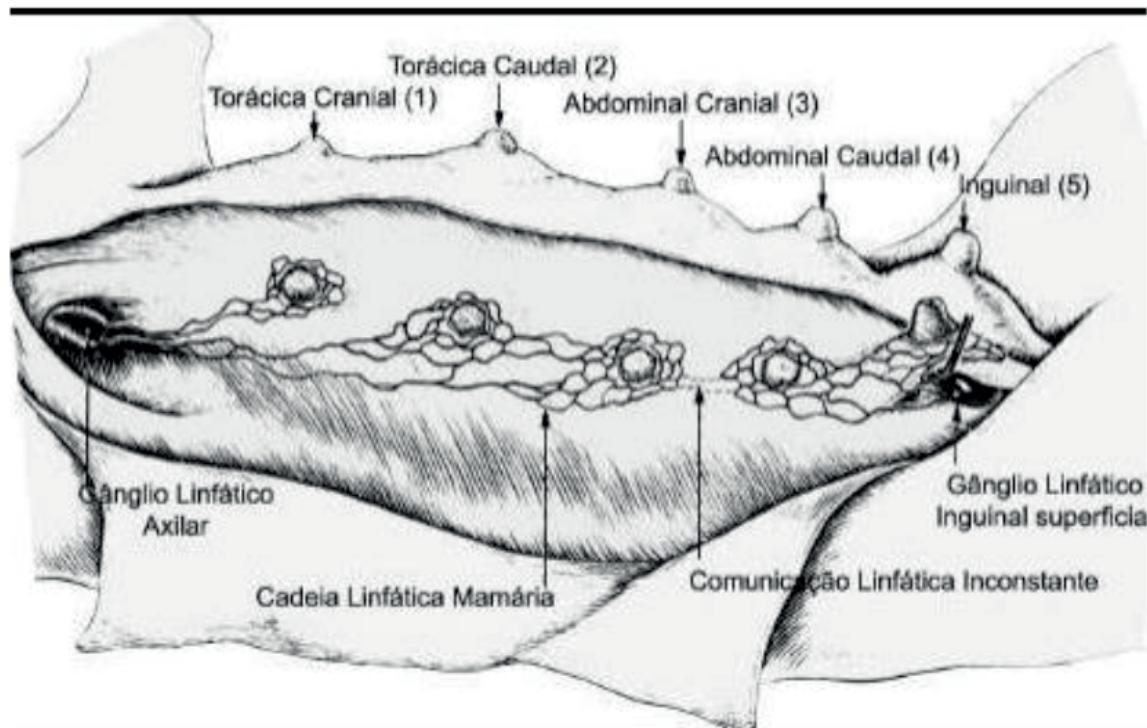


Figura 6 - Modelo esquemático do complexo mamário e rede linfática do cão.

Fonte: Silva (2007)

## CONCLUSÃO

Foram identificadas as técnicas de raios-X, Ultrassonografia e a Tomografia Computadorizada que são utilizadas em determinados casos clínicos. Os raios-X são os mais utilizados devido à facilidade de realização do procedimento e pelo fator econômico, porém as demais técnicas são complementares para um melhor diagnóstico clínico.

Assim, no contexto específico desta pesquisa, a radiologia pode ser uma excelente aliada, pois ela pode ajudar a determinar o estadiamento da doença, confirmado a presença de metástase ou o tamanho do tumor primário. O uso deste recurso pode facilitar o prognóstico e auxiliar na prescrição do melhor método de tratamento. Assim, de acordo com as características de cada tipo de procedimento, pode-se ter, como benefício, o diagnóstico precoce da doença e ou de metástases, o que influencia diretamente na sobrevida dos pacientes.

Desde o estado primário do câncer de mama até o de metástase, a radiologia torácica apresenta-se como relevante, seja como a mensuração de regiões anatômicas ou como no reconhecimento de aumento metastático nas neoplasias mamárias.

## REFERÊNCIAS

- BARROSO, R. M. V. B.; PAULA, T. M.; JR, R. Á. Radiologia torácica (Thoracic radiology). Rev. Eletrônica de Veterinária REDVET, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2005. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/h030305/030508.pdf>> Acesso em: 16 jun. 2019.
- CARAVELHO, C. F.; CHAMMAS, M. C. CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.872-879, mai-jun, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n3/a47v38n3.pdf>> Acesso em 17 jun. 2019.
- CHOI, J.; YOON, H.; JEONG, S. Clinical Outcomes of Surgically Managed Spontaneous Tumors in 114 Client-owned Dog. **Immune Netw.** v. 16, n. 2, p. 116-125, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853497/pdf/in-16-116.pdf>> Acesso em 16 jun. 2019.
- DELECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C. A.; SANTANA, A. E. MARTINS, M. I. M. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Cienc. Rural**, v.28, n.1, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v28n1/a16v28n1.pdf>> Acesso em 17 jun. 2019.
- FERENHOF, H. A.; FERNANDES, R. F. Desmistificando a revisão de literatura como Base para redação científica: método SSF. **Revista ACB: Biblioteconomia em Santa Catarina**, Florianópolis, SC: v. 21, n. 3, p. 550-563, ago./nov., 2016. Disponível em: <<https://revista.acbesc.org.br/racb/article/download/1194/pdf>> Acesso em: 22 jun. 2019.
- GUNDIM, L. F.; ARAÚJO, C. P.; BLANCA, W. T.; GUIMARÃES, E. C.; MEDEIROS, A. A. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **Can J Vet Res.** v. 80, n. 4, p. 318-322, 2016. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052884/pdf/cjvr\\_10\\_318.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052884/pdf/cjvr_10_318.pdf)> Acesso em 16 jun. 2019.
- HORA A. M. **Diagnóstico por imagem na oncologia veterinária-revisão de literatura e relato de caso.** 2012. 39 f. Monografia (Especialista em Diagnóstico por Imagem de Pequenos Animais). Universidade Federal de Santa Maria, Rio grande do Sul. Disponível em: <[http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/2133/Hora\\_Aline\\_Medeiros\\_da.pdf?sequence=1](http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/2133/Hora_Aline_Medeiros_da.pdf?sequence=1)> Acesso em: 16 jun. 2019.
- PINTO, A. C. B. C.; IWASAKI, M. Avaliação radiográfica da silhueta cardíaca pelo método de mensuração VHS (vertebral heart size) em cães da raça Poodle clinicamente normais. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 41, n. 4, São Paulo. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n4/25268.pdf>> Acesso em 17 jun. 2019.
- PIRES, S. T. **Estudo comparativo entre radiologia convencional e ultrassonografia modo B e doppler na avaliação de doenças torácicas extracardíacas em cães e gatos.** 2011. 96 f. Dissertação [mestrado em Ciências]. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/5062/texto%20completo.pdf?sequence=1>> Acesso em: 12 de abril de 2018.
- SANTOS, I. F. C.; CARDOSO, K. C.; OLIVEIRA, C. J. M.; BESSA, S. A. T. Prevalência de neoplasias diagnosticadas em cães no Hospital Veterinário da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.3, p.773-782, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n3/25.pdf>> Acesso em 16 jun. 2019.
- SILVA, A. C. H. C. **Neoplasias das glândulas mamárias em cães.** 2007. 153 f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná. Disponível em: <<https://tcconline.utp.br/wp-content/uploads/2011/08/neoplasias-das-glandulas-mamarias.pdf>> Acesso em 22 jun. 2019.
- SILVA, F. M. S.; OLIVEIRA, E. M. F. Comparação dos métodos de imagem (tomografia Computadorizada e ressonância magnética) para o diagnóstico de acidente vascular encefálico. **Revista Enfermagem Contemporânea**. v. 6, n. 1, p. 81-89, 2017. Disponível em: <<https://www5.bahiana.edu.br/index.php/enfermagem/article/view/1258/853>> Acesso em: 18 jun. 2019.

SILVA, P.; USCATEGUI, R. A. R.; MARONEZI, M. C.; GASSER, B.; PAVAN, L.; GATTO, I. R. H.; ALMEIDA, V. T.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Ultrasonography for lymph nodes metastasis identification in bitches with mammary neoplasms. *Sci Rep.* v. 8, 2018. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286329/pdf/41598\\_2018\\_Article\\_34806.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286329/pdf/41598_2018_Article_34806.pdf)> Acesso em 16 jun. 2019.

SOULTANI, C.; PATSIKAS, M. N.; KARAYANNOPOULOU, M.; JAKOVLJEVIC, S.; CHRYSSOGONIDIS, I.; PAPAIOANNOU, N. PAPADOPPOULOU, P. PAVLIDOU, K.; LLIAN, G. M.; KAITZIS, D. G.; LLIA, T. M. Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomographic indirect lymphography. *Vet Radiol Ultrasound*. v. 58, n. 2, p. 186-196, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28009075>> Acesso em 16 jun. 2019.

MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229 p. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto>. Acesso em 16 jun. 2019.

## EFEITOS GENOTÓXICOS EM TÉTRADES DE *Tradescantia pallida* INDUZIDOS POR POLUENTES ATMOSFÉRICOS NA CIDADE DE JOINVILLE, SANTA CATARINA, BRASIL

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 04/11/2019

**Bruna Tays Hartelt**

Universidade da Região de Joinville - Univille,  
Departamento de Ciências Biológicas, Joinville -  
Santa Catarina

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7967672936134675>

**Valéria Cristina Rufo Vетораззи**

Universidade da Região de Joinville - Univille,  
Departamento de Ciências Biológicas, Joinville -  
Santa Catarina

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9855816785799702>

**RESUMO:** O biomonitoramento atmosférico permite avaliar a qualidade do ar em áreas extensas, utilizando organismos vivos que respondem à poluição alterando suas funções ou acumulando toxinas. Esse estudo objetivou avaliar a genotoxicidade do ar atmosférico na cidade de Joinville com o uso do Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN). Foram adotados como pontos amostrais cinco canteiros ornamentados com *Tradescantia pallida*: Ponto 1 no Cemitério Municipal; Ponto 2 em um segmento da rua São Paulo; Ponto 3 no Mercado Público; Ponto 4 na rua Albano Schmidt; e Ponto 5 em um segmento da rua Dr. João Colin. Após a escolha dos pontos amostrais, foram realizados ensaios cromossômicos

por meio da contagem de micronúcleo em sistema vegetal. As análises foram feitas sob microscopia óptica (400X) e a cada lâmina, foi contado o número de MCN em 300 tétrades. Não foram observadas diferenças significantes entre as frequências de MCN nos diferentes pontos amostrais, as análises estatísticas revelaram que a frequência média de MCN ficou entre 0,84% e 0,56%. Apesar de Joinville ser uma forte potência industrial do estado e uma região em constante desenvolvimento, os dados obtidos revelam que a poluição do ar atmosférico não se mostrou causadora de um aumento na frequência de MCN da planta em estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomonitoramento; Genotoxicidade; Micronúcleo; Trad-MCN.

**GENOTOXIC EFFECTS ON TETRADS OF *Tradescantia pallida* INDUCED BY ATMOSPHERIC POLLUTANTS IN THE CITY OF JOINVILLE, SANTA CATARINA, BRAZIL**

**ABSTRACT:** Atmospheric biomonitoring allows the assessment of air quality in large areas using living organisms that respond to pollution by changing their functions or accumulating toxins. This study aimed to evaluate the genotoxicity of atmospheric air in the city of Joinville with the use of the Micronucleus Test on *Tradescantia* (Trad-MCN). Five flowerbeds ornamented with

*Tradescantia pallida* were used as sample points: Point 1 in the Municipal Cemetery; Point 2 in a segment of São Paulo Street; Point 3 in the Public Market; Point 4 on Albano Schmidt Street; and Point 5 in a segment of Dr. João Colin Street. After the selection of the sample points, the chromosome assays were performed by means of the micronucleus count in the plant system. The analyzes were done under optical microscope (400X) and the number of MCNs in 300 tetrads was counted on each slide. No significant differences were observed between MCN frequencies at different sample points. Statistical analyzes revealed that the mean frequency of MCN was between 0.84% and 0.56%. Although Joinville is a strong industrial power in the state and a region in constant development, the data obtained show that atmospheric air pollution did not provoke an increase in the MCN frequency of the study plant.

