



# Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 4

Jesus Rodrigues Lemos  
(Organizador)

 **Atena**  
Editora

Ano 2020



# Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 4

Jesus Rodrigues Lemos  
(Organizador)

Atena  
Editora

Ano 2020

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:** Natália Sandrini de Azevedo

**Edição de Arte:** Luiza Batista

**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

Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

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

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 Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

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

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido 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

Prof. Dr. Luis Ricardo Fernando da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros

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. William 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  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
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 Girlene 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  
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
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  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
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  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof<sup>a</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof<sup>a</sup> Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Prof<sup>a</sup> Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof<sup>a</sup> Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Prof<sup>a</sup> Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof<sup>a</sup> Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR  
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
 Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
 Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
 Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
 Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
 Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
 Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
 Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
 Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
C569	<p>Ciências biológicas [recurso eletrônico] : campo promissor em pesquisa 4 / Organizador Jesus Rodrigues Lemos. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF            Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader            Modo de acesso: World Wide Web            Inclui bibliografia            ISBN 978-65-5706-140-4            DOI 10.22533/at.ed.404202406</p> <p>1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Lemos, Jesus Rodrigues.</p> <p style="text-align: right;">CDD 570</p>
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

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

## APRESENTAÇÃO

Este volume da obra “Ciências Biológicas: Campo promissor em Pesquisa 4” vem trazer ao leitor, em seus capítulos, informações diversas imbuídas em diferentes campos do conhecimento de Ciências da Vida, como o próprio título do e-book sugere: uma área extremamente promissora, dinâmica e passível de aquisição de novas informações a todo momento, vindo, de forma comprometida e eficaz, a atualizar o leitor interessado nesta grande área do conhecimento.

Pesquisadores de diferentes gerações, e diferentes regiões do país, motivados por uma força motriz que impulsiona a busca de respostas às suas perguntas, trazem dados resultantes da dedicação à Ciência, ansiando responder suas inquietações e compartilhar com o leitor, de forma cristalina e didática, seus alcances técnico-científicos, satisfazendo a função precípua da ciência que é a de melhorar a qualidade de vida do homem, enquanto executante do seu papel cidadão e ser social.

Somente por uma questão de ordenação, os 28 capítulos deste volume foram sequenciados levando-se em consideração, primeiramente, estudos, em diferentes vertentes, com organismos vivos, animais e plantas, seguidos por pesquisas oriundas de aspectos didático-pedagógicos, aquelas relacionadas aos progressos de situações-problemas em vegetais, animais e humanos e, por fim, interações entre diferentes organismos no espaço ambiental com um todo.

Em todas estas áreas, as pesquisas conduzem o leitor a acompanhar descobertas/avanços que proporcionam, indubitavelmente, um quadro mais robusto, e que acresce ao que até então se tem conhecimento naquele campo de estudo, das diferentes subáreas das Ciências Biológicas, com viés também para a saúde e bem estar humanos.

Neste sentido, a heterogeneidade deste volume, extremamente rico, irá contribuir consideravelmente tanto na formação de jovens graduandos e pós-graduandos, quanto ser atrativo para profissionais atuantes nas áreas escolar, técnica e acadêmica aqui abordadas, não eximindo também o leitor “curioso” interessado nas temáticas aqui trazidas.

Portanto, aproveitem os assuntos dos seus interesses e boa leitura!

Jesus Rodrigues Lemos

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS DIÁRIOS EM POPULAÇÕES DE FORMIGAS SAÚVA ( <i>ATTA SEXDENS</i> )	
Mila Maria Pamplona Barbosa Bruna Rezende Malta de Sá Gisele Akemi Oda André Frazão Helene	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4042024061</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>16</b>
CONTRIBUTION TOWARDS THE STUDY OF LEAF ANATOMY OF <i>SMILAX BRASILIENSIS</i> SPRENG. (SMILACACEAE)	
Myriam Almeida Barbosa Marlúcia Souza Pádua Vilela Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima Ana Hortência Fonseca Castro	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4042024062</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>28</b>
ACANTHACEAE DOS JARDINS DO MUSEU DE BIOLOGIA MELLO LEITÃO, SANTA TERESA-ES: ESPAÇO NÃO FORMAL E O ENSINO DE BOTÂNICA	
Elisa Mitsuko Aoyama Alexandre Indriunas	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4042024063</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>41</b>
FORMAÇÃO DE BANCO DE SEMENTES (GERMOPLASMA) COM PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO NORTE DO PIAUÍ	
Iara Fontenele de Pinho Maria da Conceição Sampaio Alves Teixeira Jesus Rodrigues Lemos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4042024064</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>56</b>
REGISTRO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE CHRYSOMELIDAE NO SUDOESTE DO PARANÁ, COM ÊNFASE EM ALTICINI (GALERUCINAE)	
Lucas Frarão Adelita Maria Linzmeier	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4042024065</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>67</b>
TOBACCOMIXTURE IN THE FIGHT AGAINST COWPEA APHID DURING THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF <i>V. UNGUICULATA</i>	
Marcelo Ferreira de Souza José Ivo Soares Ana Cristina Macedo de Oliveira Sebastião Erailson de Sousa Santos Maíres Alves Cordeiro Jeyce Layse Bezerra Silva Maria Regina de Oliveira Cassundé Ananda Jackellynne Vaz da Silva Lucas Ermeson Soares das Neves	

José Wiliam Pereira Brito  
Karol Águida Santos Rocha  
Italo Ferreira da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.4042024066**

**CAPÍTULO 7 ..... 74**

WOULD THE VOLATILE TERPENES OF *MESOSPHAERUM SUAVEOLENS* HAVE A PHYTOTOXIC EFFECT?

José Weverton Almeida Bezerra  
Rafael Pereira da Cruz  
Thaís da Conceição Pereira  
Maria Haiele Nogueira da Costa  
Emanoel Messias Pereira Fernando  
Helder Cardoso Tavares  
Talita Leite Beserra  
Kleber Ribeiro Fidelis  
José Iago Muniz  
Maria Aurea Soares de Oliveira  
Talina Guedes Ribeiro  
Maria Arlene Pessoa da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.4042024067**

**CAPÍTULO 8 ..... 83**

CONHECIMENTO TRADICIONAL DE MICROARTRÓPODES EM UMA COMUNIDADE RURAL DA CAATINGA

Francisco Éder Rodrigues de Oliveira  
Mikael Alves de Castro  
Marlos Dellan de Souza Almeida  
Célio Moura Neto  
Helba Araújo de Queiroz Palácio  
Jefferson Thiago Souza

**DOI 10.22533/at.ed.4042024068**

**CAPÍTULO 9 ..... 98**

*MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADAS DE OTITES DE CÃES E GATOS: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO A ÓLEOS ESSENCIAIS

Raquel Santos da Silva  
Ludmilla Tonani  
Marcia Regina von Zeska Kress

**DOI 10.22533/at.ed.4042024069**

**CAPÍTULO 10 ..... 111**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE CROTON SP SOBRE ATRAÇÃO PARA A OVIPOSIÇÃO DO *AEDES AEGYPTI*

Daniel Lobo Sousa  
Roseliz Campelo Pachêco  
Quirlian Queite Araújo Anjos  
Thaimara Gomes Costa  
Débora Cardoso da Silva  
Simone Andrade Gualberto

**DOI 10.22533/at.ed.40420240610**

**CAPÍTULO 11 ..... 116**

O ENSINO DE BIOLOGIA SOB A ÓTICA DISCENTE: UM RECORTE AMOSTRAL NA ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL EM BARREIRAS - BAHIA

Camila de Carvalho Moreira  
Fábio de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.40420240611**

**CAPÍTULO 12 ..... 127**

GLOSSÁRIO ONLINE DE BOTÂNICA COMO RECURSO DIDÁTICO PARA O ENSINO MÉDIO

Rebeca Melo Barboza  
Bruno Edson-Chaves  
Eliseu Marlônio Pereira de Lucena

**DOI 10.22533/at.ed.40420240612**

**CAPÍTULO 13 ..... 141**

ECOPEDAGOGIA: EDUCAÇÃO PARA O MEIO AMBIENTE

Magda Regina Santiago  
Márcio Marastoni  
Pero Torquato Moreira

**DOI 10.22533/at.ed.40420240613**

**CAPÍTULO 14 ..... 152**

ASPECTOS DA SENESCÊNCIA CELULAR EM INDIVÍDUOS IDOSOS SAUDÁVEIS

Thalyta Nery Carvalho Pinto  
Juliana Ruiz Fernandes  
Gil Benard

**DOI 10.22533/at.ed.40420240614**

**CAPÍTULO 15 ..... 165**

ANÁLISE *IN SILICO* DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS P53 E CREBBP E SUA RELAÇÃO COM LINFOMAS

Katheryne Lohany Barros Barbosa  
Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior  
Olívia Basso Rocha  
Livia do Carmo Silva  
Gabriela Danelli Rosa  
Jackeliny Garcia Costa  
Kleber Santiago Freitas

**DOI 10.22533/at.ed.40420240615**

**CAPÍTULO 16 ..... 173**

EFEITO DO EXTRATO DE *UNCARIA TOMENTOSA* E PALMITATO SOBRE A MORTE CELULAR DE MIOBLASTOS C2C12

Bruna Letícia de Freitas  
Jeniffer Farias dos Santos  
Carla Roberta de Oliveira Carvalho  
Viviane Abreu Nunes

**DOI 10.22533/at.ed.40420240616**

**CAPÍTULO 17 ..... 184**

ALTERAÇÕES NA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS P53 E TPP1 COMO CAUSA DA ENDOMETRIOSE

Olivia Basso Rocha  
Marcos Antonio Batista de Carvalho Junior  
Katheryne Lohany Barros Barbosa  
Kleber Santiago Freitas  
Livia do Carmo Silva  
Gabriela Danelli Rosa  
Jackeliny Garcia Costa

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061617**

**CAPÍTULO 18 ..... 192**

OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS SEMELHANTES ÀS BACTERIOCINAS POR *LACTOCOCCUS LACTIS* UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICROORGANISMO CAUSADOR DE CÁRIE

Liz Caroline Mendes Alves  
Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061618**

**CAPÍTULO 19 ..... 209**

EFEITOS DO TOLUENO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO E REPRODUTOR DE RATOS WISTAR

Ana Rosa Crisci  
Marcos Leandro Paoleli dos Santos  
Paulo Henrique da Silva Santos  
Ângelo Rafael Bueno Rosa  
Betina Ferreira Lacerda  
Wilson Roberto Malfará  
Lucila Costa Zini Angelotti

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061619**

**CAPÍTULO 20 ..... 221**

ESTUDO DA INTERAÇÃO E ENSAIO DE MUTAGÊNESE VISANDO O COMPLEXO ENOS-CALMODULINA POR ABORDAGENS *IN SILICO*

Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior  
Olivia Basso Rocha  
Katheryne Lohany Barros Barbosa  
Livia do Carmo Silva  
Gabriela Danelli Rosa  
Jackeliny Garcia Costa  
Kleber Santiago Freitas

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061620**

**CAPÍTULO 21 ..... 230**

ESTUDO MORFOLÓGICO DO TESTÍCULO DE RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA TRATADOS EM PLATAFORMA VIBRATÓRIA

Gabrielly de Barros  
Fernando Antonio Briere  
Suellen Ribeiro da Silva Scarton  
Célia Cristina Leme Beu

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061621**

**CAPÍTULO 22 ..... 235**

ESTUDO MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO EM PLACENTAS DE RATAS COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Raquel de Mendonça Rosa-Castro

Izadora Renosto

Euro Marques Junior

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061622**

**CAPÍTULO 23 ..... 249**

RELAÇÃO ENTRE AGROTÓXICOS E CÂNCER: UMA ANÁLISE DO GLIFOSATO

Júlio César Silva de Souza

Tatianny de Assis Freitas Souza

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061623**

**CAPÍTULO 24 ..... 261**

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES TÍMICAS RELACIONADAS COM A IDADE DURANTE A INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Rafaela Pravato Colato

Vânia Brazão

Fabricia Helena Santello

Andressa Duarte

José Clóvis do Prado Jr.

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061624**

**CAPÍTULO 25 ..... 272**

O POLIMORFISMO DO GENE GSTM1 EM PACIENTES COM ATEROSCLEROSE

Isabela Barros Lima

Andreia Marcelino Barbosa

Iasmim Ribeiro da Costa

Ulisses dos Santos Vilarinho

Lilian Castilho de Araújo Gianotti

Débora Acyole Rodrigues de Moraes

Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061625**

**CAPÍTULO 26 ..... 279**

SÍFILIS GESTACIONAL: DESAFIOS ENFRENTADOS POR ENFERMEIROS E AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE DA ATENÇÃO PRIMÁRIA

Mary Kathleen Marques Xavier

Tarciana Alves Menezes

Daniela de Aquino Freire

Thaís da Silva Oliveira

Juliana da Rocha Cabral

Andreza Cavalcanti Vasconcelos

Martha Sthefanie Borba Costa

Viviane de Souza Brandão Lima

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061626**

**CAPÍTULO 27 ..... 289**

OCORRÊNCIA DE FORAMINIFERA (PROTOCTISTA, GRANULORETICULOSA) NA PRAIA DE ITAGUÁ, UBATUBA, SP

Paulo Sergio de Sena  
Ana Paula Barros de Jesus

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061627**

**CAPÍTULO 28 ..... 295**

INTERAÇÃO DE LECTINAS DE TOXOPLASMA GONDII COM RECEPTORES DO TIPO TOLL DE CÉLULAS NATURAL KILLER

Irislene Simões Brigo  
Cássia Aparecida Sebastião  
Cristina Ribeiro de Barros Cardoso  
Maria Cristina Roque Antunes Barreira  
Camila Figueiredo Pinzan

**DOI 10.22533/at.ed.4042024061628**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 297**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 298**

## SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS DIÁRIOS EM POPULAÇÕES DE FORMIGAS SAÚVA (*Atta sexdens*)

Data de aceite: 18/06/2020

Mila Maria Pamplona Barbosa  
Bruna Rezende Malta de Sá  
Gisele Akemi Oda  
André Frazão Helene