**KEYWORDS:** Biomonitoring; Genotoxicity; Micronucleus; Trad-MCN.

## 1 | INTRODUÇÃO

Desde o surgimento dos seus primeiros ancestrais, o homem tem atuado de forma transformadora e, muitas vezes, predatória sobre a natureza. A partir da descoberta do fogo, no início do Período Paleolítico, o homem passou a contribuir de forma atuante, porém não consciente, para a deterioração da qualidade do ar e a sofrer as consequências desse ato (BRAGA *et al.*, 2001). Nos últimos séculos, especialmente após a Revolução Industrial, uma imensa gama de substâncias nocivas foram produzidas de forma intencional ou como subproduto de atividades produtivas e, segundo Braga *et al.* (2002), esses poluentes vem contribuindo como fator de influência na degradação ambiental do planeta, gerando impactos como degradação do solo, da água e do ar em escala exponencial. A degradação da qualidade do ar atmosférico decorre de diferentes atividades humanas, como a industrialização, o crescimento desordenado de centros urbanos, a queima de combustíveis fósseis, o desmatamento e o uso constante de produtos químicos na agricultura (CAON *et al.*, 2016).

Mais recentemente, o crescimento populacional e o conforto gerado pelo progresso têm contribuído amplamente para o aumento da poluição atmosférica, sobretudo em áreas urbanizadas, fazendo com que o ar apresente cada vez mais substâncias nocivas aos seres vivos, modificando o meio ambiente e comprometendo a qualidade de vida das pessoas que vivem nestas áreas. Dentre os poluentes atmosféricos emitidos em áreas urbanas, os mais significativos são o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), sulfato ( $\text{SO}_4$ ), bisulfato ( $\text{HSO}_4$ ) e materiais particulados (MP) (BRAGA *et al.*, 2002). Esses compostos químicos e resíduos tóxicos são responsáveis por possíveis efeitos mutagênicos, colocando em risco a saúde humana, provocando doenças respiratórias, câncer de pulmão e disfunções cardiovasculares.

Os efeitos oriundos desses poluentes dependem do período de exposição, clima, estado nutricional, predisposição, idade e impacto simultâneo de outros poluentes (CASTRO & SISENANDO, 2017).

O monitoramento ambiental nas grandes cidades é essencial nos dias atuais em função dos inúmeros poluentes que são lançados continuamente na atmosfera, rios, mares e solo (SILVA, 2005). As alterações na composição química do ar causam efeitos negativos não somente aos seres humanos, mas também na fauna e na flora, podendo estes organismos ser utilizados para avaliar a contaminação atmosférica (BARBÉRIO *et al.*, 2013; LIRA *et al.*, 2008). O biomonitoramento atmosférico é uma técnica que permite avaliar a qualidade do ar em áreas extensas, utilizando organismos vivos que respondem à poluição alterando suas funções ou acumulando toxinas. De maneira geral, os vegetais são mais sensíveis à poluição que os animais, portanto, estudos sobre os efeitos dos poluentes na vegetação fornecem subsídios importantes para os programas de controle da poluição do ar (BARBÉRIO *et al.*, 2013). As respostas das plantas bioindicadoras aos poluentes podem ser observadas tanto em nível macroscópico, através do aparecimento de cloroses, necroses, queda de folhas ou diminuição no seu crescimento, como podem ocorrer em nível genético, estrutural, fisiológico ou bioquímico, não sendo visualmente observadas (ELLENBERG, 1991). Dentre os poluentes atmosféricos citados como mais frequentes em ambientes urbanos, o dióxido de enxofre, o óxido de nitrogênio e o ozônio são tidos como os poluentes mais prejudiciais para as plantas (MELO JÚNIOR *et al.*, 2014).

Bioensaios que utilizam plantas para detecção de agentes mutagênicos são conhecidos como excelentes indicadores de efeitos citogenéticos ocasionados por substâncias químicas presentes no ambiente (GRANT, 1994; BARBÉRIO *et al.*, 2013). Entre os muitos bioindicadores empregados para avaliação do potencial mutagênico da atmosfera, destaca-se o Teste de Micronúcleo em vegetais. Esse teste foi primeiramente utilizado por Evans *et al.* (1959) em experimentos *in vitro* com raiz de *Vicia faba*, sendo hoje aplicado em outros modelos vegetais como *Allium cepa* e *Tradescantia* spp. e é amplamente utilizado em pesquisas visando o monitoramento ambiental (SILVA, 2005).

O Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN) é considerado valiosa ferramenta por muitos pesquisadores devido ao seu tamanho pequeno e o código genético compostos por seis pares de cromossomos relativamente grandes, tornando essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (CARVALHO, 2005). Esse teste possui mais de vinte anos de história no campo do monitoramento ambiental, o que se deve à sua efetividade na detecção de danos cromossômicos, à simplicidade com que é executado, ao baixo custo financeiro de sua metodologia e ao fácil acesso ao material de estudos, já que as plantas são facilmente cultivadas

e frequentemente utilizadas para ornamentação. Os mecanismos que levam à formação de micronúcleos envolvem tanto quebras cromossômicas quanto perdas anafásicas, de modo que o uso do Trad-MCN propicia a detecção da ação de agentes aneugênicos e clastogênicos. O teste, contudo, apresenta limitações por não revelar a ocorrência de rearranjos cromossômicos como translocações e inversões (SILVA, 2005). Apesar disso, o Trad-MCN mostra-se uma escolha eficiente em estudos de biomonitoramento.

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivo observar a genotoxicidade do ar atmosférico com o uso do Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN) na cidade de Joinville, Santa Catarina.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado no município de Joinville, na região nordeste de Santa Catarina. Foram adotados como pontos amostrais, cinco canteiros ornamentados com *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea*, localizados em diferentes pontos da cidade que apresentam tráfego diferenciado de veículos (Figura 1). A presença de indústrias, de diferentes seguimentos, também influenciou na escolha dos pontos amostrais.

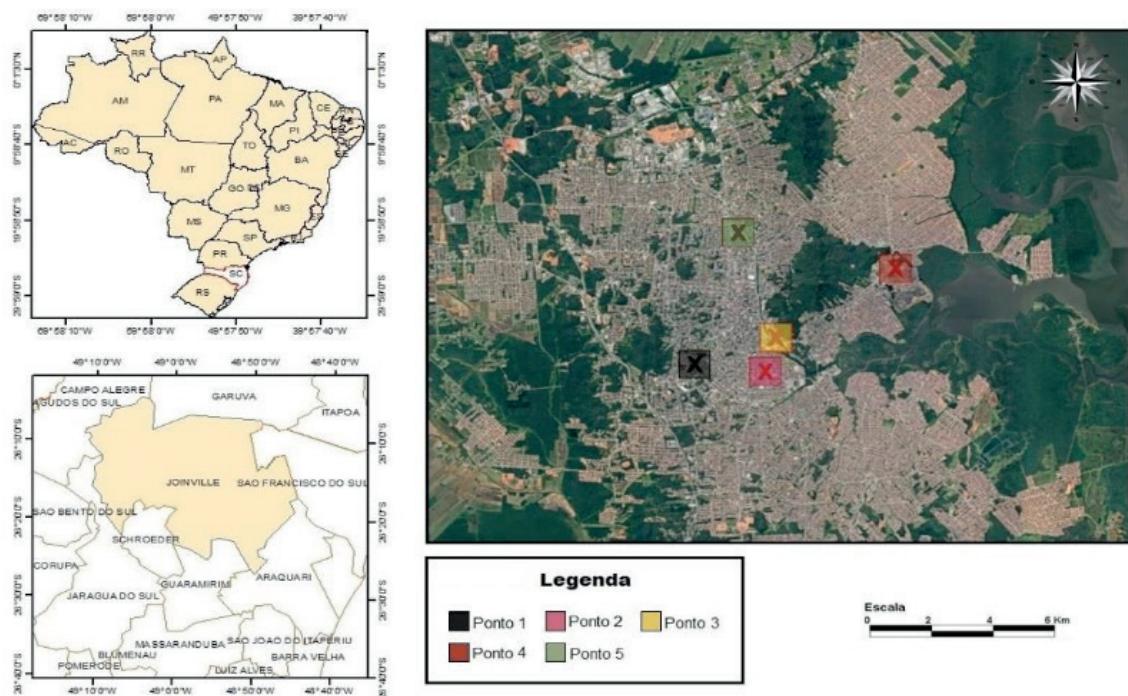


Figura 1. Localização dos pontos de coleta de *Tradescantia pallida*, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Os pontos amostrais foram classificados como Ponto 1, 2, 3, 4 e 5 e os canteiros

escolhidos localizam-se em: Ponto 1 no Cemitério Municipal de Joinville, na rua Ottokar Doerffel, nº 12, bairro Atiradores ( $26^{\circ}18'47.0"S$   $48^{\circ}51'34.8"W$ ); Ponto 2 na rua São Paulo, nº 718, bairro Bucarein ( $26^{\circ}18'49.4"S$   $48^{\circ}50'34.4"W$ ); Ponto 3 no Mercado Público Municipal Germano Kurt Freisler, na avenida Dr. Paulo Medeiros, bairro Centro ( $26^{\circ}18'20.8"S$   $48^{\circ}50'25.1"W$ ); Ponto 4 na rua Albano Schmidt, nº 3345, bairro Boa Vista/Zona Industrial Tupy ( $26^{\circ}17'20.1"S$   $48^{\circ}48'41.3"W$ ); e Ponto 5 na rua Dr. João Colin, nº 2270, no bairro América ( $26^{\circ}16'47.9"S$   $48^{\circ}50'56.7"W$ ).

A cidade de Joinville abriga, segundo estimativa do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) para 2018, uma população de 583.144 habitantes. A cidade é considerada a maior e mais industrializada do estado, sendo o motor da economia de Santa Catarina, pois ocupa o primeiro lugar na produção de riquezas do estado, com um Produto Interno Bruto (PIB) que chegou a R\$ 24,5 bilhões no ano de 2014 (IBGE, 2016). Segundo dados publicados pela Secretaria de Planejamento Urbano e Desenvolvimento Sustentável de Joinville, as principais atividades que garantem esse resultado são as indústrias de metalmecânica, plástico e têxtil (SEPUD, 2018). Atualmente a cidade conta com mais de 1.400 indústrias nesses setores (MELO JUNIOR *et al.*, 2014). Dados do IBGE (2016), descrevem que a frota de veículos ativos na cidade chega a 383.176, entre automóveis, motocicletas, ônibus, caminhões, entre outros. Ou seja, uma média de um veículo para cada 1,52 habitantes.

Joinville apresenta clima subtropical e, devido à sua baixa altitude, apresenta em média, temperaturas mais elevadas do que o interior catarinense. A região nordeste de Santa Catarina apresenta uma das maiores variações de temperatura do estado, a média anual é de  $22,63^{\circ}C$ , sendo a média das máximas  $27,18^{\circ}C$  e a média das mínimas de  $18,91^{\circ}C$ . O mês mais quente é janeiro, com temperatura média em torno de  $25^{\circ}C$ , e julho é o mês mais frio, com temperatura média de  $17^{\circ}C$ . A umidade relativa do ar varia entre 82 e 86%. Joinville apresenta um regime de chuvas que varia entre 1700 mm e 2700 mm anualmente, sendo esta uma das regiões que apresenta os maiores índices de pluviosidade do estado. As chuvas são abundantes durante todo o ano, mas ocorrem com maior frequência no verão (SAMA, 2016).

## 2.2 A espécie em estudo

A *Tradescantia pallida* é uma planta que apresenta fácil adaptação em qualquer ambiente, podendo se desenvolver durante todo o ano (BARBÉRIO *et al.*, 2013). Essa espécie pertence à família das Commelinaceae e é originária do Leste do México e Honduras, onde cresce espontaneamente, gerando prejuízos para a agricultura. É uma planta herbácea, prostrada, suculenta, de 15 a 25 cm de altura, ornamental e com folhas roxas muito decorativas. As flores são pequenas, também roxas, porém pouco vistosas. A planta é pouco tolerante às baixas temperaturas do

inverno. Multiplica-se por estacas e por divisão da planta. Produz sementes, que não são utilizadas diretamente para a multiplicação, mas que levadas por diversos agentes, germinam em locais inesperados e muitas vezes onde ela é indesejável (GORNI *et al.*, 2014).

### 2.3 Coleta e análise de material botânico

Por *T. pallida* se tratar de uma espécie bastante utilizada como bioindicadora de genotoxicidade, existem vários trabalhos publicados utilizando-se do método aplicado no presente estudo para análises do índice meiótico. Gorni *et al.* (2014) indica a coleta de inflorescências jovens, onde no centro da planta se encontra um conjunto de vários botões florais de tamanhos grande, médio e pequeno. Em seu estudo, ele descreve que os botões grandes já são muito velhos para achar células em estágio de tétrades e os botões muito pequenos, ainda não chegaram nessa etapa da divisão celular. Sendo assim, os botões de tamanho pequeno para médio são os mais indicados na realização do método aplicado no presente estudo, conforme figura 2.



Figura 2. Botões florais retirados de *Tradescantia pallida*, a seta preta indica o melhor tamanho para visualização de células em estágio de tétrades. Fonte primária.

As coletas foram realizadas no início dos meses de Janeiro, Abril e Julho de 2018, englobando três estações climáticas do ano: verão, outono e inverno, respectivamente. Durante as coletas, as inflorescências foram fixadas em solução etanol/ácido acético (3:1). Essa solução se faz necessária para preservar ao máximo as características celulares de um organismo vivo coletado, para que possam ser realizadas análises em laboratório. Após o período de 24 horas, as inflorescências foram transferidas para solução de etanol a 70%, onde permaneceram até a confecção das lâminas. O material coletado foi processado de acordo com o protocolo sugerido nos trabalhos pioneiros de Ma (1981) e Ma *et al.* (1994) e aperfeiçoada nos trabalhos

de Silva (2005) e Gorni *et al.* (2014).

Os botões retirados das inflorescências jovens foram dissecados com um bisturi sobre uma lâmina em uma gota de Orceína acética a 2% com o auxílio de um estereomicroscópio, necessário para melhor visualização do procedimento. As anteras assim obtidas, foram levemente maceradas com bastão de vidro e, em seguida, os fragmentos das anteras foram descartados, ficando apenas as células. A etapa seguinte constitui-se de adicionar mais uma gota do corante Orceína acética a 2%, misturar as células ao corante e adicionar a lamínula sobre a preparação, que foi rapidamente aquecida para uma melhor fixação do corante. Durante o período de duração do estudo, foram preparadas cinco lâminas para cada ponto amostral em cada mês de coleta, com botões florais obtidos de cinco inflorescências diferentes por ponto.

Aleitura das lâminas teve por objetivo observar a presença de tétrades e possíveis variações, como tríades e diádes, com e/ou sem a presença de micronúcleos. A escolha do estágio de tétrade para pesquisa de micronúcleo se deu pelo fato de que neste estágio a célula encontra-se em interfase (não divisão), o que facilita a visualização do núcleo e do possível micronúcleo existente. Os micronúcleos são núcleos adicionais e separados do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a divisão celular. Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais (CARRARD *et al.*, 2007).

A contagem das células foi realizada sob microscopia óptica, com aumento de 400X. Foi estimado um total de 300 tétrades por lâmina e, consequentemente, 1500 por ponto amostral. Nessa análise, foram comparados os números de tétrades (e variações) com micronúcleos e sem micronúcleos. As tétrades com micronúcleos encontradas em cada lâmina foram contadas e, em seguida, fotografadas.

## 2.4 Análise estatística

As frequências de micronúcleos nos cinco pontos amostrais, durante os três meses de estudo, foram comparadas através da análise de variância (ANOVA *one-way*), seguido pelo teste de Tukey. O teste de Tukey é necessário quando se conclui que existe diferença entre as médias de tratamentos analisados na análise de variância, pois completa a análise, comparando e mostrando o resultado de todas as combinações de pares de médias (OGLIARI & PACHECO, 2011). Para todas as análises estatísticas, foi utilizado o software *Statistica* vs 8, e o nível de significância foi fixado em 5% ( $p<0,05$ ).

## 3 | RESULTADOS

### 3.1 Caracterização dos pontos amostrais

O canteiro ornamentado com *Tradescantia pallida* no Ponto 1, localizado dentro do Cemitério Municipal de Joinville, encontra-se a cerca de 140 metros de distância da rua Ottokar Doerffel. Próximo ao canteiro, o fluxo de veículos se restringe aos visitantes do local, porém na rua principal há um fluxo contínuo de veículos, já que é uma via de acesso a BR 101. Além disso, a cerca de 500 metros do ponto amostral, localiza-se a rodoviária de Joinville, que opera diariamente com uma frota de ônibus vindos de destinos intermunicipais e interestaduais. O Ponto 2 fica a cerca de cinco metros da rua São Paulo, no bairro Bucarein. Essa rua possui um fluxo de veículos alto e contínuo, pois é uma via de acesso que liga a zona Sul ao centro da cidade. Possui uma faixa exclusiva para o transporte público da cidade passando a poucos metros do canteiro utilizado para coleta.

Já o Ponto 3, localizado no Mercado Público Municipal Germano Kurt Freisler, fica a aproximadamente 20 metros da avenida Dr. Paulo Medeiros, uma via com grande fluxo de veículos o dia todo. Próximo a esse canteiro, localiza-se uma grande empresa do segmento metal mecânico. O Ponto 4 fica localizado na rua Albano Schmidt, bairro Boa Vista/Zona Industrial, local que conta com diversas empresas de diferentes ramos, como metalúrgico, fabricação de embalagens e de gases industriais. A poucos metros do canteiro existe um semáforo e um ponto de parada de ônibus. Há um terminal de ônibus municipal a cerca de 300 metros do canteiro.

Por fim, o canteiro ornamentado do Ponto 5 fica a aproximadamente 10 metros da rua Dr. João Colin. Essa rua é uma das principais vias de acesso para a Zona Industrial Norte, portanto possui um fluxo de veículos constante, além de contar com faixa exclusiva para o transporte público da cidade passando a poucos metros do canteiro utilizado para coleta.

### 3.2 Caracterização do clima nos meses amostrados

Os dados obtidos no presente estudo permitiram evidenciar diferenças nas três estações do ano abrangidas (Verão, Outono e Inverno), que podem ter sofrido influência de diferentes fatores. Joinville tem variação sazonal extrema no que diz respeito a temperatura e sensação de umidade. Já a precipitação é característica do ano inteiro, sendo esta uma das regiões de Santa Catarina que apresenta os maiores índices de pluviosidade. Os meses de verão são os que apresentam os maiores índices pluviométricos do município, já nos meses de inverno, há uma redução significativa das chuvas. Entretanto, como se trata de uma região em que o clima é classificado como mesotérmico úmido, não há estação seca definida (SAMA, 2016). Na figura 3 é apresentado o gráfico com a precipitação média mensal para o

município de Joinville nos meses amostrados e a relação com a frequência de MCN em cada mês. As informações obtidas a partir do gráfico corroboram com a literatura, demonstrando que há um declínio no índice pluviométrico com as mudanças de estações. O mês de Janeiro apresentou uma média diária de precipitação de 14,48 mm, Abril apresentou média diária de precipitação de 5,06 mm e Julho apresentou a menor média diária de precipitação do estudo, 1,42 mm. Os dados apresentados foram obtidos com o Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira (CCJ).

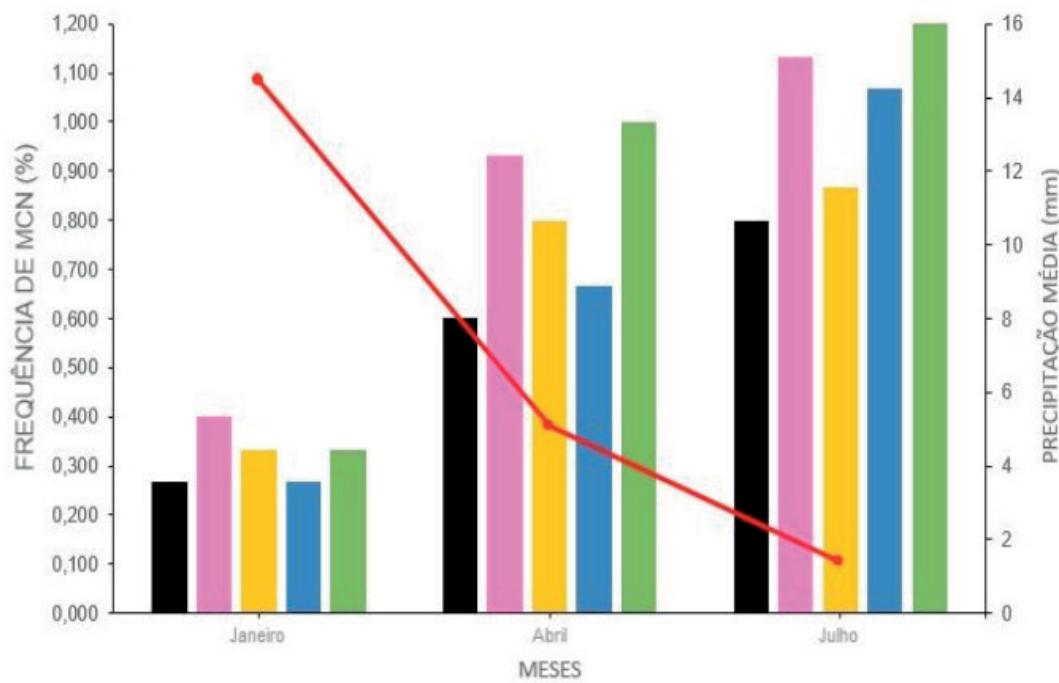


Figura 3. Precipitação média mensal para o município de Joinville nos meses amostrados e a relação com a frequência de MCN em cada mês.

No que diz respeito a temperatura, os maiores índices para o município de Joinville são observados nos primeiros meses do ano, onde as médias mensais apresentam-se acima de 25°C. As temperaturas mais baixas ocorrem entre os meses de junho a setembro, onde as médias mensais não ultrapassam os 20°C (SAMA, 2016). Na figura 4 é apresentado o gráfico com a temperatura média mensal para o município de Joinville nos meses amostrados e a relação com a frequência de MCN em cada mês. O mês de Janeiro apresentou temperatura média mínima de 23,5 °C e máxima de 29,1 °C. Já Abril apresentou temperatura média mínima de 21,2 °C e máxima de 27,5 °C. Por fim, Julho apresentou temperatura média mínima de 15,8 °C e máxima de 21,2 °C.