**RESUMO:** Compreender a ritmicidade biológica de insetos eussociais é um desafio, tanto considerando a escala individual quanto coletiva (contexto da colônia). O surgimento da ritmicidade, portanto, está sujeito a fenômenos de sincronização externa, devido à ciclicidade ambiental, bem como à sincronização interna do indivíduo e da colônia, devido à complexidade de suas interações sociais. Formigas do gênero *Atta* (saúvas) se caracterizam principalmente pelo corte de folhas e o forrageamento em larga escala. O presente trabalho visa a caracterizar a ordem temporal interna de uma colônia, utilizando softwares de registro e análise da atividade de forrageamento. Uma colônia foi mantida em uma caixa de plástico com acesso a três outras caixas: uma contendo alimento (*Acalipha* sp.), outra servia de depósito de lixo da colônia, enquanto a terceira estava vazia. Foram analisados os efeitos do ciclo de claro/escuro e da variação de comprimento da trilha de forrageamento. Todos os experimentos piloto realizados neste trabalho envolveram

uma aclimatação de 10 dias antes do início das filmagens, com a colônia exposta a um ciclo de CE 12:12, com 500 lux na fase de claro e luz vermelha constante, permitindo gravações na fase de escuro. Foram gravados vídeos de 2 minutos por hora a cada hora durante 3 dias (temperatura = 23°C e umidade = 60%). A alimentação foi aleatória. Foi observado em todos os experimentos a presença de forrageamento da colônia tanto na fase de escuro quanto de claro, sendo essa atividade muito mais intensa durante a de escuro. Observou-se também que a densidade de fluxo de formigas é influenciada pelo comprimento da trilha, com trilhas mais curtas apresentando fluxos mais intensos do que as trilhas mais longas. Assim, abrem-se novas possibilidades de investigação, relacionadas à dessincronização e ressincronização interna da colônia, e o quanto esses fenômenos podem influenciar o forrageamento e sua produtividade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Formigas cortadeiras, softwares, ritmos biológicos

### DAILY SYNCHRONIZATION IN POPULATIONS OF LEAF-CUTTER ANTS (*Atta sexdens*)

**ABSTRACT:** Understanding social insects' biological rhythms is a challenge, considering both the individual scale as the collective one (the colony context). The emergence of those

rhythms, in both these scales, involves external synchronization (thanks to environmental cycles), but also the individual and the colony internal synchronization, according to the complexity of their social interactions. Atta ants are characterized by their leaf-cutting activity and their huge and impressive foraging activity. The present work aims to characterize the internal temporal order of a colony, using recording and analysis software developed by our laboratory. This software inspects automatically videos of the foraging trail. A colony was kept in a plastic box with access to three trails that connect her to three other boxes. The first box contained food (*Acalipha* sp.), the second one worked as the colony waste, and the third one remained empty. A webcam recorded the activity of the foraging trail. All the pilot experiments realized in this project involved an acclimation of 10 days before the recording began, with LD 12:12 (500 lux in the light phase) and constant red light that allowed us to record during the dark phase. We recorded one video (2 minutes) per hour for three days. The temperature was kept at 23°C and the humidity was 60%. Food replenishment was random. We have observed in all of our experiments the presence of foraging activity in both the dark and light phases, but it was much more intense during the dark phase. We have also observed that the ant's flow is influenced by the trail length as bigger flows were found in shorter trails. These results open new investigation possibilities, related to the colony's internal desynchronization and resynchronization and how much these phenomena may influence the colony productivity and their foraging activity.

**KEYWORDS:** Leaf-cutter ants, software, biological rhythms

## 1 | INTRODUÇÃO:

### A) Ritmicidade biológica

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram a capacidade de antecipar mudanças ambientais de natureza cíclica e esse tem sido um aspecto importante para a sua regulação homeostática (Pittendrigh, 1993). Compõe tal característica adaptativa o desenvolvimento da ritmicidade endógena a partir de ação de osciladores, bem como da capacidade de sincronização destes com os ciclos ambientais, a partir do acoplamento da ritmicidade endógena. Uma vez que a regularidade de eventos ambientais se dá nas mais diversas escalas de tempo, também a sincronização dos organismos seguem tais padrões, com processos que podem ser desde de curta duração até processos de escalas anuais, sempre de acordo com a ciclicidade do meio e a história evolutiva das linhagens biológicas. Nesse contexto, destacam-se os ritmos circadianos (com períodos próximos a 24h), que estão sujeitos à sincronização por ciclos ambientais como o claro-escuro, passando a ter períodos de 24h e sendo chamados de ritmos diários (Aschoff, 1979; Pittendrigh, 1993 and Bloch, 2013). Vale ressaltar que a organização temporal biológica se dá através de diferentes formas, indo desde mecanismos celulares, até comportamentais.

### B) Formigas cortadeiras e Atta

Pouco se compreende do processo que envolve o acoplamento de osciladores dentro de um sistema até a emergência do ritmo biológico final visto no organismo. É nesse contexto

que se destacam os estudos cronobiológicos que envolvem insetos sociais. Insetos sociais são grupos de insetos que se organizam na forma de colônias, como os cupins, abelhas, vespas e as formigas. Nesses grupos, caracterizados pela eussocialidade (Wilson, 1971), encontramos uma divisão do trabalho reprodutivo, de modo que existe uma classe capaz de se reproduzir e outra infértil, bem como a divisão do trabalho correspondente às demais tarefas da colônia. Assim, a classe infértil (operárias) se divide em subcastas com funções específicas dentro da colônia.

Uma colônia de insetos sociais pode possuir de centenas a milhões de indivíduos, valendo ressaltar que a sobrevivência individual depende do pertencimento à colônia, da mesma forma que a sobrevivência depende do funcionamento organizado dos indivíduos (Figura 1). É justamente por existirem aspectos individuais e aspectos coletivos que esses sistemas podem ser considerados complexos, podendo também ser vistos como “superorganismos”. Esses sistemas são, portanto, excelentes objetos de estudo para os processos envolvidos na emergência de ritmos biológicos que se dá através da sincronização, já que nos permitem investigar a sincronização diária externa devido aos ciclos ambientais (claro/escuro), além da sincronização interna, devido às interações sociais (Southwick and Moritz, 1987; Moritz and Sakofski, 1991) (Figura 1). Diante desses aspectos, diversos são os estudos cronobiológicos realizados em abelhas (Frisch and Koeniger, 1994; Moore 2001, Bloch et al., 2001; Toma et al., 2000; Bloch and Robinson, 2001), de modo que poucos estudos foram realizados com colônias de formigas.

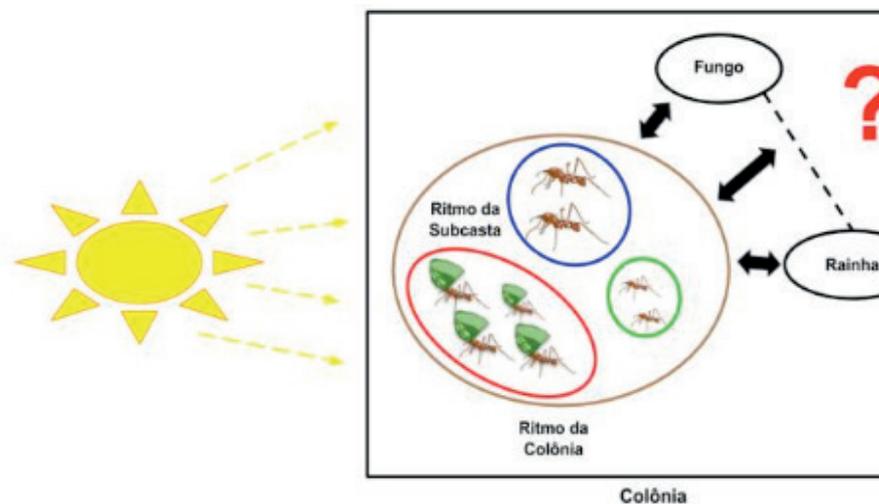


Figura 1: Esquema ilustrando as possíveis relações envolvidas na sincronização de uma colônia de formigas cortadeiras. Os ritmos individuais emergem em ritmos das subcastas, e estes emergem como ritmo da colônia.

A despeito de sociedades de formigas oferecem uma excelente oportunidade de ampliação de estudos comparativos (McCluskey 1958; 1965; Roces and Nunez 1996), dois aspectos principais atribuem bastante dificuldade à tarefa de registro. O primeiro é o número muito grande de indivíduos, uma vez que colônias de formigas cortadeiras podem chegar a milhões de organismos. O segundo é a variedade de tamanhos entre as formigas, visto que diversas espécies apresentam polimorfismo (Figura 2), possuindo indivíduos de milímetros

de tamanho até indivíduos de alguns centímetros.

Diante desses desafios, os estudos da ritmicidade, em formigas, têm sido feitos de forma exclusiva em indivíduos (Sharma et al., 2004) ou em grupos (McCluskey 1965, 1967), frequentemente isolados do contexto da colônia. Tal abordagem, apesar de ser prática, ignora um dos aspectos fundamentais da regulação de uma colônia: a existência da organização coletiva e individual serem indissociáveis nos processos regulatórios.

Alguns trabalhos mais recentes têm explorado a ritmicidade a nível molecular, dos genes de relógio presentes nos osciladores circadianos localizados no cérebro das formigas (Ingram et al., 2009, Kay et al., 2018). Nesse sentido, apesar dos grandes avanços realizados no estudo da organização espacial das sociedades de formigas (Clark, 2006), pouco ainda se sabe sobre a organização temporal de sua atividade e de seus distintos aspectos individuais e coletivos, especialmente importante nestes organismos eussociais, já que a eussocialidade é um aspecto fundamental para tratar da organização das formigas.

As formigas *Neoattini* (pertencente à tribo Attini), com os gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), são conhecidas como cortadeiras e têm uma alta distribuição em áreas neotropicais. Caracterizam-se pelo cultivo de um jardim de fungo, corte de folhas, forrageamento em larga escala e colônias que podem chegar a milhões de indivíduos. Particularmente, as espécies do gênero *Atta* apresentam ainda um polimorfismo gradual entre as suas subcastas (Weber, 1972 e Wilson, 1980). Assim, formigas maiores estão associadas geralmente a tarefas de defesa da colônia, enquanto formigas menores tendem a ser responsáveis por tarefas internas ao ninho, como trazer água para a colônia. O forrageamento, portanto costuma estar relacionado às formigas intermediárias (Wilson, 1980) (Figura 2). Vale ainda ressaltar a dinâmica dessa divisão de trabalho entre as subcastas, que não é determinística, podendo haver variação da função de um indivíduo de acordo com as necessidades da colônia. Em nosso laboratório, foi observado ainda que as formigas maiores e intermediárias tendem a sofrer maior influência dos ciclos ambientais diários, uma vez que executam tarefas fora do ninho, estando mais expostas às variações ambientais (Toledo, 2014).



Figura 2: Polimorfismo em *Atta sexdens*. A figura apresenta a variação gradual de tamanho entre as castas. Os dois maiores indivíduos consistem na casta reprodutiva, representando uma rainha e uma rainha virgem

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7d/Atta.cephalotes.gamut.selection.jpg/220px-Atta.cephalotes.gamut.selection.jpg>

### **C) Desenvolvimento de softwares de contagem**

Nosso grupo vem desenvolvendo ferramentas de análise de trilhas de forrageamento de formigas através de “vídeo-tracking”, permitindo a discriminação de tamanho e monitoramento de uma população da ordem de 10 mil indivíduos. Esses softwares utilizam técnicas de *machine learning e deep learning* a fim de automatizar a contagem de altos fluxos de formigas nas trilhas de forrageamento, sendo portanto uma ferramenta importantíssima para os estudos com esse tipo de sistemas, possibilitando a investigação mais profunda de aspectos temporais a nível de colônia (Toledo, 2014).

Os principais desafios referentes ao uso desse tipo de ferramenta envolvem a detecção de objetos. Nesse caso, é preciso fazer com que o computador reconheça o objeto (formiga) e seja capaz de acompanhá-lo durante todo o vídeo, contabilizando-a nas contagens de fluxo. Contudo, a trilha de forrageamento é um ambiente complexo que envolve diversos elementos distintos ainda que no contexto do laboratório. Na trilha temos formigas de diversos tamanhos e funções, como aquelas que buscam ou carregam folhas, bem como aquelas que retiram obstáculos (“lixo”) da própria trilha. Além disso, o fluxo de formigas pode ser muito elevado em alguns instantes, especialmente em momentos de alimentação da colônia. Diante disso, o software precisa ser treinado para reconhecer as formigas em diferentes contextos de quadros na imagem do vídeo. É justamente no desenvolvimento desse tipo de ferramenta que parte do presente trabalho se desenvolveu.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

### **A) Colônia**

Em nossos experimentos, foi utilizada uma colônia da espécie *Atta sexdens* (Forel, 1908), com aproximadamente 10 mil indivíduos. Conhecida como saúva-limão, essa espécie possui alta distribuição por todo o Brasil.

### **B) Experimentos**

Foram realizados três experimentos, todos na mesma estação (verão). O primeiro deles consistia no Piloto de Trilha Longa, o qual possuía comprimento da trilha de forrageamento de 2m, e os demais utilizavam uma canaleta de 1m para a mesma trilha, sendo, portanto, chamados de Pilotos de Trilha Curta I e II. Todos eles envolveram a mesma colônia e seguiram os protocolos descritos nesta seção.

### **C) Arranjo experimental**

A colônia foi mantida em uma caixa de plástico hexagonal (C), com 23cm de aresta, com acesso a três canaletas também de plástico (trilhas) (Figura 3). As canaletas 1, 2 e 3 conectam a colônia a outras caixas de plástico hexagonais, com 23cm de aresta. Em uma delas ficaram disponíveis folhas de *Acalipha* sp, acrescidas de água com sacarose (C1), a outra ficou disponível para o depósito de lixo da colônia (C2). A terceira canaletas leva a uma caixa vazia, a fim de oferecer mais possibilidades de circulação para as formigas (C3). O

comprimento da trilha 1 e 2 foi de 35 centímetros, enquanto o da trilha 3 variou conforme o experimento piloto. Ao longo da canaleta 1 foi posicionada uma câmera webcam (modelo C920, logitech) para gravações.