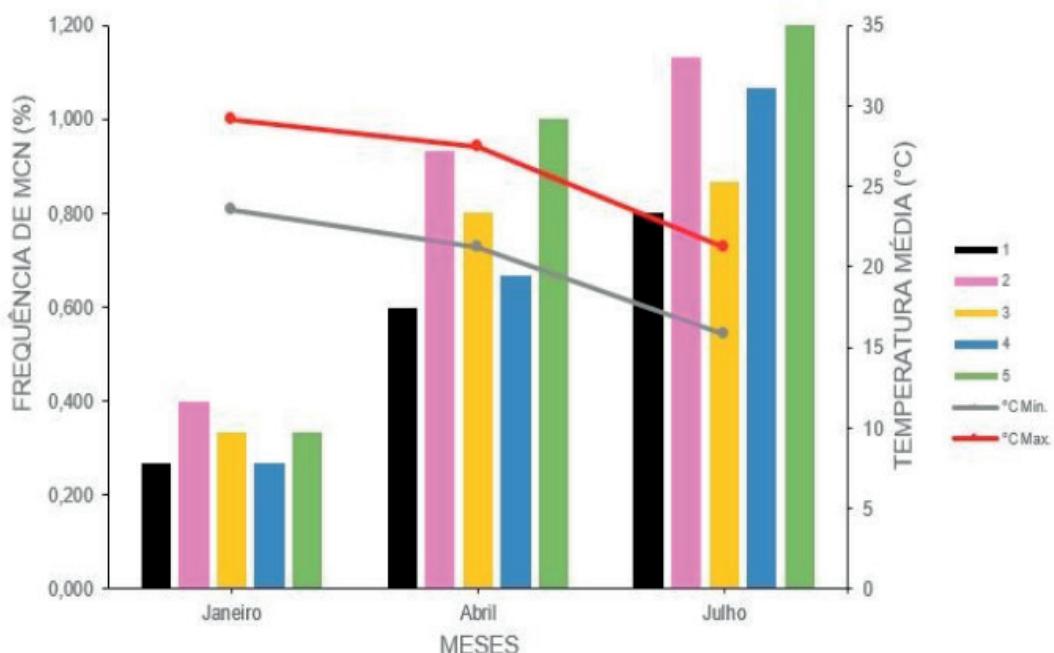


Figura 4. Temperatura (Máxima e Mínima) média mensal para o município de Joinville nos meses amostrados e a relação com a frequência de MCN em cada mês.

### 3.3 Análise Citogenética

Foram encontrados micronúcleos nos cinco pontos amostrais, nos três meses de análise, porém em baixas frequências. Os resultados obtidos a partir da análise da frequência de formação de micronúcleos em *T. pallida* nos diferentes tratamentos avaliados são apresentados na Tabela 1, mostrada a seguir. Nessa tabela, são apresentados os resultados observados em cada lâmina, onde foram analisadas o total de 300 tétrades e variações.

Pontos Amostrais	Janeiro			Abril			Julho	
	Lam.	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	
Ponto 1	1º	0	0,000	2	0,667	2	0,667	
	2º	4	1,333	0	0,000	3	1,000	
	3º	0	0,000	5	1,667	5	1,667	
	4º	0	0,000	1	0,333	0	0,000	
	5º	0	0,000	1	0,333	2	0,667	
Ponto 2	1º	2	0,667	0	0,000	6	2,000	
	2º	1	0,333	6	2,000	0	0,000	
	3º	0	0,000	3	1,000	3	1,000	
	4º	3	1,000	1	0,333	5	1,667	
	5º	0	0,000	4	1,333	3	1,000	

<b>Ponto 3</b>	1º	1	0,333	1	0,333	1	0,333
	2º	4	1,333	1	0,333	0	0,000
	3º	0	0,000	7	2,333	7	2,333
	4º	0	0,000	0	0,000	1	0,333
	5º	0	0,000	3	1,000	4	1,333
<b>Ponto 4</b>	1º	0	0,000	0	0,000	4	1,333
	2º	2	0,667	0	0,000	5	1,667
	3º	1	0,333	8	2,667	0	0,000
	4º	0	0,000	0	0,000	7	2,333
	5º	1	0,333	2	0,667	0	0,000
<b>Ponto 5</b>	1º	2	0,667	3	1,000	3	1,000
	2º	2	0,667	2	0,667	6	2,000
	3º	0	0,000	6	2,000	7	2,333
	4º	0	0,000	4	1,333	2	0,667
	5º	1	0,333	0	0,000	0	0,000

Tabela 1. Número (N) e frequência (Freq.) de MCN observados em cada lâmina (Lam.) durante os meses de exposição no município de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

A análise estatística revelou que a frequência média de MCN, em todo período de monitoramento, foi maior nas plantas do ponto 5 (0,84%), seguido pelo ponto 2 (0,82%), pontos 3 e 4 não apresentaram diferenças entre si na frequência de MCN (0,67%) e, por fim, ponto 1 (0,56%). Portanto, a dinâmica da poluição demonstrada pela frequência média de MCN nas diferentes localidades sugere o seguinte gradiente de poluição: Ponto 5 > Ponto 2 > Ponto 3 e 4 > Ponto 1.

Quando comparada a frequência de MCN considerando os meses de estudo, Julho apresentou a maior frequência média de MCN (1,01%), seguindo do mês de Abril (0,80%) e Janeiro (0,32%). As frequências médias de micronúcleos nos pontos amostrais, ao longo dos três meses de coleta, são apresentadas na Figura 5.

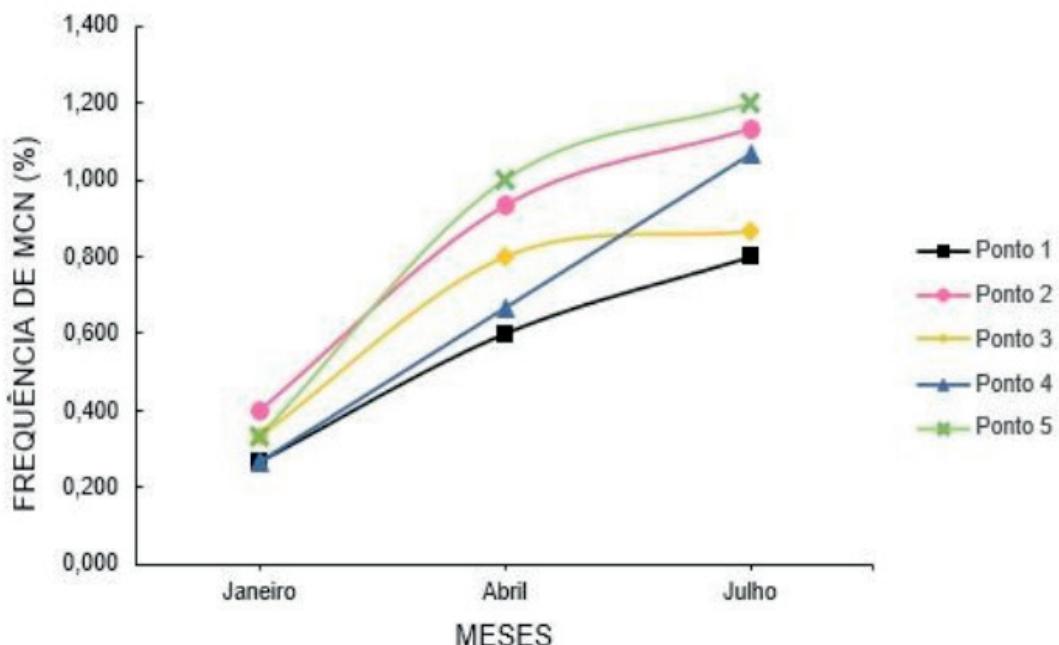


Figura 5. Frequência média de MCN a cada 100 tétrades nos cinco pontos amostrais, durante os meses de exposição no município de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

A Tabela 2 apresenta os resultados da Análise de Variância. Verifica-se que houve diferença significativa entre os meses de estudo ( $F_{(2)} = 6,26$ ;  $p = 0,003$ ), mas não houve diferença entre os pontos amostrais quando comparados entre si ( $F_{(4)} = 0,36$ ;  $p = 0,831$ ). A interação entre pontos amostrais e meses analisados não foi significativa ( $F_{(14)} = 0,92$ ;  $p = 0,538$ ), indicando que o padrão encontrado para os pontos amostrais se manteve constante ao longo dos meses.

Causa da Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Ponto	7,8666	4	1,9666	0,36	0,831
Mês	56,7466	2	28,3733	6,26	0,003
Ponto x Mês	67,8666	14	4,8476	0,92	0,538

Tabela 2. Resultados da análise de variância em arranjo fatorial 5x3 (cinco pontos amostrais e três meses).

A avaliação estatística das diferenças nas frequências médias de micronúcleos (MCN/100 células), observadas nas plantas dos diferentes pontos amostrais, feita com o uso do Teste de Tukey, mostra que entre os pontos amostrais, não houve diferença significativa, como observado na Tabela 3. Já para os meses de estudo, quando aplicado o Teste de Tukey, observa-se uma tendência de aumento na frequência média de MCN no decorrer dos três meses avaliados (Tabela 4), Janeiro apresentou uma média de frequência de micronúcleos significativamente menor que os demais meses ( $p < 0,05$ ). A figura 8 ilustra bem a interação entre os pontos amostrais e os meses de estudos.

Ponto Amostral	Frequência de MCN (média ± desvio padrão)
Ponto 1	1,66 ± 1,84
Ponto 2	2,46 ± 2,13
Ponto 3	2,00 ± 2,45
Ponto 4	2,00 ± 2,72
Ponto 5	2,53 ± 2,32

Tabela 3. Frequência média de micronúcleos (MCN/100 tétrades) em *Tradescantia pallida* exposta nos cinco pontos amostrais na cidade de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Mês	Frequência de MCN (média ± desvio padrão)
Janeiro	0,96 ± 1,27
Abril	2,40 ± 2,43
Julho	3,04 ± 2,46

Tabela 4. Frequência média de micronúcleos (MCN/100 tétrades) em *Tradescantia pallida* no período de estudo na cidade de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

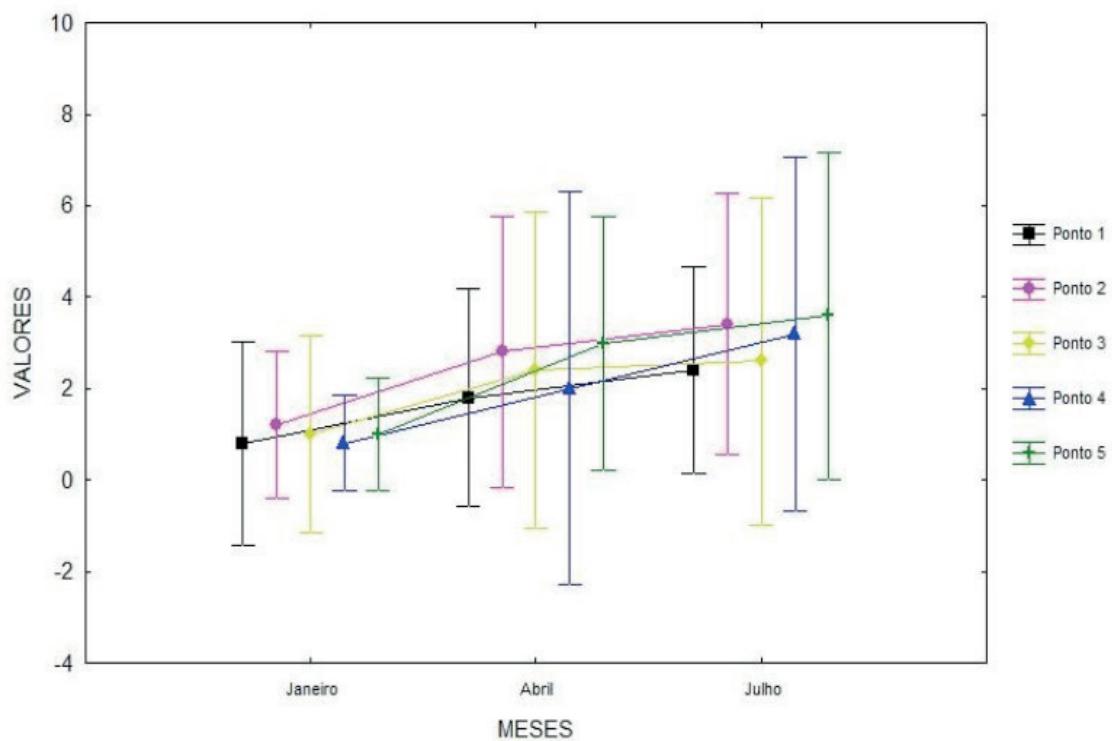


Figura 6. Gráfico de médias e intervalo de confiança nos cinco pontos amostrais, durante os três meses de exposição no município de Joinville, Santa Catarina, Brasil.

## 4 | DISCUSSÃO

A poluição atmosférica no Brasil é causada principalmente por queima de combustível fóssil derivado de fontes móveis, como frota de veículos automotores, ou por fontes fixas, como emissão por meio de produção industrial (CHAVES,

2017). Barcellos *et al.* (2005), realizaram um estudo que analisou a poluição do ar atmosférico por fontes fixas nos municípios brasileiros. Os autores concluíram que na região Sul, o estado com maior proporção de municípios com ocorrência de poluição do ar por atividade industrial foi Santa Catarina.

Como não há uma rede de monitoramento de ar no município de Joinville, nenhum dado preliminar referente à qualidade do mesmo foi encontrado. Apesar disso, estudos sobre a qualidade do ar atmosférico utilizando-se de biomonitoramento com vegetais já foram realizados no município. Melo Júnior *et al.* (2014) investigaram atributos foliares de *Tibouchina granulosa* (Melastomataceae) em três áreas distintas, com o objetivo de verificar a ocorrência de alterações morfológicas e anatômicas decorrentes de poluição atmosférica. As principais alterações encontradas pelos autores foram relacionadas a área foliar, espessura dos tecidos fotossintéticos e espessura total do limbo foliar. Os resultados obtidos demonstraram que as variações estruturais observadas entre as plantas localizadas nas áreas poluídas que foram analisadas decorreram de injúrias provocadas pela presença de gases poluentes na atmosfera. Nesse mesmo sentido e analisando os mesmos atributos, Cavallaro *et al.* (2018) avaliaram o efeito de material particulado sobre populações de *Inga edulis* (Fabaceae) em duas áreas amostrais na região urbana de Joinville, uma poluída e uma controle. Os autores observaram maior quantidade de material particulado depositado sobre as folhas nos indivíduos da área poluída e todos os atributos biológicos analisados diferiram entre as áreas poluída e controle. Em Santa Catarina, Alves (2017) avaliou a qualidade do ar no município de Criciúma utilizando o bioensaio Trad-MCN. Durante o período de estudo, a autora verificou que fatores climáticos como a não precipitação e os ventos contribuíram para aumento da frequência de micronúcleos entre os meses de exposição.

Segundo Costa e Droste (2012) e Sposito *et al.* (2015 e 2017), a maior incidência de danos genéticos em plantas bioindicadoras está associada a áreas urbanas com grandes frotas de veículos e altas concentrações de poluentes atmosféricos. Apesar de Joinville apresentar essas características, o presente estudo não apresentou uma alta sensibilidade de *T. pallida* a agentes genotóxicos. Steffensen (1955) relata em seu estudo que essa espécie possui uma taxa espontânea de 0,84% de formação de micronúcleos e, em nenhum ponto amostral, quando calculada a frequência média de todos os meses, as taxas de MCN obtidas excederam esse valor. Ainda que, no geral, esse estudo apresente uma baixa frequência de MCN, o ensaio Trad-MCN identificou diferenças consideráveis nos diferentes pontos amostrais. Onde pontos amostrais onde há um intenso tráfego de veículos (pontos amostrais 2 e 5) apresentaram uma maior frequência de MCN em relação aos pontos amostrais nas áreas expostas a poluição industrial (pontos amostrais 3 e 4).

Vários autores já confirmaram a alta sensibilidade da *T. pallida* aos poluentes

atmosféricos emitidos por veículos automotores. Um estudo realizado por Carreras *et al.* (2006), na cidade de Córdoba na Argentina, demonstrou suscetibilidade a uma maior frequência de MCN nas plantas mantidas em áreas sob a influência de emissões de tráfego veicular. Na Europa, Klumpp *et al.* (2006) também encontraram taxas aumentadas de MCN em inflorescências do clone 4430 de *Tradescantia* diretamente expostas a emissões pesadas de tráfego. Em São Paulo, vários estudos também confirmaram a alta sensibilidade das plantas de *Tradescantia* aos poluentes atmosféricos veiculares (BATALHA *et al.*, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2000 e 2004; FERREIRA *et al.*, 2003; DIAS, 2011; SAVÓIA *et al.*, 2009; TEIXEIRA & BARBÉRIO, 2012). A grande quantidade de veículos transitando pelas ruas de Joinville e a proximidade dos canteiros utilizados como pontos amostrais das vias públicas podem ter corroborado para a taxa de MCN encontrada em cada ponto amostral, tendo em vista que o ponto com menor frequência de MCN (ponto amostral 1) encontra-se a cerca de 140 metros de distância da rua principal. Já os dois pontos que apresentaram a maior frequência de MCN (pontos amostrais 2 e 5) encontram-se, respectivamente, a cinco e dez metros de distância da rua principal.

Fatores climáticos também podem influenciar na qualidade do ar em relação a concentração de gases poluentes. Umidade relativa do ar, vento, temperatura e precipitação são preditores significativos da formação de MCN (SAVÓIA *et al.*, 2009). Esses fatores podem dificultar a dispersão e levar ao aumento da concentração de alguns poluentes, como: monóxido de carbono, material particulado e dióxido de enxofre (DANTAS, 2015). A direção dos ventos é um fator importante para a dispersão dos poluentes, podendo diminuir a ocorrência de danos genéticos (ALVES *et al.*, 2003). O vento é um elemento climático que sofre muita interferência do relevo, ocasionando grandes variações de uma região para outra. Em Joinville, os morros do Boa Vista e do Iririú formam uma barreira natural entre o centro urbano, os bairros do norte e do oeste e os bairros do leste, sendo o principal fator determinante das diferenças climáticas e a circulação de vento entre estes segmentos da cidade (HACKENBERG & MATTOS, 1993). Fatores exclusivamente de origem antrópica também podem influenciar na ação dos poluentes atmosféricos em *T. pallida*, como a ventilação deficiente devido ao arranjo de ruas e prédios nas áreas urbanizadas e o congestionamento de veículos, que contribui para a dificuldade de dissipar rapidamente os agentes poluidores (CARRERAS *et al.*, 2006). Isidori *et al.* (2003) e Klumpp *et al.* (2004) provaram que as variáveis meteorológicas, principalmente a temperatura e precipitação, podem interferir na magnitude das taxas de MCN em resposta a agentes genotóxicos. No mesmo estudo, Isidori *et al.* (2003) relatam que a genotoxicidade depende da estação do ano. Os dados obtidos demonstraram que a frequência de MCN foi maior no inverno do que no verão. Esses resultados não são exclusivos desse estudo. Diversos autores descrevem as estações mais frias como

as que apresentam maior frequência de MCN em suas pesquisas (ALVES, 2017; CAMPOS JUNIOR & KERR, 2009; SAVÓIA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2013).

Os estudos realizados com vegetais apresentam uma série de vantagens que os tornam ideais para serem utilizados em países em desenvolvimento (CARVALHO, 2005). Embora os efeitos genotóxicos detectados pelos testes de *Tradescantia* não possam ser associados à mutagênese - ou mesmo à carcinogênese em seres humanos. Esses bioensaios são ferramentas muito úteis para o rastreamento do potencial mutagênico no ambiente (MA *et al.*, 1994). O bioensaio com Trad-MCN tem sido amplamente utilizado para monitorar a genotoxicidade ambiental e é particularmente sensível a mutações químicas (CARRERAS, 2006). Portanto, apesar de o presente estudo não ter indicado um aumento na frequência de MCN por poluentes atmosféricos, o teste de micronúcleo *Tradescantia* demonstra ser uma ferramenta adequada para monitorar o potencial genotóxico da poluição atmosférica urbana.

## 5 | CONCLUSÃO

Apesar de Joinville ser uma forte potência industrial do estado e uma região em constante desenvolvimento, os dados obtidos revelam que a poluição do ar atmosférico não se mostrou causadora de um aumento na frequência de MCN da planta em estudo. O município de Joinville carece de estudos que meçam a qualidade do ar atmosférico. Dada a importância econômica da cidade e o número elevado de habitantes, mais estudos nessa mesma linha de pesquisa devem ser realizados para diagnosticar a qualidade do ar na cidade e para que seja possível propor medidas preventivas para minimizar os danos ao meio ambiente e os possíveis danos à saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- Alves, C. D. Biomonitoramento da qualidade do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Runt no campus da Universidade do Extremo Sul Catarinense no Município de Criciúma, Santa Catarina, Brasil [Monografia]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2017.
- Barbério, A., J. C. Voltolini & M. C. L. Ribeiro. Efeitos mutagênicos da poluição atmosférica em *Tradescantia pallida* no distrito de Moreira César, em Pindamonhangaba, SP. Revista Biociências. 2013; 19(1): 69-79.
- Barcellos, F. C., R. A. Moreno, L. C. D. Silva & L. A. Silva. Poluição do ar por fontes fixas nos Municípios brasileiros. Anais. Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica. Brasília, DF. 20 p. 2005.
- Batalha, J. R. F., E. T. Guimarães, D. J. A. Lobo, A. F J. F. C. Lichtenfels, T. Deur, H. A. Carvalho, E. S. Alves, M. Domingos, G. S. Rodrigues & P. H. N. Saldíva. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research.

1999; 426: 229-232.

Braga, A., G. M. Böhm, L. A. A. Pereira & P. Saldiva. Poluição atmosférica e saúde humana. Revista USP. 2001; 51: 58-71.

Braga, A., L. A. A. Pereira & P. Saldiva. Poluição atmosférica e seus efeitos na saúde humana. Anais. Sustentabilidade na Geração e uso de Energia. Campinas, São Paulo. 2002.

Campos Junior, E.O & W. E. Kerr. Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* aplicado ao Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia. Horizonte Científico. 2009; 3(2): 1-18.

Caon, K., G. M. Costa, M. B. B. Cassanego & A. Droste. *Tradescantia pallida* var. *purpurea* (Commelinaceae) e biomonitoramento da genotoxicidade do ar no município de Caxias do Sul, RS, Brasil. Instituto Anchietano de Pesquisas. 2016; 69: 279-291.

Carreras, H. A., M. L. Pignata & P. H. N. Saldiva. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. Atmospheric Environment. 2006; 40(40): 7824–7830. doi: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.07.031>

Carrard, V. C., C. H. Costa, L. A. Ferreira, I. da S. Lauxen & P. V. Rados. Teste dos micronúcleos – um bioindicador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. 2007; 48(1/3): 77-81.

Carvalho, H. de A. A *Tradescantia* como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. Radiologia Brasileira. 2005; 38(6): 459-462. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842005000600015>

Castro, L. F. & H. A. Sisenando. Monitoramento da qualidade do ar por meio do ensaio com *Tradescantia pallida* na cidade do Rio de Janeiro/Brasil. Revinter. 2017; 10(3): 101-115. doi: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol10ed3.313>

Cavallaro, R., J. C. F. de Melo Júnior, M. Bonatti-Chaves & G. D. R. Renner. Avaliação do efeito da poluição atmosférica em populações urbanas de *Inga edulis* Mart. (Fabaceae) por meio do método de biomonitoramento passivo. Caderno de Publicações Univag. 2018; 8: 85-108.

Chaves, T. F. Uma análise dos principais impactos ambientais verificados no estado de Santa Catarina. Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental. 2017; 5(2): 611-634.

Costa, G. M. & A. Droste. Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, Southern Brazil. Brazilian Journal of Biology. 2012; 72(4): 801-806. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000500004>

Dantas, C. B. Aplicabilidade dos testes Trad-MCN e parâmetros anatômicos foliares de *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. HUNT var. *purpurea* associados ao tráfego veicular diferenciado em cidade de clima tropical de altitude [Monografia]. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados; 2015.

Dias, A. C. Avaliação da capacidade mutagênica da poluição do ar utilizando o Bioensaio Trad-MCN com *Tradescantia pallida* em parques urbanos da cidade de São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

Ellenberg, H. Bioindicators and biological monitoring. In: Ellenberg, H., U. Arndt, R. Bretthauer, B. Ruthsatz, L. Steubing. Biological monitoring, signals from the environment. Eschborn: VIEWEG; 1991. P. 13-127.