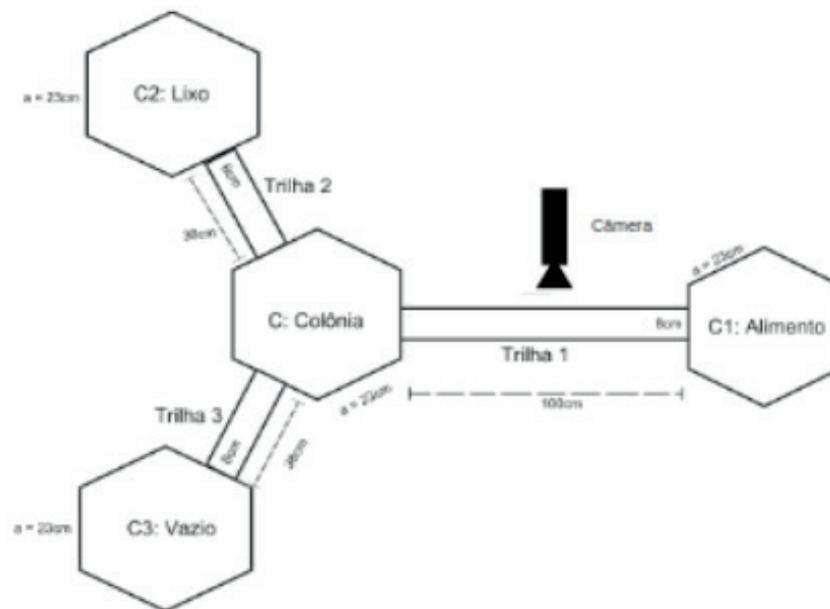


Figura 3: Esquema do aparato com três trilhas saindo da colônia. A primeira leva ao alimento, a segunda leva ao lixo e a última leva à caixa vazia.

Antes dos experimentos (Figura 4), a colônia estava ambientada em um biotério com janela. Dessa forma, para que ocorresse sua aclimação, ela foi realocada para uma sala de experimentos (sem janela) durante 10 dias antes do início das filmagens, com as mesmas condições ambientais do experimento. Durante todos os três experimentos (cada um com 10 dias de aclimação e mais 3 dias de filmagem), a colônia foi exposta a um ciclo de CE 12:12, com 500 lux na fase de claridade, garantido por um temporizador que acendia às 6h da manhã e apagava às 18h todos os dias. A luz vermelha foi mantida constante durante o experimento, uma vez que ela permite filmagens noturnas. A temperatura ambiente foi mantida constante em  $23^{\circ}\text{C}$  e a umidade em torno de 60%. Já a alimentação, a qual se deu com folhas de *Acalypha* sp. e água com sacarose, ocorreu uma vez ao dia, em horários aleatórios sorteados através do site random.org. Esse procedimento foi adotado a fim de se mitigar os possíveis efeitos de antecipação de horários de alimentação por parte das formigas.

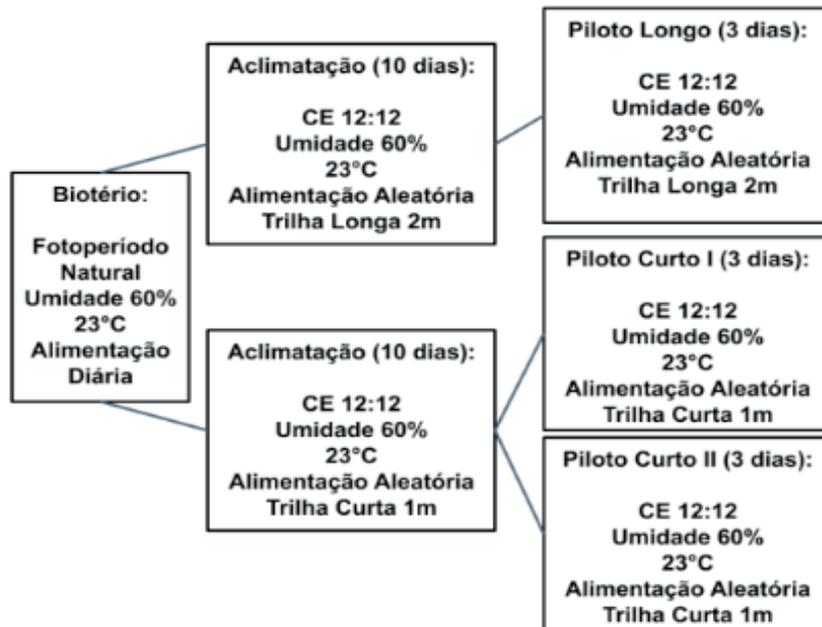


Figura 4: Condições da colônia em cada uma das fases de experimento.

#### D) Registro de atividade

As filmagens realizadas ao longo do dia foram programadas por meio de um software de filmagem desenvolvido no próprio laboratório. Esse software permitia o estabelecimento de ciclos de filmagens. Assim, foi gravado um vídeo de 2 minutos a cada hora durante 3 dias (72h). As filmagens foram analisadas por um software de contagem manual de formigas, também desenvolvido no próprio laboratório, em Python. Esse software é comumente utilizado na validação de contadores automáticos de formigas que funcionam a base de video-tracking de formigas (Toledo, 2014, 2018). Desse modo, o Contador Manual era capaz de rodar as filmagens, em velocidade normal do vídeo ou *frame a frame*. Ele também permite posicionar uma linha ao centro do vídeo, de modo que toda vez que uma formiga cruzava essa linha, ela era contada. Formigas indo em direção ao alimento eram contadas como *up* e formigas indo em direção ao ninho eram contadas como *down* (Figura 5).

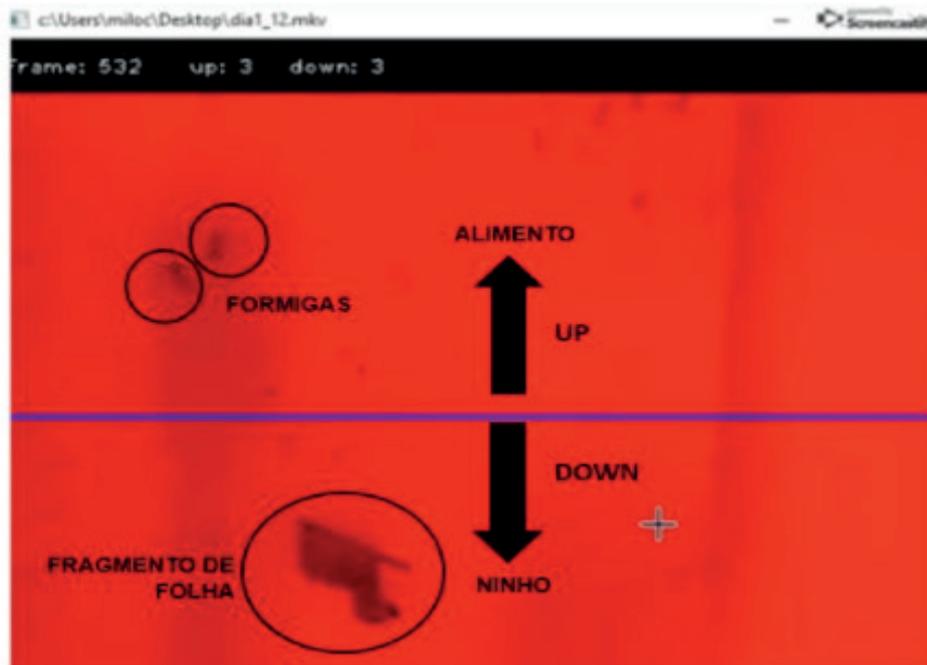


Figura 5: Imagem representativa da tela do Software de contagem manual rodando um vídeo noturno. As setas indicam a direção dos destinos da trilha. Os círculos discriminam elementos presentes no vídeo.

Além do software de Contagem Manual, também utilizamos um software de Contagem Automática também desenvolvido em nosso laboratório. Esse utiliza princípios de detecção de objetos para fazer “*tracking*” das formigas. Dessa forma, ao rodar um vídeo de experimento, esse software é capaz de reconhecer as formigas presentes, acompanhando sua trajetória e contabilizando-a assim que ela sai do *frame* do vídeo. Essa ferramenta é muito poderosa para a análise de trilhas de forrageamento de colônias com grande número de indivíduos, como as de saúva. O Contador Automático retorna para cada vídeo um arquivo .txt com o número de formigas *up* e *down* (assim como o Contador Manual), bem como os *frames* do vídeo em que cada uma das formigas foi contabilizada.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### A) Contagens Manuais e Automáticas

Uma vez que o software de Contagem Automática ainda é uma ferramenta em desenvolvimento, os resultados obtidos com essa ferramenta são apresentados aqui apenas com o objetivo de comparação com as contagens manuais (Figura 6). Acreditamos que para esses experimentos, o Contador Automático teve uma performance muito baixa, apresentando muita dificuldade para realizar o “*tracking*” das formigas especialmente nos vídeos noturnos e vídeos com muitas formigas. Acreditamos que isso também seja resultado da qualidade dos vídeos, uma vez que muitas vezes acumularam-se fragmentos de folhas e lixo da colônia (cadáveres de outras formigas) no trecho da trilha que era filmado. Nesse tipo de vídeo, o software de Contagem Automática costuma apresentar um grande índice de erro,

uma vez que existem muitos outros objetos na imagem diferentes de formigas realizando forrageamento. Ainda assim, consideramos importante a continuidade do desenvolvimento desse tipo de ferramenta, uma vez que ela pode permitir muitos outros experimentos com colônias de formigas com dezenas de milhares de indivíduos.

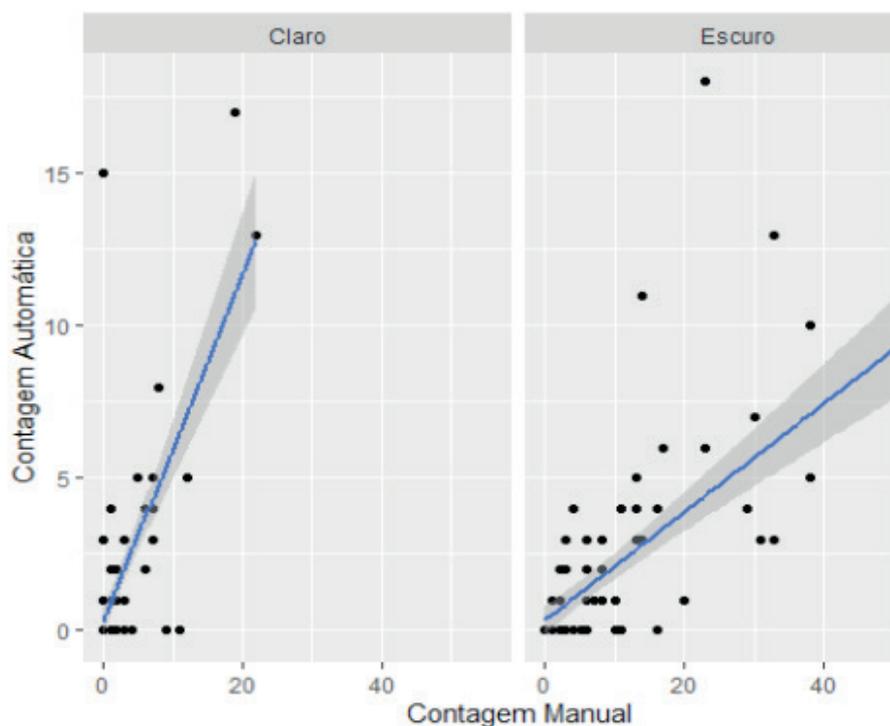


Figura 6: Relação das contagens manuais e automáticas para as fases de claro e de escuro. Note que no escuro a taxa de erro da contagem automática é muito alta.

Os resultados obtidos e utilizados na análise estatística se referem apenas às Contagens Manuais, devido à grande taxa de erro do Contador Automático. Para cada um dos três experimentos foi contabilizado o número de formigas encontradas nas fases de claro e escuro em cada um dos dias de filmagem (Figura 7), através do software de Contagem Manual. Foram analisados 212 vídeos, uma vez que 4 arquivos de vídeos do Piloto Longo estavam corrompidos.

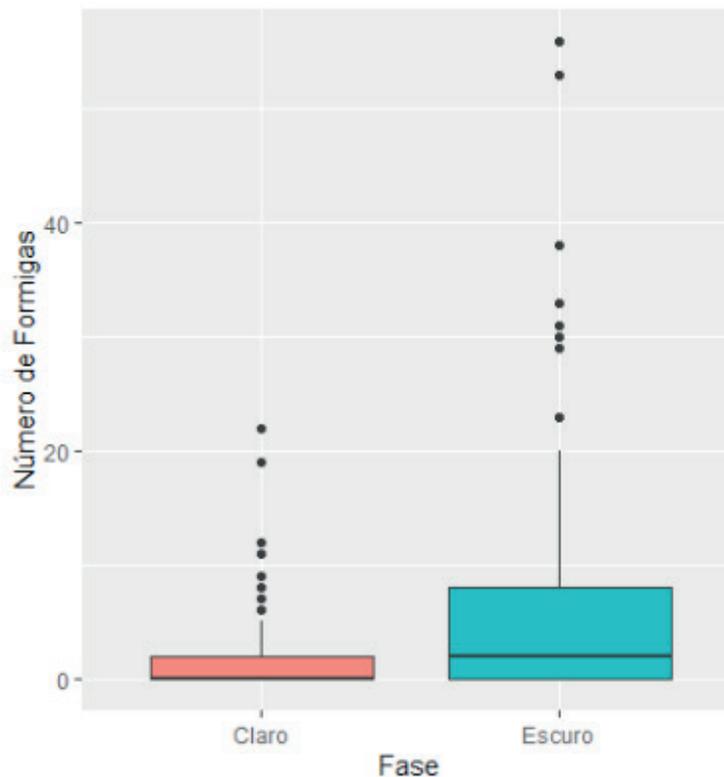


Figura 7: Boxplots das contagens automáticas de formigas na fase de claro e na fase de escuro para todos os experimentos.

No experimento piloto de trilha longa (Piloto Longo), encontramos uma maior quantidade de formigas na fase de escuro no primeiro e no segundo dia, enquanto no terceiro dia, havia mais formigas na fase de claro. Foram realizados dois experimentos pilotos de trilha curta: Pilotos Curtos I e II (Figura 8). Isso foi feito, uma vez que, durante o terceiro dia de filmagem do Piloto Curto I, o fungo da colônia apresentou um crescimento de aproximadamente quatro vezes, ainda que a colônia estivesse submetida a condições constantes como nos demais experimentos. Tal fenômeno indica um grande pico de atividade da colônia no período de filmagem, o que poderia de alguma forma enviesar os dados coletados. Diante disso, foi realizada uma réplica do experimento, na qual não ocorreu grande alteração do volume do fungo e a colônia manteve sua atividade aparentemente constante. No Piloto Curto I, observamos uma maior quantidade de formigas na fase de escuro durante todos os dias de experimento, com um grande pico de atividade na fase noturna das últimas 24h. Já no Piloto Curto II, encontramos mais formigas na fase de escuro apenas do primeiro e terceiro dias. No segundo dia, o total de formigas encontradas foi maior na fase de claro. Contudo, uma grande parte dessas formigas (34 de 40) foi encontrada nas duas últimas horas da fase de claro (entre as 16 horas e 17:59 horas), na qual ocorreu um evento de alimentação. Eventos de alimentação podem influenciar o ritmo de atividade de diversas espécies, uma vez que os ciclos de alimentação podem atuar como zeitgeber, agindo como sincronizadores de ritmos, assim como o ciclo de claro/escuro (Stephan, 2002, Mistlberger, 1994 e Terman, 1980). Este tipo de fenômeno é chamado mascaramento e corresponde a reações diretas dos organismos diante de estímulos (Aschoff, 1988). Este pode ter sido o motivo do maior número de indivíduos na trilha na fase de claro em detrimento da fase de escuro nesse dia.