Evans, H. J., G. J. Neary & F. S. Williamson. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in

Ferreira, M. I., G. S. Rodrigues, M. Domingos & P. H. N. Saldiva. In situ monitoring of mutagenicity of air pollutants in São Paulo city using *Tradescantia*-SHM bioassay. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2003; 46(2): 253-258. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132003000200017>

Fundação IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Infográficos: frota municipal de veículos de Joinville. [Acesso em 29 de setembro de 2018]. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/2vt00>

Gorni, P. H., C. R. Guandalini, Z. V. Silveira & F. T. Nakayama. Efeito do lodo de curtume na frequência de micronúcleos no bioindicador *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea*. Brazilian Journal of Biosystems Engineering. 2014; 8(4): 361-373. doi: <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2014v8n4p361-373>

Grant, W. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. Mutation Research. 1994; 310: 175-85. doi: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0)

Guimarães, E. T., M. Domingos, E. S. Alves, N. Caldini Junior, D. J. A. Lobo, A. J. F. C. Lichtenfels & P. H. N. Saldiva. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. Environmental and Experimental Botany. 2000; 44(1): 1-8. doi: [10.1016/S0098-8472\(00\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00050-2)

Guimarães, E. T., M. Macchione, D. J. A. Lobo, M. Domingos & P. H. N. Saldiva. Evaluation of the mutagenic potential of urban air pollution in São Paulo, Southeastern Brazil, using *Tradescantia* stamen-hair assay. Environmental Toxicology. 2004; 19(6): 578-584. doi: <https://doi.org/10.1002/tox.20065>

Hackenberg, A. M. & A. Mattos, Arthur. Diferenças climáticas na cidade de Joinville. Anais. Encontro Nacional de Conforto no Ambiente Construído. Florianópolis, SC. p. 217-225. 1993.

Isidori, M., M. Ferrara, M. Lavorgna, A. Nardelli & A. Parrella. *In situ* monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs). Chemosphere. 2003; 52: 121-126. doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00183-8)

Klumpp, A., W. Ansel, A. Fomin, S. Schnirring & C. Pickl. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. Hereditas. 2004; 141: 142-148. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01806.x>

Klumpp, A., W. Ansel, G. Klumpp, V. Calatayud, J. P. Garrec, S. He, J. Peñuelas, À. Ribas, H. Rø-Poulsen, S. Rasmussen, M. J. Sanz & P. Vergne. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. Environmental Pollution. 2006; 139(3): 515-522. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.021>

Lira, O. F. C., N. N. de Almeida, W. L. Peres & W. S. dos Santos. Projeto Piloto de Biomonitoramento com *Tradescantia pallida* em municípios com Alto Risco Ambiental. Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso. Superintendência de Vigilância em Saúde. Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental. Cuiabá; 2008.

Ma, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. Environmental Health Perspectives. 1981; 37(1): 85-90.

Ma, T. H., G. L. Cabrera, R. Chen, B. S. Gill, S. S. Sandhu, A. L. Vandenberg & M. F. Salamone. *Tradescantia* micronucleus bioassay. Mutation Research. 1994; 310: 221-230.

Melo Júnior, J. C. F., C. M. Raimundo & M. W. Amorim. Efeito da poluição atmosférica em folhas de *Tibouchina granulosa* (Desr.) Cogn. (Melastomataceae). Acta Biológica Catarinense. 2014; 1(1): 65-

Ogliari, P. J. & J. A. Pacheco. Análise estatística usando o Statistica 6.0. Apostila do Departamento de Informática e Estatística da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

Pereira, B. B., E. O. de Campos Júnior & S. Morelli. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlandia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013; 87: 17–22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.003>

Savóia, E. J. L., M. Domingos, E. T. Guimarães, F. Brumati & P. H. N. Saldiva. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72(1): 255-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.03.019>

Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente - SAMA. Área urbana consolidada de Joinville: Diagnóstico socioambiental. Joinville; 2016.

Secretaria de Planejamento Urbano e Desenvolvimento Sustentável - SEPUD. Cidade em Dados: Promoção Econômica. Joinville; 2018.

Silva, J. S. Efeitos genotóxicos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* induzidos por poluentes atmosféricos na cidade do Salvador-BA [Monografia]. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira De Santana; 2005.

Sposito, J. C. V., B. A. Crispim, R. M. Mussury & A. B. Grisolia. Genetic instability in plants associated with vehicular traffic and climatic variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015; 120: 445-448. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.031>

Sposito, J. C. V., B. do A. Crispim, A. I. Romān, R. M. Mussury, J. G. Pereira, L. O. Seno & A. B. Grisolia. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallida*. *Chemosphere*. 2017; 175: 108-113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.136>

Steffensen, D. Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1955; 41: 155-160.

Teixeira, M. C. V. & A. Barbério. Biomonitoramento do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var. *purpurea* Boom (Commelinaceae). *Revista Ambiente & Água*. 2012; 7(3): 279-292. doi: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.982>

## GENOTIPAGEM DO CYP2C9 PARA ENSAIOS FARMACOGENÉTICOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA: ESTUDO PILOTO

Data de aceite: 12/12/2019

Data da submissão: 03/11/2019

**Bruna Bolani**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/5076743485752429>

**Gabriela de Moraes Oliveira**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/9677132372524071>

**Giovana Maria Weckwerth**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/9377120043903358>

**Lohayne Berlato Ferrari**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/2454853727763069>

**Núbia Vieira Alves**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/3027282254743058>

**Thiago José Dionísio**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/7756206930741476>

**Flávio Augusto Cardoso de Faria**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/9538141003060149>

**Carlos Ferreira dos Santos**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/1118405999427008>

**Adriana Maria Calvo**  
Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo  
Bauru – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/4032581536953123>

**RESUMO:** O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) está associado a reações adversas sérias aos fármacos e fatores genéticos estão entre os aspectos que podem

influenciar a resposta individual. O CYP2C9 é um gene altamente polimórfico, membro da superfamília do citocromo P450 e responsável, entre outros genes, pela codificação de enzimas que metabolizam a maioria dos AINEs. A literatura aponta que variantes desse gene implicam na diminuição da metabolização dos AINEs, aumentando a possibilidade de efeitos adversos. Assim, é extremamente importante entender as variações genéticas para permitir a personalização da terapia medicamentosa, garantindo eficácia satisfatória e efeitos colaterais mínimos. Esta é uma realidade em várias áreas da medicina e odontologia. O objetivo deste estudo foi genotipar o CYP2C9 e suas variantes alélicas mais relevantes clinicamente (CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3). Para isso, o DNA Extract All Reagents Kit (número de catálogo 4402616, Applied Biosystems®) foi utilizado em amostras de saliva congelada de 50 voluntários e a genotipagem do CYP2C9 foi realizada pela detecção de single nucleotide polymorphism (SNP) pela técnica de PCR em tempo real com ensaios pré-fabricados e validados pela Thermo Fisher® (catálogo C\_2562505\_10 e C\_27104892\_10). Os resultados obtidos foram 32 homozigotos ancestrais (CYP2C9 \*1/\*1), correspondendo a 64% da amostra, e 18 voluntários mutados para o CYP2C9, 36% da amostra. As variantes encontradas para o CYP2C9 foram: CYP2C9 \*1/\*2 (11 voluntários), CYP2C9 \*2/\*2 (2 voluntários), CYP2C9 \*1/\*3 (4 voluntários) e CYP2C9 \*2/\*3 (1 voluntário). Os percentuais encontrados parecem concordar com dados prévios da literatura. A população brasileira é altamente heterogênea e mista, cada região do país constituindo um histórico populacional distinto e modelos farmacogenéticos pré-estabelecidos não representam adequadamente a população brasileira. Portanto, a investigação dessas variantes genéticas orienta quanto ao fármaco e dosagem mais adequados para cada paciente, reduzindo o risco de efeitos adversos.

**PALAVRAS-CHAVE:** AINE. CYP2C9. Genotipagem.

## CYP2C9 GENOTYPING FOR PHARMACOGENETIC TRIALS FROM SALIVA SAMPLES: A PILOT STUDY

**ABSTRACT:** Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) use is associated with serious adverse drug reactions and genetic factors are among the aspects that can influence the individual response. CYP2C9 is a gene, member of P450 cytochrome superfamily, that are responsible, among other genes, for the codification of enzymes that metabolizes most of NSAIDs and is highly polymorphic. Literature points that variants in this gene imply in decrease of NSAIDs metabolism, increasing the possibility of adverse effects. Thus, it is extremely important understand the genetic variations to allow the personalization of drug therapy, guaranteeing satisfactory effectiveness and minimal side effects. This is a reality in several areas in medicine and dentistry. The aim of this study was genotyping CYP2C9 and its most clinically relevant allelic variants (CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3). For this, the DNA Extract All Reagents Kit (catalog number 4402616, Applied Biosystems®) was used in frozen saliva samples from 50 volunteers and genotyping of CYP2C9 was performed by the detection of single nucleotide polymorphism (SNP) by real-time PCR technique with pre-fabricated

and validated tests by Thermo Fisher® (catalog C\_2562505\_10 and C\_27104892\_10). The results obtained were 32 ancestral homozygous (CYP2C9\*1/\*1), corresponding to 64% of the sample, and 18 volunteers mutated for CYP2C9, 36% of the sample. The variants found for CYP2C9 were: CYP2C9\*1/\*2 (11 volunteers), CYP2C9\*2/\*2 (2 volunteers), CYP2C9\*1/\*3 (4 volunteers) and CYP2C9\*2/\*3 (1 volunteer). The percentages found seem to agree with previous literature data. The Brazilian population is highly heterogeneous and mixed, each region of the country constituting a distinct population history and pre-established pharmacogenetic models do not adequately represent the Brazilian population. Therefore, the investigation of these genetic variants guides to the most appropriate drug and dosage for each patient, reducing the risk of adverse effects.

**KEYWORDS:** NSAID. CYP2C9. Genotyping.

## 1 | INTRODUÇÃO

A individualização das prescrições de medicamentos ganhou interesse no campo da pesquisa farmacológica devido a necessidade de minimizar os efeitos adversos e tornou-se realidade em vários países. De acordo com um estudo de 2001 realizado nos Estados Unidos, os anti-inflamatórios não esteróidais (AINEs) representavam 70 milhões de prescrições e 30 bilhões de AINEs sem receita eram vendidos anualmente (GREEN, 2001; ROLLASON et al., 2014). Além disso, de acordo com dados e estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de vários países, alguns AINEs estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo (SOLEIMANPOUR et al., 2016).

O uso de AINEs está associado a reações adversas graves, principalmente nos sistemas gastrointestinal, renal e cardiovascular, incluindo dor de estômago, sangramento gastrointestinal, úlceras, hipercalemia, insuficiência renal aguda, hipernatremia, taxa de filtração glomerular prejudicada e edema (GREEN, 2001; WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012; ROLLASON et al., 2014; SOLEIMANPOUR et al., 2016). Embora vários fatores possam influenciar as respostas individuais aos medicamentos, como idade, sexo, peso, histórico médico, estilo de vida e interações medicamentosas, fatores genéticos também podem alterar a farmacocinética (PK) e a farmacodinâmica (PD) dos fármacos, modificando os perfis de toxicidade e eficácia (ROLLASON et al., 2008, 2014; WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012).

Devido ao amplo uso de AINEs e aos efeitos adversos associados, é fundamental entender as variações genéticas individuais e promover a dosagem individualizada (WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012; ROLLASON et al., 2014). No entanto, a personalização da terapia medicamentosa provavelmente não será universalmente adotada devido aos custos dos testes farmacogenéticos (WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012). Portanto, metodologias que minimizam o custo, o tempo

e a dificuldade dos testes farmacogenéticos antes da prescrição de medicamentos têm sido amplamente estudados.

Os efeitos dos polimorfismos genéticos são descritos para a maioria dos parâmetros farmacológicos de PK e PD (WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012; ROLLASON et al., 2014). CYP2C9, parte do citocromo P450, metaboliza aproximadamente 15% dos medicamentos disponíveis comercialmente, incluindo a maioria dos AINEs, e é altamente polimórfico, com 56 variantes alélicas e várias subunidades caracterizadas (PERINI et al., 2005; ZHOU; ZHOU; HUANG, 2010; WYATT; PETTIT; HARIRFOROOSH, 2012; ROLLASON et al., 2014). Neste estudo, avaliamos o CYP2C9\*2 (430C → T, rs1799853) e o CYP2C9\*3 (1075A → C, rs1057910), presentes em diferentes grupos étnicos com frequências variadas. A população brasileira é altamente heterogênea, portanto, não é apropriado usar dados farmacogenéticos gerados a partir de grupos étnicos homogêneos, visto que cada região do país tem um histórico populacional diferente (SUAREZ-KURTZ et al., 2012).