Em ambos os experimentos piloto de trilha curta o fluxo de formigas foi maior do que no de trilha longa. O fluxo de formigas para cada uma das fases e dias de cada experimento encontra-se na Tabela I.

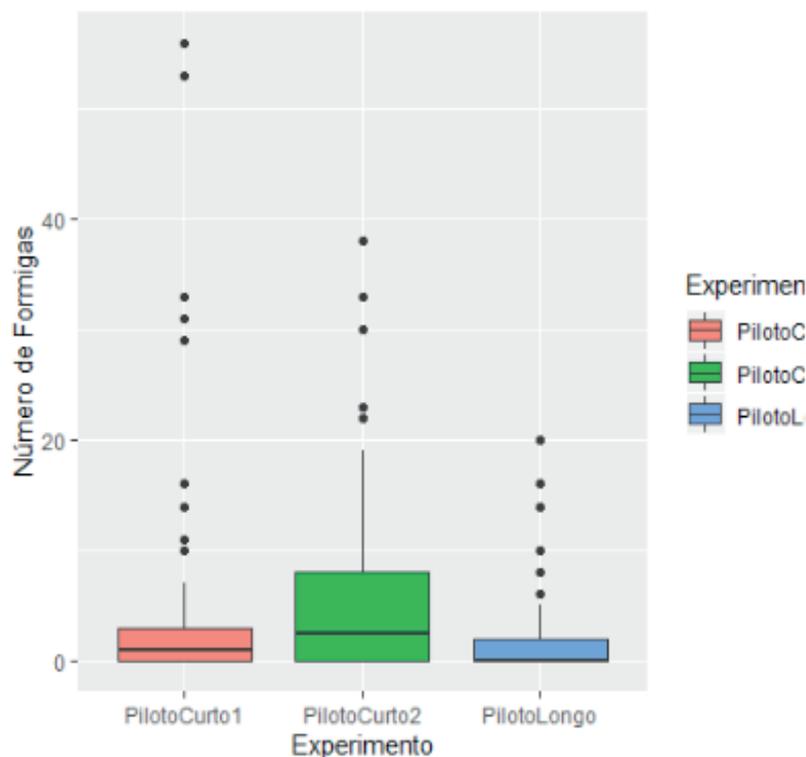


Figura 8: Boxplots mostrando as contagens automáticas de formigas para cada um dos três experimentos

Piloto Longo				
Fase	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Total
Claro	0,1677	1,5	0,8333	0,8333
Escuro	6,4167	2,4167	0,1667	3
Piloto Curto I				
Fase	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Total
Claro	1,3333	0,4167	0,9167	0,8889
Escuro	1,75	2,5833	21	8,4444
Piloto Curto II				
Fase	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Total
Claro	0,75	3,3333	6,9167	3,6667
Escuro	1,9167	3	22,3333	9,0833

Tabela I: Fluxo médio de formigas por hora para cada dia de experimento. A coluna 'Total' indica o fluxo de formigas para cada uma das fases agrupando os três dias de filmagem de cada experimento.

## B) Análise estatística

A cronobiologia possui uma estatística muito específica, a qual se baseia em séries temporais periódicas e possui métodos diferentes para ritmos populacionais, do organismo e a níveis celulares ou moleculares (Refinetti, 2007). Para este trabalho foram utilizadas três tipos de análises: cálculo de periodograma baseado nas séries de Fourier, teste T e

análise de variância de duas vias. O cálculo do periodograma foi feito em Python, utilizando os histogramas de contagens de fluxos para construção das séries temporais. Foi realizada a construção dos periodogramas para cada um dos três experimentos, porém, graças ao n baixo, os resultados não apresentavam significado de grande relevância biológica. Esta análise não foi incluída nesta discussão, uma vez que exige um n muito maior que o obtido até aqui (maior que 30 dias de filmagens, por exemplo). O aumento do n irá se construir com a continuidade do experimento.

Usou-se uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias para se comparar os efeitos de grupo (comprimento da trilha: longa ou curta) e de fase (claro ou escuro). Nessa análise, encontramos que grupo e fase são fatores independentes (Figura 9). Considerando um valor p crítico de 0.05, encontramos valores significativos de p tanto para o fator grupo quanto para o fator fase, com  $p = 0.006$  e  $p = 0.008$ , respectivamente. Tais valores indicam uma forte influência de ambos os fatores no fluxo de formigas. Para se complementar essas análises, foi feito um teste t avaliando os efeitos de fase para os três experimentos. Em todos eles também foram encontrados valores p significativos (Tabela II).

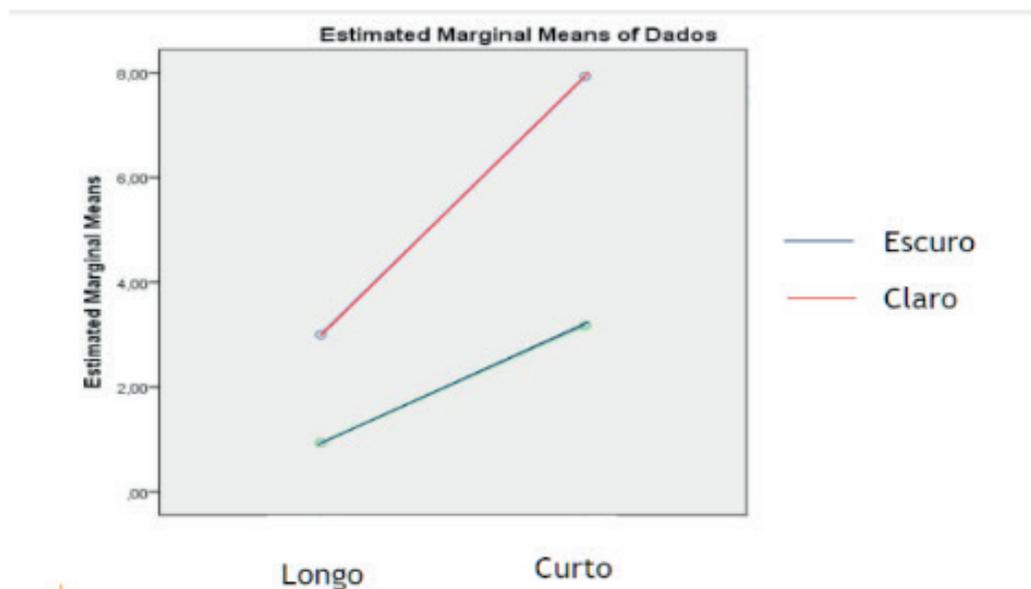


Figura 9: Gráfico da análise de variância de duas vias (grupo e fase). Note que a inclinação das retas revela que não há interação entre os fatores grupo e fase.

TESTE T	
Piloto Longo	0,0146
Piloto Curto I	0,0036
Piloto Curto II	0,0022

Tabela II: Valores p para diferença de fase (claro/escuro) para cada um dos experimentos piloto obtidos a partir do teste T.

Destacamos aqui que essas análises estatísticas não são as mais indicadas para avaliar esse tipo de questão, uma vez que, tipicamente, as contagens não apresentam distribuição normal - os dados se encaixam melhor em uma distribuição de Poisson (Figura 10); e que

o número de amostras para cada experimento (72) corresponde a um n muito pequeno. Uma vez que todos os resultados aqui divulgados se referem a experimentos iniciais, a continuidade dos experimentos possibilitará a solução dos problemas aqui encontrados.

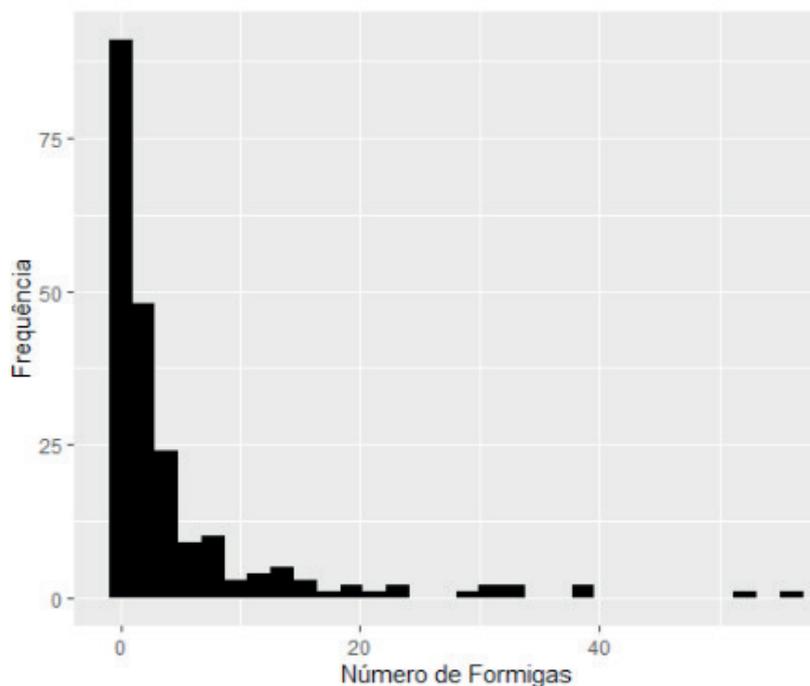


Figura 10: Histograma mostrando a frequência de contagens manuais para todos os experimentos.

## 4 | CONCLUSÕES

Diante do encontrado no presente trabalho, ressaltamos a importância do desenvolvimento do nosso software, bem como de softwares semelhantes, visto que os avanços computacionais em muito podem favorecer as descobertas científicas nesse tipo de sistema. Dessa forma, reduzir a taxa de erro no software de Contagem Automática é imprescindível para darmos continuidade aos estudos cronobiológicos que sucedem este trabalho.

A maior dificuldade em relação às análises dos resultados se deu devido à presença de muitos vídeos sem formigas. Não haver formigas em um vídeo de dois minutos daquela hora não significa necessariamente que não houve fluxo naquele intervalo de tempo. Dessa forma, é importante ajustar nosso protocolo experimental, aumentando o número de vídeos a cada hora ou aumentando a duração de cada vídeo. Uma vez que todos os resultados aqui apresentados correspondem a experimento pilotos e por isso, a experimentos de curta duração, faz-se necessária a ampliação do número de dias de experimento, permitindo maior número de afirmações sobre aspectos da organização temporal e da ritmicidade biológica desses organismos.

Assim como em trabalhos anteriores bem como em demais observações empíricas de nosso grupo, obtivemos que o fluxo de formigas é influenciado tanto pela fase do dia quanto pelo comprimento da trilha. Assim, mais formigas são encontradas na fase de escuro em

relação a fase de claro - podendo esse efeito ser minimizado por eventos de alimentação, bem como trilhas mais curtas tendem a apresentar maior fluxo de formigas em relação a trilhas mais longas. Esse aspecto é importante para protocolos experimentais futuros, especialmente naqueles que façam uso de ferramentas de software de video-tracking, uma vez que fluxos muito altos tendem a apresentar maiores taxas de erro de contagem para esse tipo de ferramenta.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente ao Dr. Marcelo Arruda Fiuza de Toledo, pelo desenvolvimento das várias ferramentas utilizadas nesse trabalho e pela colaboração ao longo de todo o seu desenvolvimento. Apoio: PUB-Universidade de São Paulo

## REFERÊNCIAS

Aschoff, J. (1979). **Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions**. *Zeitschrift fur Tierpsychology*. 49:225–249.

Aschoff, J. (1988). **Masking of Circadian rhythms by Zeitgebers as Opposed to Entrainment**. *Advances in the Biosciences* 73:149–161.

Bloch, G., Robinson, G.E., (2001). **Chronobiology: Reversal of honeybee behavioural rhythms**. *Nature*. 410, 1048.

Bloch, G., Toma, D.P., Robinson, G.E. (2001) **Behavioural rhythmicity, age, division of labor, and period expression in the honeybee brain**. *Journal of Biological Rhythms* 16:444–456.

Bloch, G., Barnes, B. M., Gerkema, M. P., & Helm, B. (2013). **Animal activity around the clock with no overt circadian rhythms: Patterns, mechanisms and adaptive value**. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1765).

Clark, E. (2006). **Dynamic matching of forager size to resources in the continuously polymorphic leaf-cutter and, *Atta colombica***. *Animal Cognition* 12: 21-30.

Frisch, B., Koeniger, N. (1994). **Social synchronization of the activity rhythms of honey bees within a colony**. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 35:91–98.

Ingram, K.K., Krummey, S., LeRoux, M. (2009) **Expression patterns of a circadian clock gene are associated with age-related polyethism in harvester ants, *Pogonomyrmex occidentalis***. *BMC Ecology* 9:7.

Kay, J., Menegazzi, P., Mildner, S., Roces, F., & Helfrich-Förster, C. (2018). **The Circadian Clock of the Ant *Camponotus floridanus* Is Localized in Dorsal and Lateral Neurons of the Brain**. *Journal of Biological Rhythms*, 33(3), 255–271.

McCluskey, E.S. (1958) **Daily rhythms in Male Harvester and argentine ants**. *Science* 128: 536-537.

McCluskey, E.S. (1965) **Circadian rhythms in male ants of five diverse species**. *Science* 150: 1037-1039.

- McCluskey, E.S. (1967) **Circadian rhythms in female ants, and loss after mating flight**. *Comparative Biochemistry and Physiology* 23:665-677.
- Mistlberger RE. (1994) **Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. V.18, n. 2, p. 171-195.
- Moore, D. (2001). **Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole colony rhythms**. *Journal Insect Physiology* 47:843–857.
- Moritz, R.F.A., Sakofski, F., 1991. **The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.)**. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 29, 361–365.
- Pittendrigh, C.S. (1993). **Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher**. *Annual Review of Physiology*. 55:17–54.
- Refinetti, R., Lissen, G.C., Halberg, F. (2007). **Procedures for numerical analysis of circadian rhythms**. *Biological Rhythm Research*. 38(4): 275–325
- Roces, F., Nunez, J.A. (1996) **A circadian rhythm of thermal preference in the ant *Camponotus mus*: masking and entrainment by temperature cycles**. *Physiological Entomology*. 21:138-142
- Sharma, V.K., Lone, S.R., Goel, A., Chandrashekar, M.K. (2004a) **Possible evidence for shift work schedules in the media workers of the ant species *Camponotus compressus***. *Chronobiology International* 21:297–308.
- Sharma, V.K., Lone, S.R., Goel, A., Chandrashekar, M.K. (2004b) **Circadian consequences of social organization in the ant species *Camponotus compressus***. *Naturwissenschaften* 91:386–390.
- Southwick, E.E., Moritz, R.F.A.. (1987). **Social synchronization of circadian rhythms of metabolism in honeybees (*Apis mellifera*)**. *Physiological Entomology* 12:209–221.
- Stephan FK. (2002). **The “Other” Circadian system: Food as a Zeitgeber**. *Journal of Biological Rhythms*. V.17, n. 4, p. 284-292.
- Terman M, Boulos Z (1980). **Food availability and daily biological rhythms**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. V.4, n. 2, p. 119-131.
- Toledo, M.A.F. (2014). **Aspectos temporais da organização coletiva do forrageamento em formigas saúvas (*Atta sexdens rubropilosa*)**. [doi:10.11606/D.41.2013.tde-12062013-092212]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Tese de Mestrado em Fisiologia Geral.
- Toledo, M.A.F. (2018). **Orientação espacial e comportamento coletivo em formigas saúvas**. [doi:10.11606/T.41.2018.tde-20092018-110950]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Fisiologia Geral.
- Toma, D.P., Bloch, G., Moore, D., Robinson, G.E. (2000). **Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honeybee colonies**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6914–6919.
- Weber, N.A. (1972). **The Fungus-Culturing Behavior of Ants**. *American Zoologist*, v. 12, n. 3, p. 577-587.
- Wilson, E.O. (1971). **The insects societies**. [S.l.]: Cambridge, Massachusetts, USA, Harvard University Press [Distributed by Oxford University Press].
- Wilson, E.O. (1980). **Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (*Hymenoptera: Formicidae: Atta*) II. Ther Ergonomic Optimization of Leaf Cutting**. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 7, n. 2, p. 143-156.

## CONTRIBUTION TOWARDS THE STUDY OF LEAF ANATOMY OF *Smilax brasiliensis* Spreng. (SMILACACEAE)

Data da submissão: 14/08/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### Myriam Almeida Barbosa

Universidade Federal de São João Del-Rei

Divinópolis – MG

<http://lattes.cnpq.br/9355258611793471>

### Marlúcia Souza Pádua Vilela

Universidade Federal de São João Del-Rei

Divinópolis – MG

<http://lattes.cnpq.br/5140359857613683>

### Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima

Universidade Federal de São João Del-Rei

Divinópolis – MG

<http://lattes.cnpq.br/0945022153163542>

### Ana Hortência Fonseca Castro

Universidade Federal de São João Del-Rei

Divinópolis – MG

<http://lattes.cnpq.br/8427649163529950>

**ABSTRACT:** A study on the leaf anatomy of *Smilax brasiliensis* was carried to contribute towards the identification of the species. Leaves were collected and fixed for light and electron microscopy analyses. Results showed that the leaves are amphistomatic leaves paracytic stomata, dorsiventral mesophyll, and vascular system formed by collateral bundles in an arc arrangement in the midrib. The stomata are sunken, a feature common in Cerrado plants,

with higher stomatal index and density on the abaxial surface. *S. brasiliensis* may be identified by the following characteristics: straight anticlinal cell walls from the frontal view, thick cuticle, epicuticular wax crustiform in the leaf blade and papillose in the petiole, ‘M-shaped’ cells in the mesophyll, vascular system with three to five collateral bundles in the midrib, petiole with vascular system formed by many collateral bundles randomly arranged around its axis and the presence of idioblasts containing clusters of single crystals, phenolic compounds and alkaloids in the mesophyll, midrib and petiole.

**KEYWORDS:** Salsaparrilha, internal morphology, medicinal plant.

### CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR DE *Smilax brasiliensis* Spreng. (SMILACACEAE)

**RESUMO:** Um estudo sobre a anatomia foliar de *Smilax brasiliensis*, uma espécie nativa dioica do Cerrado brasileiro foi conduzido, com o objetivo de contribuir para a identificação da espécie. Folhas foram coletadas e fixadas para análise por meio de microscopia de luz e eletrônica. Os resultados mostraram que as folhas são anfistomáticas, com estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral e sistema vascular formado por feixes colaterais, organizados em arco na nervura mediana. Os

estômatos são profundos, uma característica comum em espécies do Cerrado, com maior índice e densidade estomática na superfície abaxial. *S. brasiliensis* pode ser identificada pelas seguintes características: paredes celulares anticlinais retas, em vista frontal, cutícula espessa, cera epicuticular crustiforme na lâmina foliar e papilosa no pecíolo, células com formato de “M” no mesofilo, sistema vascular com três a cinco feixes colaterais na nervura mediana, pecíolo com sistema vascular formado por muitos feixes colaterais distribuídos aleatoriamente ao redor de um eixo e presença de idioblastos contendo aglomerados de monocristais, compostos fenólicos e alcaloides no mesofilo foliar, nervura mediana e pecíolo. **PALAVRAS-CHAVE:** Salsaparrilha, morfologia interna, planta medicinal.

## 1 | INTRODUCTION

The Smilacaceae family is composed of dioecious plants, vines, or rarely, subshrubs or shrubs that exhibit great phenotypic plasticity in neotropic regions. It consists only of the *Smilax* genus, with 310 species distributed worldwide in temperate, subtropical and especially tropical regions (Andreato, 2009; Ferrufino-Acosta, 2010; Judd et al., 2009). In Brazil, the genus is represented by 32 species distributed among various ecosystems, but principally within the southeastern Atlantic Coast Rain Forest (Andreato, 2009). *Smilax* species are known in Brazil as *salsaparrilha* or *japecanga* and the roots and rhizomes are used in traditional medicine as anti-syphilitic, anti-hypertensive, sudorific, rheumatic, cutaneous diseases and as a tonic, diuretic and stimulant (Breitbach et al., 2013). The main components found in the genus are steroidal saponins, phytosterols, triterpenoids, flavonoids and phenolic acids (Breitbach et al., 2013).

*Smilax* is a taxonomically difficult genus because the plants are dioecious and show wide phenotypic variations (Ferrufino-Acosta, 2010). Identification requires the combined examination of foliage and flowers of both sexes and often fruits. Unfortunately, locating populations of mature individuals in all reproductive phases is often impractical (Moore et al., 2008; Moore et al., 2010). According to Moore et al. (2010), several investigations have examined the diagnostic value of leaves. Although leaves are probably the most varied anatomical organ of angiosperms, the taxonomic value of features such as stomata structure, surface ornamentation and epidermal cell wall configuration has been repeatedly demonstrated (Metcalf and Chalk, 1979; Moore et al., 2008).

The morphoanatomy of the vegetative organs of *Smilax* species that occur in Brazil has been currently described and used as tools for the identification of *Smilax campestris*, *S. cissoides*, *S. fluminensis*, *S. brasiliensis*, *S. goyazana*, *S. oblongifolia* and *S. rufescens* (Martins et al., 2013), *Smilax polyantha* (Martins and Appezzato-da-Glória, 2006), *Smilax elastica*, *S. fluminensis*, *S. rufescens*, *S. spicata* and *S. subsessiliflora* (Dias-Neto et al., 2013), *S. quinquenervia*, *S. stenophylla* and *S. subsessiliflora* (Guimarães et al., 2010), *Smilax petiolatumidus* (Moore et al., 2008), *Smilax syphilitica* and *Smilax aff. syphilitica* (Silva et al., 2012) and *Smilax goyazana* (Palhares et al., 2009).

Some aspects of leaf blade anatomy of *Smilax brasiliensis* were described by Martins et al. (2013). However, due to the great phenotypic plasticity attributed to *Smilax* species, many of these features may vary according to their specific habitat. Moreover, size and density of the stomata, petiole anatomy, calcium oxalate crystals type and certain metabolites, such as starch and phenolic compounds in leaves, are valuable for the identification (diagnosis) of different species (Metcalf and Chalk, 1979). The stomata index and density also contribute for studies of crop production (Martins et al., 2013). Current analysis is an in-depth study on the anatomy of *Smilax* genus to contribute towards the identification of *S. brasiliensis* and to support the group's taxonomy.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

Leaves of five adult specimens of *Smilax brasiliensis* Sprengel (Smilacaceae) were collected in the municipality of Ijaci, southern region of the Minas Gerais state, Brazil (21°13'46"S and 44°58'32"W, average altitude 908 m) in March, 2014. Collections were made under a permit issued by IBAMA n. 5042260. The voucher specimen was identified by Dr. Regina Helena Potsch Andreato and incorporated into the PAMG Herbarium (PAMG 56551), of the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

The leaves were fixed in formalin:acetic acid:70% ethanol (FAA, 18:1:1) and stored in 70% ethanol (Johansen, 1940). Leaf anatomy was based on handmade paradermal and transversal sections. The cross-sections were clarified with 50% sodium hypochlorite commercial solution, and stained with safranin and Astra-Blau (Safrablau) (Bukatsch, 1972, modified). The paradermal sections were stained with 1% safranin and mounted in 50% glycerin.

Quantitative studies of stomata were performed according Justo et al. (2005). Ten leaves of five specimens were analyzed. Thirty fields of the leaf blade (including basal, middle and distal parts) were evaluated to determine the index and density of the stomata and the stomata diameter (polar and equatorial). Stomata diameter was calculated in one stomata per field, with program Axio Visio Rel. 4.8. The stomata index (I) and density (D) were calculated by the expressions:  $I(\%) = NS/(NS+EC) \times 100$  (Cutter, 1986) and  $D(\text{stom./mm}^2) = NS/A$  (Labouriau et al., 1961), respectively, where NS=number of stomata, EC=number of epidermal cells and A= area (mm<sup>2</sup>). Data were analyzed by ANOVA tests and means were compared by Tukey's test at 5% significance. Results were given as mean  $\pm$  standard deviation. All the sections were examined with a Zeiss Primo Star light microscope and documented by AxioVision.

A micromorphological study was carried out on 0.5 cm<sup>2</sup> fragments of the third median of the leaf blade and on petiole fragments. Samples were SEM-observed (LEO Evo 40 XVP) by immersion in the fixative modified Karnovsky, 2.5% glutaraldehyde, 2.0% paraformaldehyde, 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 24h, and prepared according to protocol by Bossola and Russell (1999). The stomata were identified according to Wilkinson classification (Wilkinson, 1979). Results were recorded on electromicrographs with the scales projected under the

same electronic conditions.

For the recognition of cellular metabolites, the following microchemical analyses were performed: ferric chloride for phenolic compounds (Johansen, 1940), zinc chloride-iodine for lignified elements and starch (Jensen, 1962); Dragendorff's reagent for alkaloids (Costa, 1982); Sudan III (Sass, 1951) for lipids in general; Lugol for starch (Berlyn and Miksche, 1976); Hydrochloric acid 10% (Chamberlain, 1932) for identification of oxalate and calcium carbonate crystals. Sections were examined with a Zeiss Primo Star light microscope and documented by AxioVision.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The ultrastructural analysis showed that the leaf is completely covered with a dense wax layer making visible only the stomatal pore. The epicuticular wax is crustiform in the leaf blade, papillose in the petiole and crystalloids of wax were observed, especially granule forms of different shapes and sizes (Figures 1A and 1B). The stomata are sunken and trichomes are absent. Distinct types of wax deposition and ornamentation of the leaf cuticle may be found in different *Smilax* species as for example scales-like in *S. polyantha* (Martins and Appezzato-da-Glória, 2006), papillose wax deposition in *S. campestris* and *S. oblongifolia* and crusty protuberances on the adaxial side and papillose wax deposition on the abaxial surface in *S. brasiliensis* leaves (Martins et al., 2013). Consequently, the cuticular deposition pattern of *S. brasiliensis* differs from that reported by Martins et al. (2013) and may be due to variations in ecological and climate conditions during leaf development. In fact, they may affect the wax deposition and ornamentation of the leaf cuticle as well described by Moore et al. (2008) and Moore et al. (2010). In frontal view, the epidermal cells on the adaxial and abaxial surfaces have straight anticlinal walls and the cuticle is thick on both surfaces (Figures 1C and 1D). The leaves are amphistomatic, with paracytic stomata, and straight anticlinal walls are also reported for *S. goyazana* and *S. brasiliensis* (Martins et al., 2013). However, sinuous anticlinal walls were described for other species such as *S. elastica*, *S. rufescens*, *S. campestris*, *S. fluminensis*, *S. oblongifolia*, *S. quinquenervia* and *S. syphilitica* and wavy for *S. fluminensis*, *S. spicata* and *S. subsessiliflora* (Dias-Neto et al., 2013; Guimarães et al., 2010; Martins et al., 2013; Silva et al., 2012). According to Dias-Neto et al. (2013), the above characteristic varies among *salsaparrilhas* and may be useful to separate or to group the species.