Neste estudo, genotipamos voluntários para os polimorfos clinicamente relevantes do CYP2C9, CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3, usando um método rápido e eficiente, visando criar um banco de dados para futuros estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. A saliva foi escolhida como fonte de DNA por várias razões, incluindo facilidade de coleta, baixo custo, natureza não invasiva e indolor, baixo risco de infecção (MURUGANANDHAN; SIVAKUMAR, 2011; NEMODA et al., 2011; ABRAHAM et al., 2012; CALVO et al., 2016; GARBieri et al., 2017). A saliva contém vários tipos de células, incluindo células epiteliais descamadas e leucócitos, dos quais o DNA genômico pode ser extraído para genotipagem (MURUGANANDHAN; SIVAKUMAR, 2011; GARBieri et al., 2017).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos laboratoriais desta pesquisa foram integralmente realizados no laboratório das disciplinas de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

### 2.1 Seleção dos participantes da pesquisa

Foram selecionados 50 voluntários, entre 18 e 60 anos, em tratamento no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (LAFFIC - FOB/USP). Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB - USP

(CAAE: 88326918.3.0000.5417).

Os critérios usados para selecionar os participantes foram bom estado de saúde geral, ausência de infecção ou inflamação e inexistência de doenças sistêmicas. Tais parâmetros foram determinados através da aplicação de um questionário oral prévio. Os critérios para exclusão foram gravidez ou lactação, existência de doenças sistêmicas, inflamação ou infecção em curso, histórico de sangramento gastrointestinal ou ulceração, presença de doenças cardiovasculares, renais ou hepáticas, além do uso de medicamentos antidepressivos, diuréticos ou anticoagulantes e histórico de alergia a AINEs.

## 2.2 Coleta de saliva

Após a explicação do projeto, aplicação do questionário oral e assinatura do TCLE, os participantes receberam um tubo falcon de 50 mL, dos quais 4 mL deveriam ser preenchidos com saliva. Para obtenção da maior quantidade possível de células imersas na saliva, foi orientado ao participante que esfregasse a língua contra a mucosa bucal por alguns segundos antes de realizar a coleta.

A amostra foi armazenada em gelo e, posteriormente, os 4 mL de saliva foram pipetados e distribuídos igualmente em tubos de microcentrífuga estéreis, com capacidade de 2 mL cada. Em seguida, as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer a - 20°C, onde foram mantidas até o momento de extração do DNA.

## 2.3 Extração de DNA genômico das amostras de saliva

Os tubos de microcentrífuga contendo as amostras de saliva foram descongelados em geladeira a 4°C e, em seguida, homogeneizados em agitador (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 18°C, durante 5 minutos (High-speed Micro Centrifuge CF16RN, Himac, Hitachi Koki Co., Ltda, Japão) e o sobrenadante foi retirado, deixando apenas o pellet.

Para a extração de DNA genômico a partir da saliva foi utilizado o DNA Extract All Reagents Kit (número de catálogo 4402616, Applied Biosystems®, Estados Unidos da América), conforme orientações do fabricante. O processo consiste nas seguintes etapas:

- I. Eluição do pellet em 200  $\mu$ L de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) e realização de vórtex em agitador;
- II. Logo após, 3  $\mu$ L das amostras devem ser pipetados para placas de 96 poços;
- III. Posteriormente, em cada um dos poços foi adicionado 20  $\mu$ L da solução

de lise celular do kit, que promove a lise das membranas celular e nuclear, expondo o material genético, e as placas foram levadas para a centrífuga a 2.000 rpm, a 18°C, durante 1 minuto;

IV. A placa, então, deve permanecer durante 3 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, devem ser adicionados a cada poço 20 µL da solução de estabilização de DNA do kit e as placas devem ser novamente centrifugadas a 2.000 rpm, a 18°C, durante 1 minuto.

## 2.4 Genotipagem do CYP2C9

Para a discriminação dos diferentes genótipos do CYP2C9 foi utilizado o sistema Taqman® no aparelho de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real ViiA 7 (Applied Biosystems®, Estados Unidos), assim como os ensaios produzidos e validados pela empresa Applied Biosystems®.

Os ensaios consistem na presença de quatro oligonucleotídeos, o primer Forward (que vai da posição 5' para a posição 3' do DNA), o primer Reverse (que vai da posição 3' para a posição 5' do DNA) e as Sondas (que também vão da posição 5' para a posição 3' do DNA).

Os primers Forward e Reverse flanqueiam a região do DNA que possui o polimorfismo e será amplificada pela técnica de PCR. As sondas, por sua vez, se anelam exatamente na região em que o polimorfismo pode existir, com uma delas marcada com o fluoróforo FAM e a outra marcada com o fluoróforo VIC. A única diferença entre as sondas é que uma possui a sequência de bases nitrogenadas considerada ancestral enquanto a outra possui praticamente a mesma sequência de bases, exceto por uma que caracteriza o polimorfismo. Qual das sondas corresponde a ancestral ou mutado é definido nas configurações do ViiA 7 antes da realização das ciclagens.

Assim, após o término do experimento, poderemos obter as seguintes situações:

- I. Apenas amplificação de fragmentos de DNA marcados com a sonda referente ao ancestral, indicando que o indivíduo é homozigoto ancestral para o gene em estudo, ou seja, não mutado.
- II. Amplificação somente de fragmentos de DNA marcados com a sonda referente ao polimorfismo, o que caracteriza indivíduo homozigoto mutado.
- III. Amplificação de fragmentos de DNA de ambas as sondas, assinalando um sujeito heterozigoto, ou seja, que apresenta o polimorfismo em apenas um dos alelos.

Dessa forma, o procedimento acima descrito consistiu na preparação de placas de 384 poços (número de catálogo 4343370, Applied Biosystems®, Estados Unidos) com os seguintes reagentes:

- I. TaqMan® GTxpress™ Master Mix (número de catálogo 4401892, Applied

Biosystems®, Estados Unidos), que possui parte das substâncias necessárias para a reação, dentre elas a enzima Taq polimerase, o cloreto de magnésio e as bases nitrogenadas.

II. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), que contém os primers e sondas necessários para cada polimorfismo testado, nesta pesquisa correspondendo ao CYP2C9\*2-rs1799853 (430C→T) e CYP2C9\*3-rs1057910 (1075A→C), números de catálogo C\_25625805\_10 e C\_27104892\_10, respectivamente.

III. Água ultrapura e a amostra contendo o DNA.

Esquematicamente, na Tabela 1 é possível observar a composição e quantidades da mistura de reagentes necessários para as reações de discriminação alélica.

Reagentes	Quantidade em $\mu$ L para uma reação
Amostra contendo DNA (10 ng/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
TaqMan® GTxpress™ Master Mix	5 $\mu$ L
SNP (primers e sondas)	0,5 $\mu$ L
Água ultrapura	2,5 $\mu$ L
<b>Volume final</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Tabela 1 – Composição de uma reação de discriminação alélica

Após a confecção dos ensaios, neste experimento realizados em duplicata, as duas placas de 384 poços, cada uma contendo os SNP de um dos polimorfismos, foram colocadas no aparelho ViiA 7. As seguintes condições de ciclagem foram utilizadas para a realização da PCR: temperatura inicial de 95 °C por 20 segundos para a ativação da Taq polimerase, em seguida 50 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 20 segundos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos de forma detalhada na Tabela 2. Não foram encontrados indivíduos homozigotos mutados para o CYP2C9\*3 e também não foram encontrados indivíduos que possuíssem ambas as mutações (CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3) em homozigose.

CYP2C9	%
CYP2C9 *1/*1	64 (n = 32)
CYP2C9 *1/*2	22 (n = 11)
CYP2C9 *2/*2	4 (n = 2)
CYP2C9 *1/*3	8 (n= 4)
CYP2C9 *3/*3	0 (n = 0)
CYP2C9*2/*3	2 (n =1)

Tabela 2 – Polimorfismos do CYP2C9 nos participantes da pesquisa (n = 50)

Dentre os participantes da pesquisa, 64% não possuíam os polimorfismos investigados no gene CYP2C9 (\*2 e \*3), sendo, portanto, homozigotos ancestrais (CYP2C9 \*1/\*1). Nos demais 36%, havia a presença de um ou ambos os polimorfismos estudados; 26% dos voluntários apresentaram os polimorfismos investigados para o CYP2C9\*2; 8% dos voluntários possuíam polimorfismo para o CYP2C9\*3; e, 2% dos voluntários apresentavam ambos os polimorfismos em heterozigoze (CYP2C9 \*2/\*3).

Esta pesquisa foi um estudo primário para rastrear possíveis voluntários para ensaios clínicos de farmacocinética e farmacodinâmica. No entanto, é importante destacar que a pesquisa não constitui um estudo populacional e não é adequada para separar os voluntários em grupos étnicos.

Levando em consideração estudos anteriormente realizados em relação ao CYP2C9 com a população brasileira, nossos dados parecem concordar com os dados presentes na literatura. Embora o presente estudo não tenha a intenção de estabelecer uma alíquota de indivíduos mutados, mesmo que para uma população restrita, é visível, a partir dos dados levantados, a grande variabilidade entre as porcentagens alélicas presentes na população brasileira. Com uma população superior a 200 milhões, o Brasil possui uma população substancialmente heterogênea, cada região mostrando um histórico populacional diferente, o que dificulta a extração de dados de grupos étnicos bem definidos para a população em geral (SUAREZ-KURTZ et al., 2012; RODRIGUES-SOARES; SUAREZ-KURTZ, 2018).

Vianna-Jorge e colaboradores, em 2004, chegaram às seguintes porcentagens em relação ao total de sua amostra de 331 indivíduos saudáveis e não relacionados: 8,6% variantes alélicas detectadas para o CYP2C9\*2 e 6,5% variantes alélicas encontradas para o CYP2C9\*3 (VIANNA-JORGE et al., 2004).

Por outro lado, em 2012, a Rede Nacional de Farmacogenética/Farmacogenômica (REFARGEN), rede colaborativa de pesquisadores de todo o Brasil, concluiu um estudo coorte com 1034 voluntários saudáveis, não relacionados, advindos de 4

das 5 regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul) (SUAREZ-KURTZ, 2004; SUAREZ-KURTZ et al., 2012). O estudo demonstrava, em relação a amostra completa, 10,8% variantes alélicas para o CYP2C9\*2 e 5,2% variantes alélicas para o CYP2C9\*3, com grande variação entre as regiões brasileiras: para o CYP2C9\*2, as porcentagens variavam de 8,4% a 13,5% entre as regiões; e, para o CYP2C9\*3, as porcentagens variavam de 2,5% a 6,4% (REFARGEN, 2012; SUAREZ-KURTZ et al., 2012; RODRIGUES-SOARES; SUAREZ-KURTZ, 2018) (SUAREZ-KURTZ et al., 2012; RODRIGUES-SOARES; SUAREZ-KURTZ, 2018).

Já em 2018, Naranjo e colaboradores realizaram um estudo para o CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19 com 6060 indivíduos advindos de vários países da América do Norte, América Central e América do Sul, além de Portugal e Espanha, separando tais voluntários em grupos étnicos. Para o CYP2C9, 5537 indivíduos foram estudados e as porcentagens encontradas foram as seguintes: 7,96% variantes alélicas para o CYP2C9\*2 e 3,8% variantes alélicas para o CYP2C9\*3 (NARANJO et al., 2018).