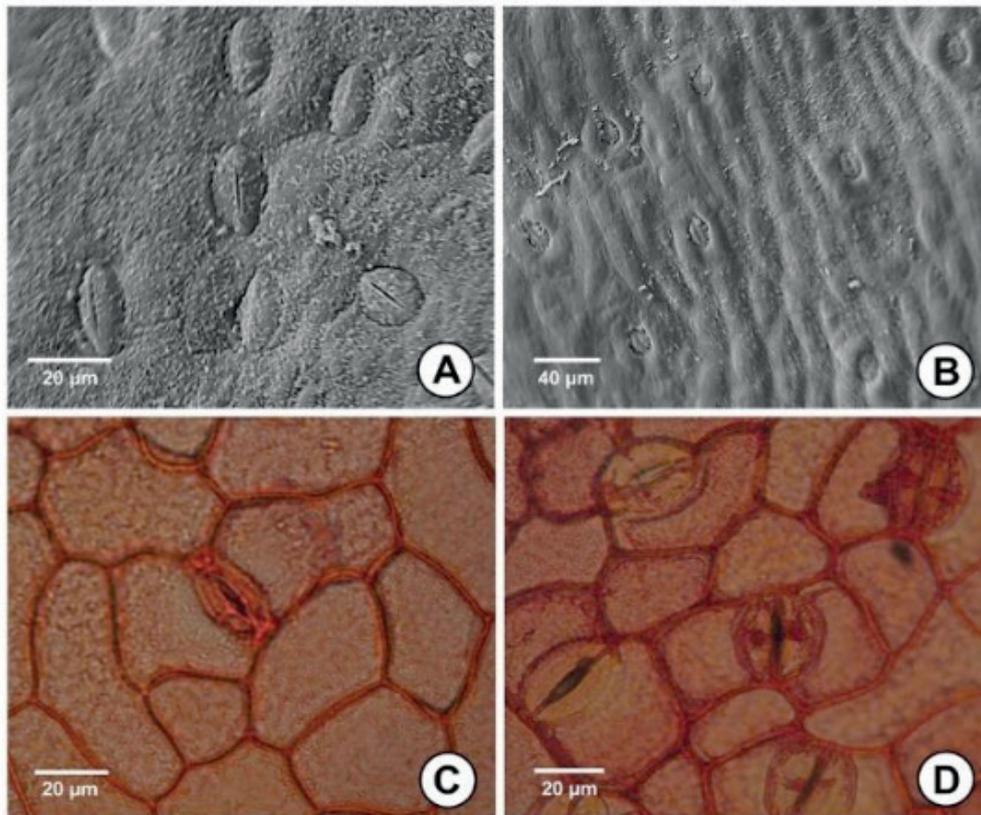


FIGURE 1: Eletromicrographs (A and B) and photomicrographs (C and D) of *S. brasiliensis* epidermis in frontal view. A. Abaxial surface; B. Petiole; C. Adaxial and D. Abaxial surface (Note the crustiform-type epicuticular in A and papillose in B; straight anticlinal walls and paracytic stomata in C and D).

The leaf is amphistomatic only in *S. goyazana*, *S. brasiliensis* (Martins et al., 2013) and *S. fluminensis* (Dias-Neto et al., 2013), but hypostomatic in the other species (Dias-Neto et al., 2013; Guimarães et al., 2010; Martins and Appezzato-da-Glória, 2006; Martins et al., 2013). The stomata type may vary among *Smilax* species. In fact, they are paracytic in *S. goyazana*, *S. oblongifolia*, *S. brasiliensis*, *S. rufescens*, *S. polyantha* and *Smilax syphilitica*; anomocytic in *S. cissooides* and *S. campestris* and anisocytic, anomocytic and paracytic in *S. fluminensis* (Dias-Neto et al., 2013; Martins and Appezzato-da-Glória, 2006; Martins et al., 2013, Silva et al., 2012).

The quantitative analysis of *S. brasiliensis* stomata (Table 1) showed that the abaxial surface exhibited higher stomatal index and density, with an average of 18.30% and 227.90 stom./mm<sup>2</sup> on the abaxial surface and 10.60% and 131.80 stom./mm<sup>2</sup> on the adaxial surface, respectively ( $p < 0.05$ ). However, the stomatal index and density did not vary between apex, middle and base of leaf blade ( $p > 0.05$ ) when adaxial and abaxial surfaces were evaluated singly. The stomata had a mean polar and equatorial diameter of 31.20  $\mu\text{m}$  and 24.0  $\mu\text{m}$ , respectively. Variations in stomatal size in different regions and surfaces of the leaf were not observed ( $p > 0.05$ ).

<b>ADAXIAL SURFACE</b>				
	Stomatal index (%)	Stomatal density (stom./ mm <sup>2</sup> )	Diameters (µm)	
			Polar	Equatorial
Apex	10.93 ± 1.19 b	134.94 ± 11.14 b	31.65 ± 2.12 a	23.90 ± 1.34 a
Middle	10.25 ± 0.99 b	127.65 ± 13.49 b	31.77 ± 2.45 a	24.12 ± 1.12 a
Base	10.63 ± 1.17 b	132.75 ± 11.79 b	31.34 ± 2.01 a	24.14 ± 1.25 a
<b>ABAXIAL SURFACE</b>				
	Stomatal index (%)	Stomatal density (stom./ mm <sup>2</sup> )	Diameters (µm)	
			Polar	Equatorial
Apex	18.61 ± 2.01 a	240.89 ± 20.23 a	30.89 ± 1.49 a	24.07 ± 1.43 a
Middle	18.97 ± 2.24 a	214.28 ± 22.09 a	30.35 ± 1.74 a	23.62 ± 1.23 a
Base	17.25 ± 2.53 a	228.55 ± 19.34 a	31.07 ± 1.98 a	23.81 ± 1.55 a

Means in the column followed by the same letter are not significantly different at  $p \leq 0.05$  by the Tukey test.

TABLE 1. Quantitative analysis of stomata in *Smilax brasiliensis* leaves.

The stomatal density observed in abaxial surface of *S. brasiliensis* leaf was higher than that reported by Dias-Neto et al. (2013) for some Brazilian species of *Smilax* with hypostomatic leaves, such as *S. fluminensis* (198/mm<sup>2</sup>), *S. elastica* (147/mm<sup>2</sup>), *S. muscosa* (139/mm<sup>2</sup>), *S. rufescens* (118/mm<sup>2</sup>), *S. subsessiliflora* (98/mm<sup>2</sup>) and *S. spicata* (66/mm<sup>2</sup>) and suggest a greater adaptation capacity of *S. brasiliensis* to environments with water stress.

In the cross-section, the epidermis is one-layered and the cells are elongated, with thin and flat periclinal walls; anticlinal walls occur on both surfaces (Figure 2A). The heterogeneous mesophyll comprised a compact palisade parenchyma with some layers of 'M'-shaped cells juxtaposed to the adaxial epiderm (Figure 2A, arrow) and spongy parenchyma in an adjacent position to abaxial epiderm, with loosely cells arranged and large intercellular spaces. The palisade parenchyma fills almost half of the mesophyll. Sclerified cells of variable wall thickening are associated to the vascular lateral bundles adjacent to the surfaces and the xylem is turned to the adaxial surface (Figure 2B). The stomata were not prominent and subsidiary cells were larger when compared to guard cells. Idioblasts with clusters of single calcium oxalate crystals were distributed randomly in the mesophyll. Secretory structures were not observed.

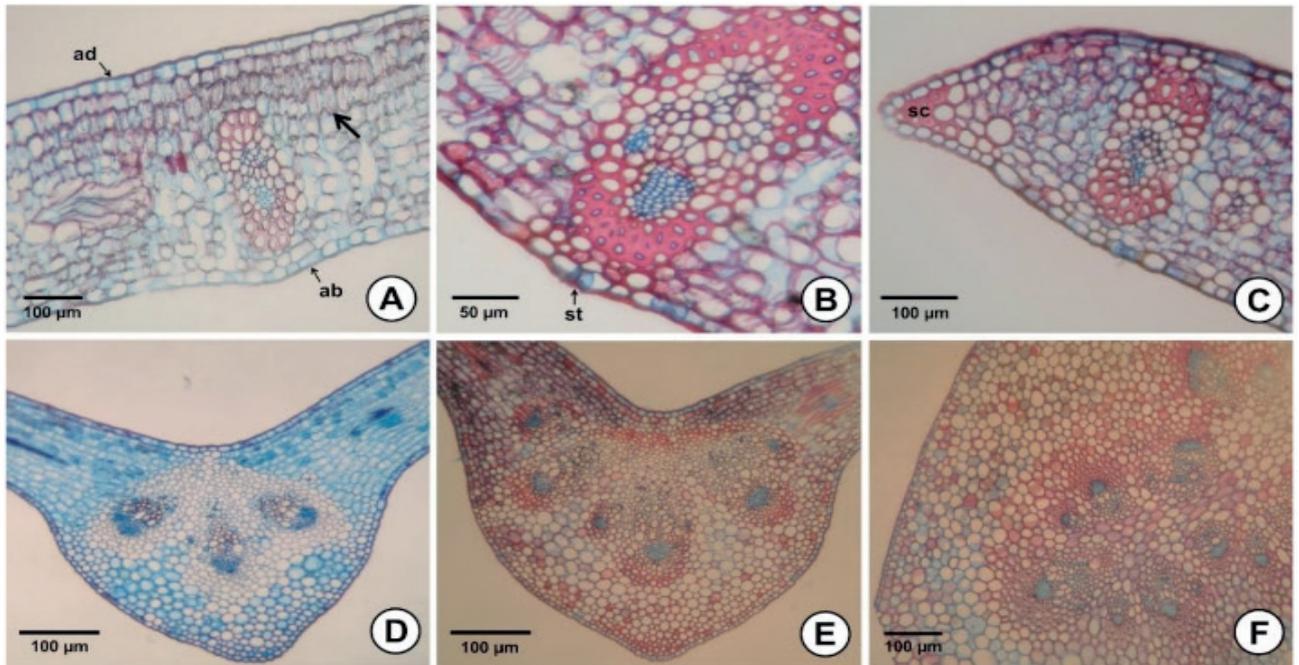


FIGURE 2: Photomicrographs of cross-section of leaf blade (A-E) and petiole (F) of *S. brasiliensis*. A. Dorsiventral mesophyll (arrow = 'M-shaped' cells); B. Detail of vascular bundle (note the sclerified cells around the vascular bundle); C. Blade edge with a slight revolute and narrow contour (note the sclerified cells); D. Midrib region showing a vascular system with three (D) and five (E) collateral bundles in arc arrangement; F. Partial view of the petiole showing the vascular system with collateral bundles randomly arranged, surrounded by sheath fibers. ad: adaxial surface; ab: abaxial surface; st: stomata; sc: sclerified cells.

A thick cuticle especially on the adaxial surface is common in *Smilax* and has been reported for other *Smilax* species by Dias-Neto et al. (2013), Guimarães et al. (2010), Martins et al. (2013) and Silva et al. (2012). The cuticle decreases water evaporation in the tissues and prevents wilting caused by drought (Martins et al., 2013). The heterogeneous or dorsiventral mesophyll has also been reported in *S. auriculata*, *S. bona-nox*, *S. glauca*, *S. laurifolia*, *S. rotundifolia*, *S. smallii*, *S. tamnoides*, *S. walteri* (Yates and Duncan, 1970) and *S. campestris* (Gattuso, 1995). However, Martins and Appezzato-da-Glória (2006) and Martins et al. (2013) reported that the mesophyll tends to be dorsiventral in *S. polyantha*, *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoids*, *S. goyazana*, *S. oblongifolia* and *S. rufescens* because the palisade parenchyma in the adult leaf presents large cells with pronounced sinuosity or 'M-shaped' cells. Dias-Neto et al. (2013) observed the same aspect for *Smilax elastica*, *S. fluminensis*, *S. rufescens*, *S. spicata* and *S. subsessiliflora*. Sclerified cells on the mesophyll and around the vascular system are common in the Cerrado leaves. These cells prevent cellular collapse of the mesophyll when the leaf loses water (Bieras and Sajo, 2009).

Idioblasts containing calcium oxalate crystals such as prisms, crystal sand and raphides, also are commonly found in the mesophyll of *Smilax* species (Dias-Neto et al, 2013; Guimarães et al, 2010; Martins and Appezzato-da-Glória, 2006; Martins et al, 2013). Prychid and Rudall (1999) noted that the absence, presence and shape of calcium oxalate crystals are 'useful taxonomic features' in classifying monocotyledons. In current study, only clusters of single calcium oxalate crystals with prismatic shape were observed and raphides were not found in the *S. brasiliensis* leaves, contrary to observed by Martins et al. (2013). This fact suggests

adaptation of *S. brasiliensis* leaves to environment without herbivory and may be a criterion to diagnose and recognize the species.

The blade edge is slightly revolute and the contour is narrow (Figure 2C). The cuticle is usually thick and the epidermal cells have thick anticlinal walls. The subepidermal region is parenchymatous, although sclerified cells have been registered. The mesophyll maintains the leaf characteristics; however, there is a reduction in the number of parenchyma layers in the distal portion of the edge, and fibers, with a high degree of lignification were evidenced by the zinc chloride-iodine test, which is responsible for small cell lumen (data not shown). Isolated idioblasts were observed in this region. The blade edge is also slightly revolute in *S. quinquenervia*, *S. stenophylla* (Guimarães et al., 2010), *S. elastica*, *S. spicata* and *S. subsessiliflora* and straight in *S. fluminensis* and *S. rufescens* (Dias-Neto et al., 2013). The sclerenchyma reinforcement pattern was also mentioned by Marquette and Pontes (1994) for *S. fluminensis*, *S. spicata* and *S. rufescens*.

The midrib has a concave adaxial region whereas the vascular system is dislocated to the abaxial region originating a prominent vein (Figure 2D). Three to five collateral bundles form the vascular system in arc arrangement, surrounded by fibers, which generally form a thick sheath. The vascular system is usually composed of three large bundles in the middle region, but close to the petiole are found five bundles (three major and two minor) (Figures 2D and 2E). Clusters of single calcium oxalate crystals with different sizes and shapes are common in cells of the cortical and medullary parenchyma. The midrib is concave-convex in *S. spicata*, *S. subsessiliflora* and *S. quinquenervia*; plane-convex in *S. elastica*, *S. fluminensis*, *S. stenophylla* and *S. subsessiliflora* and slightly prominent on the abaxial surface of *S. rufescens* (Dias-Neto et al., 2013; Guimarães et al., 2010).

Collateral bundles, surrounded by expressive sheaths of sclerenchymatic fibers, are a very common feature in the *Smilax* species (Silva et al., 2012). In *S. polyantha*, Martins and Appezzato-da-Glória (2006) described the presence of five major vascular bundles and five smaller vascular bundles, distributed in an arc design and surrounded by the sclerified pericycle. According to Martins et al. (2013), *S. brasiliensis*, *S. cissoides* and *S. fluminensis* have three similarly sized central vascular bundles that are individually wrapped by lignified cells. They are surrounded by a single continuous sheath in *S. campestris*, *S. oblongifolia*, *S. goyazana* and *S. rufescens*. However, in current analysis, the number of vascular bundles in *S. brasiliensis* varies according to the position on the midrib and suggests that the three bundles described by Martins et al. (2013) just occur in the distal region of the midrib.

The petiole's outline is plane-convex when it is near the leaf blade and circular when it is close to the stem, in cross-section (data not shown). The surface is usually covered by a thick cuticle. The epidermis is one-layered and the periclinal and anticlinal walls are thick. The petiole cortex is parenchymatous and the cells show thick walls. Further, one type of vascular patterns was identified. The vascular system is formed by many collateral bundles randomly arranged around the axis and surrounded by sheath fibers suggesting an atactostele structure (Figure 2F). Sclerified cells evidenced by zinc chloride-iodine are common in the cortical parenchyma. Clusters of single calcium oxalate crystals have been observed in cortical and

medullary parenchyma. According to Dias-Neto et al. (2013), the vascular system of the midrib and the petiole in *Smilax elastica*, *S. fluminensis*, *S. rufescens*, *S. spicata* and *S. subsessiliflora*, do not have the atactostele structure common to other monocotyledons, but are organized in arc or around an axis, respectively. Martins et al. (2013) described vascular bundles surrounded by sclereids and fibers in different *Smilax* species. Sclereids types vary among the species and the following may be found: fibriform and columnar sclereids in *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* and *S. rufescens*, columnar sclereids in *S. oblongifolia*, astrosclereids in *S. goyazana* and astrosclereids, and columnar sclereids in *S. fluminensis*.

Starch was detected in the mesophyll (epidermal and parenchyma cells), in the midrib and especially in the cortical and medullar parenchyma and around the vascular bundles in the petiole (Figure 3A). Phenolic compounds detected by ferric chloride were found in epidermal and parenchyma cells close to vascular bundles in the midrib (Figure 3B), in the mesophyll and in the petiole. Lipid substances were observed in epidermal cells in the leaf blade and petiole (Figure 3C).

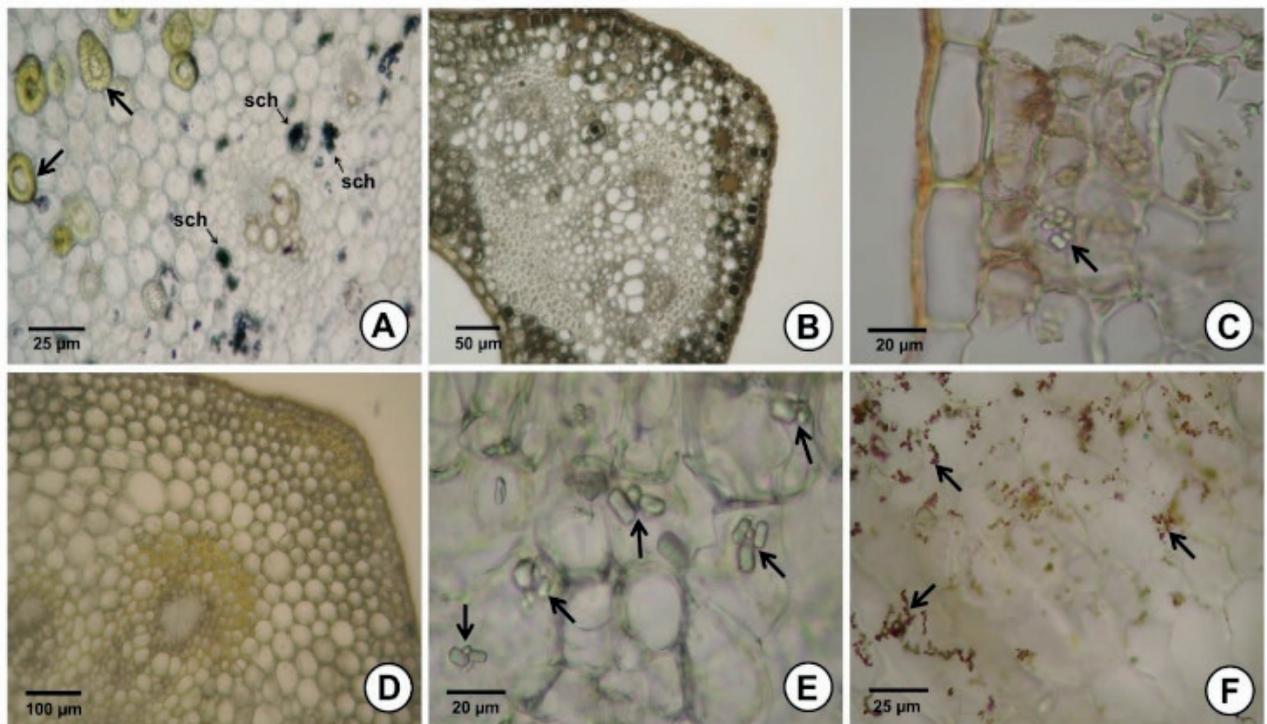


FIGURE 3: Microchemistry of *S. brasiliensis* leaves. A. Zinc chloride-Iodine test showing starch grains (sch) and lignin (arrow); B: Ferric chloride test showing phenolic compounds; C. Sudan evidencing lipids in cuticle (arrow = calcium oxalate crystals); D. Detail of lignin presence around vascular bundle; E. Clusters of single calcium oxalate crystals (arrows); F. Alkaloids identified by Dragendorff's reagent.

Lignin was detected in the subepidermal region, parenchyma and around the vascular bundles in the midrib and petiole (Figure 3D). Idioblasts bearing calcium oxalate crystals (clusters of single crystals) were observed in the leaf mesophyll, midrib and petiole (cortical and medullary parenchyma) (Figure 3C and 3E, arrow). Alkaloids were detected in all mesophylls, in the midribs and in the petioles, especially in cortical and medullar parenchyma (Figure 3F).

Several substances have been detected in leaves of *Smilax* species and they have a

diagnosis value. Phenolic compounds and starch were also registered by Dias-Neto et al. (2013) in parenchyma cells of the midrib located between the vascular bundles in *Smilax elastica*, *S. fluminensis*, *S. rufescens* and *S. spicata*. Silva et al. (2012) described the presence of phenolic, protein, and starch grain (the latter two are only observed in the midrib) in leaf blade cells of *S. syphilitica*. Idioblasts containing phenolic compounds and raphides were found in the mesophyll of *S. campestris*, *Smilax brasiliensis*, *S. cissoides*, *S. fluminensis*, *S. goyazana*, *S. oblongifolia*, and *S. rufescens* by Martins et al. (2013) and *S. polyantha* by Martins and Appezzato-da-Glória (2006). Although alkaloids are unusual in anatomical studies of *Smilax* leaves, the results of current study are related to the previous work carried out by Rondina and Coussio (1981) and Cáceres (1998) who reported the presence of alkaloids in extracts of *S. campestris* and *S. regelii* leaves. This is the first report of the presence of alkaloids in *Smilax* leaves evidenced by microchemical tests and may have a diagnosis value. However, more studies are required to confirm these compounds in the leaves of *Smilax* species and verify that their presence may be affected by soil and/or climatic conditions. In addition, phytochemical studies will be necessary to determine the chemical structures of the compounds.

In conclusion, the information obtained in this work expand knowledge on the leaf anatomy of *S. brasiliensis* and the presence of clusters of single calcium oxalate crystals and alkaloids may be of taxonomic relevance for the specie. Cuticle ornamentation, epicuticular wax type, the pattern of anticlinal cell walls, 'M-shaped' cells in the mesophyll, arrangement of collateral bundles in the midrib, the type and localization of crystals and idioblasts with phenolic compounds may be used to identify *S. brasiliensis*. However, these characteristics should be considered together since, when taken singly, they have a low specific diagnosis value due to their occurrence in different species of *Smilax* genus.

#### 4 | ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The authors gratefully thank Dr. Regina Helena Potsch Andreatta (Universidade Santa Úrsula, Jardim Botânico do Rio de Janeiro) and Andréia Fonseca Silva (Herbário PAMG/EPAMIG) for specimen identification and Mairon César Coimbra (UFSJ) for contribution to the formatting of figures.

#### REFERENCES

- ANDREATA, R. H. P. A new species of *Smilax* and a key to all species from Minas Gerais, Brazil. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 28-31, 2009.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976.
- BIERAS, A. C.; SAJO, M. das G. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, v. 23,

n. 3, p. 451–471, 2009.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999.

BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.

BUKATSCH, F. **Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina**. Stuttgart: Microkosmos, 1972.

CÁCERES, A. **Zarzaparrilha. Plantas medicinales del género Smilax en Centroamérica**. Costa Rica: Turialba, 1998.

CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1982.

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. São Paulo: Editora Roca, 1986.

DIAS-NETO, A. de O. et al. Anatomia de cinco espécies brasileiras de Smilax L. (SMILACACEAE). **Pesquisas, Botânica**, n. 64, p. 101-114, 2013.

FERRUFINO-ACOSTA, L. Taxonomic revisión of the genus Smilax (Smilacaceae) in Central America and the Caribbean Islands. **Willdenowia**, v. 40, n. 2, p. 227-280, 2010.

GATTUSO, S. J. Exomorfología y anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 14, n. 3, p. 181-190, 1995.

GUIMARÃES, A. R. et al. Anatomia foliar de espécies brasileiras de Smilax L.: *S. quinquenervia* Vell., *S. stenophylla* A.DC. E *S. subsessiliflora* Duham. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.1, p. 77-87, 2010.

JENSEN, W. A. **Botanical, principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JUSTO, C. F. et al. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 111-123, 2005.

LABOURIAU, L. G. et al. Transpiração de *Schizolobium parahiba* (Vell.) Toledo: comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 33, n. 2, p. 237-257, 1961.

MARQUETTE, O.; PONTES, R. G. Estudo anatômico foliar comparativo de *Smilax spicata* Vell., *Smilax rufescens* Griseb. e *Smilax fluminensis* Steudel. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3, p. 413-426, 1994.

MARTINS, A. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 555-567, 2006.

MARTINS, A. R. et al. Aerial stem and leaf morphoanatomy of some species of *Smilax*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 576-584, 2013.

METCALF, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: New York Clarendon Press, 1979.

MOORE, B. R. et al. A preliminary systematic analysis of leaf epidermal characters for six *Smilax* species in Thailand. **ScienceAsia**, v. 36, n. 3, p.175-179, 2010.

MOORE, B. R. et al. Epicuticular leaf architecture confirms a new *Smilax* species (Smilacaceae) from northeast Thailand. **ScienceAsia**, v. 34, n. 1, p. 103-106, 2008.

PALHARES, D. et al. Leaf anatomy of *Smilax goyazana* (Smilacaceae). **Acta Botanica Hungarica**, v. 51, n. 1-2, p. 115-127, 2009.

PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematic. **Annals of Botany**, v. 84, n. 6, p 725-739, 1999.

RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. **Ensayos fitoquímicos orientativos de plantas con actividad farmacológica potencial**". Buenos Aires: FfyB, UBA, 1981.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Ames: Iowa State College, 1951.

SILVA, J. M. et al. Aerial organ anatomy of *Smilax syphilitica* (Smilacaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 60, n. 3, p. 1137-1148, 2012.

YATES, I. E.; DUNCAN, W. H. Comparative studies of *Smilax*, section *Smilax*, of the southeastern United States. **Rhodora**, v. 72, n. 790, p. 289-312, 1970.

WILKINSON, H. P. The plant surface (Mainly leaf). In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. (Ed.) **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: New York Clarendon Press, 1979. p. 97-165.

## ACANTHACEAE DOS JARDINS DO MUSEU DE BIOLOGIA MELLO LEITÃO, SANTA TERESA-ES: ESPAÇO NÃO FORMAL E O ENSINO DE BOTÂNICA

Data de aceite: 18/06/2020

### Elisa Mitsuko Aoyama

Universidade Federal do Espírito Santo,  
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas,  
Laboratório de Botânica, São Mateus – ES  
<http://lattes.cnpq.br/0299586072690797>

### Alexandre Indriunas

Universidade Federal do Espírito Santo,  
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas,  
Laboratório de Botânica, São Mateus – ES  
<http://lattes.cnpq.br/6611774718197728>

**RESUMO:** O espaço não formal de ensino permite o compartilhamento de experiências, principalmente de situações interativas construídas coletivamente. A educação nesse ambiente não se organiza em níveis de escolaridade, idade ou conteúdo, como nos espaços formais. Nesse contexto o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial do emprego de espécies de Acanthaceae ocorrentes na área de visitação Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML), em espaço não formal de ensino com ênfase para a Botânica. Foram levantadas as espécies da família ocorrentes no jardim, classificadas quanto ao hábito, características morfológicas e síndrome de polinização. Foram listadas onze espécies

pertencente a Acanthaceae, com hábito herbáceo, arbustivo e trepadeira. A maioria das espécies apresenta síndrome de polinização de ornitofilia, com especialização para beija-flores. Dessa forma, as espécies encontradas neste ambiente podem ser facilmente utilizadas para diferentes assuntos da Botânica, ressaltando os temas de morfologia e interações planta-animal. Nesse contexto, a utilização de espaços não formais propicia aos estudantes vivência distinta do ambiente formal da sala de aula, onde geralmente pouca informação é retida pelo decréscimo da atenção, em contra partida aos estímulos propiciados em ambientes distintos. O apelo sensorial de plantas em campo, especialmente o aspecto visual, atrai os estudantes e possibilita um recurso didático inestimável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Recurso didático, educação não formal, ensino de Ciências.

### ACANTHACEAE FROM THE MUSEU DE BIOLOGIA MELLO LEITÃO'S GARDENS, SANTA TERESA-ES: NON-FORMAL ENVIRONMENT AND THE BOTANY TEACHING

**ABSTRACT:** The non-formal learning environment allows the sharing of experiences, mainly of interactive situations collectively constructed. Education in this environment is

not organized in levels of education, age or content, as in formal spaces. In this context, the present work aims to evaluate the potential of the use of Acanthaceae species occurring in the visiting area Instituto Nacional da Mata Atlântica / Professor Mello Leitão Biology Museum (INMA / MBML), in a non-formal learning environment within emphasis on the Botany. The family species found in the garden were surveyed, classified according to habit, morphological characteristics and pollination syndrome. Eleven species belonging to Acanthaceae, with herbaceous, shrub and climbing habit were listed. Most species have ornithophilic pollination syndrome, with specialization for hummingbirds. In this way, the species found in this environment can be easily used for different subjects of Botany, highlighting the themes of morphology and plant-animal interactions. In this context, the use of non-formal environments provides students with a different experience from the formal classroom environment, where generally little information is retained by decreasing attention, in contrast to the stimuli provided in different environments. Plants sensorial appeal in the field, especially the visual aspect, attracts students and enables an invaluable didactic resource.

**KEYWORDS:** Didactic resource, non-formal education, science teaching.

## 1 | INTRODUÇÃO

O espaço não formal de ensino permite o compartilhamento de experiências, principalmente de situações interativas construídas coletivamente. A educação nesse ambiente não se organiza em níveis de escolaridade, idade ou conteúdo, como nos espaços formais; “a participação dos indivíduos é optativa ou pode ser motivada por circunstâncias históricas de vivências pessoais” (GOHN, 2006). Nesse ambiente busca-se desenvolver a construção de aprendizagem e seu objetivo é ampliar os conhecimentos sobre o mundo (QUEIROZ et al., 2017).