O estudo de Suarez-Kurtz e colaboradores em 2012 indicou, a partir de uma série de levantamentos, que a distribuição dos polimorfismos na população brasileira era influenciada por diversos fatores, dentre eles a “cor”, parâmetro autodeclaro utilizado pelo Censo no Brasil, região geográfica e, inclusive, a interação dos dois fatores anteriores, de forma que não se poderia prever a frequência dos polimorfismos presentes em toda a população a partir de dados isolados para um grupo em determinada região (SUAREZ-KURTZ et al., 2012). Além disso, o parâmetro “cor” unicamente não poderia ser usado como um preditor adequado, visto que a distribuição dos polimorfismos está mais alinha a proporção individual entre as ancestralidades, independente da “cor” (SUAREZ-KURTZ et al., 2012).

Além dos dados farmacogenéticos, é importante destacar que o uso de amostras de saliva neste estudo foi fundamental para garantir a aderência ao protocolo da pesquisa, visto que o procedimento foi rápido e indolor comparado a métodos como a coleta de sangue (CALVO et al., 2016). Quanto ao kit escolhido para a extração de DNA genômico das células imersas na saliva, o DNA Extract All Reagents permitiu uma genotipagem eficaz e exigiu menos etapas do que outros métodos, permitindo a conclusão da primeira fase do experimento em um dia a um custo menor (GARBIERI et al., 2017).

## 4 | CONCLUSÃO

A população brasileira é extremamente heterogênea e miscigenada, com muitas peculiaridades regionais, de modo que a definição de um perfil da distribuição dos polimorfismos é ainda problemática. Frente aos estudos populacionais já realizados, os dados encontrados no presente trabalho parecem concordar com os dados presentes

na literatura, ilustrando a heterogeneidade da população brasileira e reiterando a importância da existência de pesquisas populacionais, principalmente para estudos farmacogenéticos, vista a possibilidade de eventos adversos importantes com o uso de fármacos comumente utilizados, como os AINES. Além disso, metodologias que reduzem custos, facilitam e agilizam a genotipagem, podem ajudar a tornar a individualização da prescrição mais acessível aos profissionais de saúde.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos: 2017/12725-0 e 2018/02556-0).

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. E. et al. Saliva Samples Are a Viable Alternative to Blood Samples as a Source of DNA for High Throughput Genotyping. **BMC medical genomics**, v. 5, p. 19, maio 2012.

CALVO, A. M. et al. Quantification of Piroxicam and 5'-Hydroxypiroxicam in Human Plasma and Saliva Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Following Oral Administration. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 120, p. 212–220, fev. 2016.

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 of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 2, p. 147–158, 2017.

GREEN, G. A. Understanding NSAIDs: From Aspirin to COX-2. **Clinical cornerstone**, v. 3, n. 5, p. 50–60, 2001.

MURUGANANDHAN, J.; SIVAKUMAR, G. Practical Aspects of DNA-Based Forensic Studies in Dentistry. **Journal of forensic dental sciences**, v. 3, n. 1, p. 38–45, jan. 2011.

NARANJO, M.-E. G. et al. Interethnic Variability in CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 Genes and Predicted Drug Metabolism Phenotypes Among 6060 Ibero- and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium Report on Population Pharmacogenomics. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 22, n. 9, p. 575–588, set. 2018.

NEMODA, Z. et al. Assessing Genetic Polymorphisms Using DNA Extracted from Cells Present in Saliva Samples. **BMC medical research methodology**, v. 11, p. 170, dez. 2011.

PERINI, J. et al. Influence of Genotypes on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Piroxicam. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 78, n. 4, p. 362–369, out. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.clpt.2005.06.014>>.

REFARGEN. **CYP2C9**. Disponível em: <[http://www.refargen.org.br/article.php3?id\\_article=47](http://www.refargen.org.br/article.php3?id_article=47)>. Acesso em: 2 fev. 2019.

RODRIGUES-SOARES, F.; SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics Research and Clinical Implementation in Brazil. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, dez. 2018.

ROLLASON, V. et al. Pharmacogenetics of Analgesics: Toward the Individualization of Prescription. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 7, p. 905–933, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com>>.

ROLLASON, V. et al. Prediction by Pharmacogenetics of Safety and Efficacy of Non-Steroidal Anti- Inflammatory Drugs: A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 326–343, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=15&issue=3&spage=326>>.

SOLEIMANPOUR, M. et al. The Role of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in the Treatment of Patients With Hepatic Disease: A Review Article. **Anesthesiology and pain medicine**, v. 6, n. 4, p. e37822, ago. 2016.

SUAREZ-KURTZ, G. **Pharmacogenomics in admixed populations: the Brazilian pharmacogenetics/pharmacogenomics network--REFARGEN. The pharmacogenomics journal**United States, 2004. .

SUAREZ-KURTZ, G. et al. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self- Reported Color, and Geographical Origin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 191, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2012.00191/abstract>>.

VIANNA-JORGE, R. et al. CYP2C9 Genotypes and the Pharmacokinetics of Tenoxicam in Brazilians. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 76, n. 1, p. 18–26, jul. 2004.

WYATT, J. E.; PETTIT, W. L.; HARIRFOROOSH, S. Pharmacogenetics of Nonsteroidal Anti- Inflammatory Drugs. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 12, n. 6, p. 462–467, 9 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/tpj201240>>.

ZHOU, S.-F.; ZHOU, Z.-W.; HUANG, M. Polymorphisms of Human Cytochrome P450 2C9 and the Functional Relevance. **Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 165–188, dez. 2010.

## SOBRE OS ORGANIZADORES

**José Max Barbosa de Oliveira Junior** - é doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). 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). Editor Associado do periódico *Oecologia Austrais*. Membro de corpo editorial do periódico *Encyclopédia Biosfera*. 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. Links do organizador: [Currículo Lattes](#) | [ORCID](#) | [Scopus](#) | [Publons](#) | [UFOPA](#)

**Lenize Batista Calvão** - é pós-doutoranda na Universidade Federal do Pará (UFPA), bolsista CNPq. Doutora em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Mestra em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Possui experiência com avaliação de impactos antropogênicos em sistemas hídricos do Cerrado mato-grossense, utilizando a ordem Odonata (Insecta) como grupo biológico resposta. Atualmente desenvolve estudos avaliando a integridade de sistemas hídricos de pequeno porte na região amazônica, também utilizando a ordem Odonata como grupo resposta, com o intuito de buscar diretrizes eficazes para a conservação dos ambientes aquáticos. Links da organizadora: [Currículo Lattes](#) | [ORCID](#) | [ResearchGate](#) | [LABECO/UFPA](#)

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

- Açaí 19, 20, 21, 22, 24, 25  
*Acca sellowiana* 231, 232  
Açoita cavalo 67, 74, 76, 78, 88  
Adiantoideae 181, 184, 187  
Analgesia 50, 52, 53, 54, 57  
Anatomia 180, 181, 182, 183, 189, 190, 191, 193, 216, 229, 250, 251, 253, 256, 257  
Aprendizagem 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 289, 290, 291, 312, 313, 314, 316, 317, 319, 320, 321, 322  
Atividade anti-inflamatória 77, 78, 81, 94  
Avaliação microbiológica 19, 21, 26  
Aves 250, 251, 252, 255, 256, 257

### B

- B16-F10 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228  
Bioinformática 27, 29, 130  
Biologia 1, 2, 10, 37, 61, 74, 98, 114, 117, 123, 130, 143, 145, 149, 155, 172, 190, 202, 218, 250, 251, 252, 257, 265, 269, 284, 299, 310, 319  
Biopesticidas 299, 300, 309  
Bioquímica 1, 5, 7, 49, 217, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 321, 322  
Biotechnology 100, 144, 177, 178, 189, 214, 215, 217, 275, 310, 311  
*Branchipus stagnalis* 231, 232

### C

- Cacauí 115, 116, 146, 155  
Câncer 38, 39, 45, 47, 130, 218, 219, 228, 268, 275, 278, 323, 324, 331, 335  
Células embriogênicas 203, 204, 210, 212  
Células-tronco 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18  
Cicatrização 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 76  
Citotoxicidade 37, 38, 44, 45, 46, 67, 70, 80, 86, 93, 94, 219, 232, 272  
*Colletotrichum acutatum* 157, 158, 161, 164, 167  
Complicações perinatais 292, 294, 296  
Constituintes químicos 99, 181, 191  
Cultura de tecidos 203, 214, 215

### D

- Diagnóstico 53, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 167, 185, 198, 244, 247, 248, 293, 296, 323, 324, 327, 331, 332, 352  
Dinamização 279  
Dispersão 1, 2, 7, 44, 45, 74, 152, 153, 171, 348  
Dor 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 77, 355

## E

- Ecotoxicidade 231  
Educação 245, 247, 279, 280, 281, 282, 284, 289, 314, 321, 322, 323  
*Elaeis guineensis* 215  
Ensino-aprendizagem 284, 286, 290, 291, 313, 314, 319, 320, 321  
Exame parasitológico de fezes 59, 60  
Extensão universitária 282  
Extrato de planta 38, 239

## F

- Fertilidade 115, 121  
Ftalimidas 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57

## G

- Gastrointestinal 61, 299, 300, 302, 308, 355, 357  
Genoma 27, 173  
Gestação 292, 293, 294, 295, 297, 298

## H

- Herbicides 100, 101, 102, 103, 104  
*Himatanthus lancifolius* 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48  
Histologia 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 333

## L

- Ludicidade 279, 281, 283  
*Luehea divaricata* 67, 68, 70, 74, 75, 76, 77, 78, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99  
Luz solar 258, 264, 268

## M

- Macrófita 1, 2, 9, 258, 263, 264  
Mamíferos 255, 256, 263, 299, 301, 307, 309  
Mandiocultura 27, 29  
*Manihot esculenta* 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 170, 171, 177, 178, 179  
Maquetes 312, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322  
Material didático 285, 286, 287, 288  
Melanoma 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 268, 274, 278  
Melhoramento genético 31, 34, 114, 115, 116, 120, 121, 146, 147  
*Microgramma* 191, 192, 193, 196, 197, 198, 199, 200, 201  
Microssatélites 27, 29, 31, 32, 33, 145, 147, 150, 151, 152, 154, 170, 171, 174  
Modelos analógicos 279, 280, 281, 283  
Monitoria 312, 314, 316, 317, 319, 320, 321  
Morango 157, 158, 159, 161, 167, 168

## O

Óleo essencial 74, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 186

## P

Parasitologia 59, 60, 66, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 299

Plantas medicinais 37, 46, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 167, 189, 219, 276

Polpa de frutas 19

## Q

Qualidade 1, 4, 5, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 61, 72, 73, 135, 139, 141, 146, 151, 158, 160, 161, 174, 204, 276, 294, 312, 316, 321, 334, 335, 336, 347, 348, 349, 350, 364

Queimaduras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 37, 218

## R

Recém-nascido 292, 293, 295, 296, 297, 298

Recursos genéticos 117, 122, 147, 169, 170, 171, 215

Reservatório 255, 258, 260, 261

## S

Samambaias 181, 191, 192, 193

Saúde 14, 22, 25, 27, 37, 52, 59, 60, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 96, 98, 190, 218, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 279, 281, 282, 284, 285, 287, 288, 292, 293, 294, 295, 297, 298, 301, 312, 313, 317, 321, 332, 335, 349, 350, 351, 355, 357, 362

Seeds 11, 100, 102, 104, 215

Simbiose 258, 260, 263, 265

Síndromes hipertensivas 292, 293, 294, 295, 297, 298

Sistema respiratório 76, 250, 251, 252, 253, 255, 256

## T

Tecido adiposo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18

Teles pires 250, 251, 252

Toxicidade 44, 45, 46, 93, 94, 167, 224, 231, 232, 236, 237, 238, 239, 240, 299, 301, 304, 309, 310, 355

Transgenic soybean 100

## V

Vegetais 9, 44, 59, 69, 71, 73, 74, 79, 95, 97, 122, 140, 159, 168, 190, 192, 203, 205, 209, 240, 270, 271, 273, 336, 347, 349

The logo for Atena Editora, featuring a stylized 'A' composed of two overlapping L-shaped blocks, followed by the word 'Atena' in a serif font, and 'Editora' in a smaller, lighter sans-serif font below it.

Atena  
Editora

2 0 2 0