Áreas de visitação pública ajardinadas como as de museus são importantes espaços urbanos que permitem uma interação com a flora e promovem o bem-estar. Atuam, juntamente com os museus e zoológicos, como importantes áreas para atividades de ensino, enquanto espaços não formais institucionalizados (QUEIROZ et al., 2017).

O Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML), Santa Teresa/ES, além da sua importância histórica, conta com uma relevante área de visitação onde os aspectos de lazer e informação biológica se integram. A fauna e a flora, intrinsecamente vinculada aos beija-flores, são um atrativo peculiar desta instituição (INMA, s/d).

Dentre as diversas famílias botânicas que possuem forte apelo ornamental e servem de atrativo a membros de Trochilidae (beija flores), podem-se destacar as Acanthaceae (MENDONÇA; ANJOS, 2005). Muitos membros da família têm uso ornamental, pela presença de folhagens variegadas ou coloridas, além disso, podem apresentar flores e brácteas vistosas, as quais atraem abelhas, vespas, mariposas, borboletas e aves à procura de néctar, dessa forma, é fonte de recurso alimentar para essa diversidade de animais (BRAZ et al., 2000; LORENZI; SOUZA, 2008). A família Acanthaceae abrange cerca de 3500 espécies

compreendidas em aproximadamente 200 gêneros distribuídas predominantemente nos trópicos (SOUZA; LORENZI, 2008), no Brasil ocorrem 48 gêneros com 484 espécies (PROFICE et al., 2020).

Nesse contexto o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial do emprego de espécies de Acanthaceae ocorrentes na área de visitação Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML), em espaço não formal de ensino com ênfase para a Botânica.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na área de jardim do Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML), situado no município de Santa Teresa/ ES, por 18 meses. O material foi obtido através de coletas e analisado no laboratório de Botânica, da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus/ES e por registros fotográficos no local. Foram mapeados os locais de ocorrência, e os espécimes identificados por bibliografia especializada.

A caracterização morfológica foi feita embasada em literatura avaliando a morfologia geral de cada espécie (VIDAL, VIDAL, 2003).

Após foi realizada busca sobre a interação com polinizadores em literatura especializada (LORENZI; SOUZA, 2008).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho identificou onze espécies da família nos jardins do INMA/MBML (Figura 1 e Tabela 1).

Espécie	Nome vulgar	Porte	Origem
<i>Aphelandra sinclairiana</i> Nees	Afelandra-coral	Arbusto semi herbáceo	América Central
<i>Aphelandra tetragona</i> (Vahl) Nees	Camarão-coral, espiga-coral	Arbusto	Antilhas e América Tropical
<i>Chamaeranthemum venosum</i> M. B. Forster & Lor. B. Sm.	Prateadinha, carijó	Herbácea ascendente	Brasil
<i>Justicia brandegeana</i> Wassh. & L. B. Sm.	Camarão, camarão-vermelho	Herbácea ereta	México
<i>Justicia carnea</i> Lindl.	Jacobínia	Arbusto ereto, ramificado	Brasil
<i>Megaskepasma erythrochlamys</i> Lindau	Justícia-vermelha, capota-vermelha	Arbusto grande, semi-lenhoso	Venezuela
<i>Pachystachys spicata</i> (Ruiz & Pav.) Wassh.	Camarão-vermelho	Arbusto herbáceo ereto	Brasil
<i>Ruellia brevifolia</i> (Pohl) C. Ezcurra	Pingo-de-sangue	Herbácea perene	Brasil
<i>Sanchezia nobilis</i> Hook.	Sanquésia	Arbusto semi lenhoso	Equador

<i>Thunbergia alata</i> Bojer ex Sims	Olho-preto ou Suzana-dos-olhos-negros	Trepadeira volúvel	África do Sul
<i>Thunbergia mysorensis</i> (Wight) T. Anderson ex Bedd.	Sapatinho-de-judia	Trepadeira semi lenhosa	Índia

Tabela 1 – Espécies de Acanthaceae encontradas nos jardins do Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML).

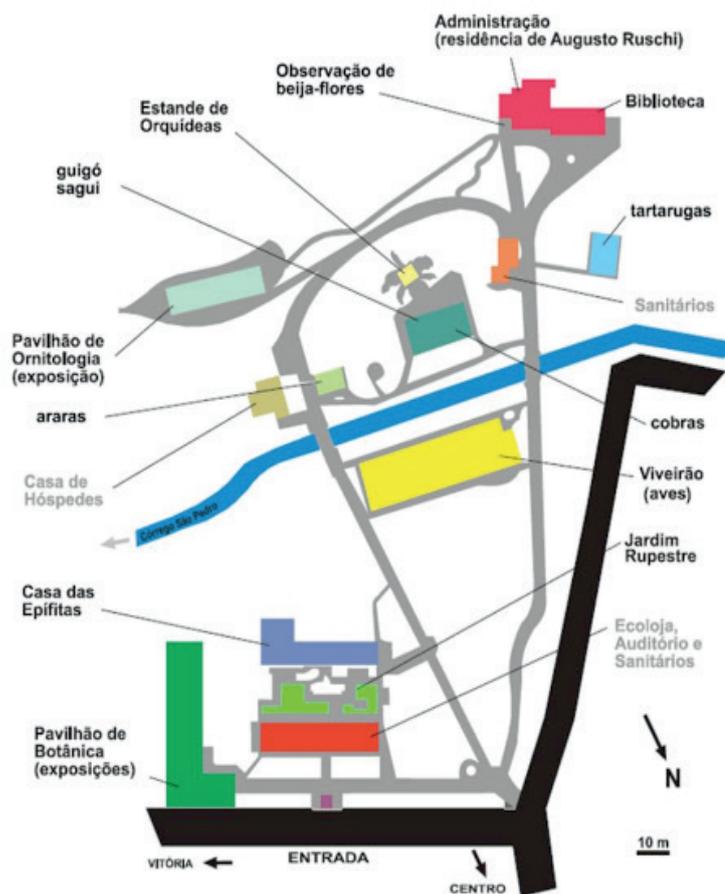


Figura 1 – Mapa da área de visitação do Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Melo Leitão (INMA/ MBML).

Fonte: <http://www.melloleitao.locaweb.com.br/museuVisitaVirtual.asp>

São apresentadas as imagens e descrições das plantas estudadas.

- *Aphelandra sinclairiana* (Figura 2) – planta arbustiva, com 2 a 2,5 metros de altura. Folhas glabras e inflorescências com brácteas laranja e flores rosas.



Figura 2 - *Aphelandra sinclairiana* Nees

- *Aphelandra tetragona* (Figura 3) – planta arbustiva, com até 3 metros de altura. Folhas glabras e inflorescências com brácteas pequenas e flores alaranjadas a vermelho.



Figura 3 - *Aphelandra tetragona* (Vahl) Nees

- *Chamaeranthemum venosum* (Figura 4) – planta herbácea rasteira, com altura entre 15 e 20 cm. Folhas variegadas, verdes com as regiões das nervuras principal e secundárias brancas. Inflorescências pequenas, entre 10 a 15 cm, brácteas pequenas e não apresentam formas ou cores atrativas. Flores brancas com bordas lilases.



Figura 4 - *Chamaeranthemum venosum* M. B. Forster & Lor. B. Sm.

- *Justicia brandegeana* (Figura 5) – planta herbácea ereta, com até 80 cm de altura, com folhas glabras e verdes. Inflorescências em espigas brácteas avermelhadas, amareladas a esverdeadas com flores brancas.



Figura 5 - *Justicia brandegeana* Washh. & L. B. Sm.

- *Justicia carnea* (Figura 6) – planta arbustiva com 1 a 1,5 metros de altura, folhas lanceoladas e glabras. Inflorescências terminais, grandes com brácteas verdes e

flores rosas.



Figura 6 - *Justicia carnea* Lindl.

- *Megaskepasma erythrochlamys* (Figura 7) – planta arbustiva, com 2 a 3 metros de altura, ramificada, com folhas elípticas glabras. Inflorescências apresentam brácteas vermelhas e flores brancas.



Figura 7 - *Megaskepasma erythrochlamys* Lindau

- *Pachystachys spicata* (Figura 8) – planta arbustiva, com poucos ramos, até 2 metros de altura, folhas verdes glabras e grandes. As inflorescências terminais com brácteas verdes e flores vermelho-alaranjadas.



Figura 8 - *Pachystachys spicata* (Ruiz & Pav.) Wassh.

- *Ruellia brevifolia* (Figura 9) – planta herbácea, com até 50 cm de altura, folhas verdes pequenas, glabras e delicadas. Inflorescências apresentam poucas flores, as brácteas são muito pequenas e verdes, as flores são vermelhas.



Figura 9 – *Ruellia brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra

- *Sanchezia nobilis* (Figura 10) – planta arbustiva, com até 2 metros de altura, formam densos aglomerados. As folhas são variegadas com as nervuras em tons de amarelo. As inflorescências tem brácteas de laranja a vermelho e as flores são amarelas.



Figura 10 - *Sanchezia nobilis* Hook

- *Thunbergia alata* (Figura 11) – planta trepadeira, volúvel, não apresenta gavinhas, com caule é verde e flexível. As folhas são verdes com limbo de forma variada, sendo a maioria de base deltoide e recorrente. As flores são isoladas com brácteas verdes e corola amarela com a parte interna marrom ou preta.



Figura 11 - *Thunbergia alata* Bojer ex Sims

- *Thunbergia mysorensis* (Figura 12) – planta trepadeira, de base lenhosa, com folhas verdes elípticas e glabras. As inflorescências são pendentes com brácteas avermelhadas e flores amarelas.



Figura 12 - *Thunbergia mysorensis* (Wight) T. Anderson ex Bedd.

Quanto às características morfológicas, se destacam *S. nobilis* e *C. venosum* por apresentarem folhas variegadas; duas espécies de *Thunbergia* sp. pelo hábito trepador; *J. brandegeana*, *A. sinclairiana* e *M. erythrochlamys* pelo formato e coloração das brácteas; *R. brevifolia*, *J. carnea*, *P. spicata* e *A. tetragona* pelo formato e coloração das corolas.

Na análise morfológica das espécies foi observada que as inflorescências são racemosas, sendo a maioria do tipo espiga, com exceção de *R. brevifolia* e *T. alata*. As brácteas são vistosas, exceto em *C. venosum*. Quanto à coloração a maioria é muito chamativa, exceto *C. venosum* e apresenta a corola gamopétala em forma tubular, sendo *T. alata* diversa pela por não ser bilabiada.

Os aspectos ornamentais citados também podem ser abordados por seus aspectos de interação com a fauna (BRAZ et al., 2000, SIGRIST; SAZIMA 2002, WASSHAUSEN et al., 2004, LIMA et al., 2005, JUDD et al., 2009), dessa forma, é fonte de recurso alimentar para essa diversidade de animais.

A partir das observações e análises das características morfológicas, principalmente das inflorescências, comparando com os dados da literatura (FRISCH; FRISCH, 1995; SOUZA; LORENZI, 2008) é possível apresentar relação com polinizadores (Tabela 2).

Espécie	Características morfológicas		Período de floração	Possíveis polinizadores
	inflorescência	flor		
<b><i>Aphelandra sinclairiana</i> Nees</b>	Densas com brácteas de cor coral alaranjada	Flores róseas	Final de inverno até a primavera e início do verão	Beija-flores
<b><i>Aphelandra tetragona</i> (Vahl) Nees</b>	Densas terminais e ramificadas	Flores tubulosas vermelhas	Durante o verão	Beija-flores
<b><i>Chamaeranthemum venosum</i> M. B. Forster &amp; Lor. B. Sm.</b>	Inflorescência eretas	Flores pequenas e sem interesse ornamental	Primavera e verão	Borboletas
<b><i>Justicia brandegeana</i> Wassh. &amp; L. B. Sm.</b>	Inflorescência longa, com brácteas avermelhadas	Flores pequenas brancas	Formadas quase o ano todo	Beija-flores
<b><i>Justicia carnea</i> Lindl.</b>	Inflorescências densas, grandes e terminais	Flores rosas	Primavera e verão	Beija-flores
<b><i>Megaskepsma erythrochlamys</i> Lindau</b>	Inflorescências grandes, duráveis, firmes, vistosas, terminais, compostas de numerosas brácteas avermelhadas	Flores brancas	Primavera e verão	Beija-flores
<b><i>Pachystachys spicata</i> (Ruiz &amp; Pav.) Wassh.</b>	Inflorescências pubescentes, densas, com numerosas flores	Flores tubulosas vermelhas	Principalmente no verão	Beija-flores
<b><i>Ruellia brevifolia</i> (Pohl) C. Ezcurra</b>	Inflorescências terminais curtas, ramificadas	Flores vermelhas	Quase o ano todo	Borboletas
<b><i>Sanchezia nobilis</i> Hook.</b>	Terminais e longas	Brácteas vermelhas e flores amarelas	Quase todo o ano	Beija-flores
<b><i>Thunbergia alata</i> Bojer ex Sims</b>	Flores isoladas	Cor amarelo alaranjada com centro escuro	Primavera e verão	Borboletas
<b><i>Thunbergia mysorensis</i> (Wight) T. Anderson ex Bedd.</b>	Inflorescências longas, pendentes com numerosas flores	Flores amarelas	Primavera e verão	Beija-flores

Tabela 2 – Características florais das espécies de Acanthaceae encontradas nos jardins do Instituto Nacional da Mata Atlântica/ Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML).

Como observado na Tabela 2, os principais possíveis polinizadores das espécies de Acanthaceae analisadas são os beija-flores. Outros trabalhos com espécies de Acanthaceae também relacionaram as informações sobre morfologia com os polinizadores, além de analisarem a produção de néctar, dentre eles se destacam os de Sigrist e Sazima (2002) com *Ruellia brevifolia*, Mendonça e Anjos (2005) com *Sanchezia nobilis*, Doll et al. (2007) com *Justicia rusbyi* e Schmidt-Lebuhn et al. (2007) sobre composição do néctar em várias espécies de Acanthaceae.

A maioria das espécies apresenta síndrome de polinização de ornitofilia, com especialização para beija-flores. Dessa forma, as espécies encontradas neste ambiente podem ser facilmente utilizadas para diferentes assuntos da Botânica, independente dos níveis de ensino, enfocando nos temas morfologia, taxonomia e interações planta-animal.

A área ajardinada do Instituto Nacional da Mata Atlântica/Museu de Biologia Professor Mello Leitão (INMA/MBML) constitui espaço rico e propício para atividades de ensino quando empregada com ambiente não formal. A estrutura da instituição e as dimensões da área

possibilitam a execução de trabalhos de campo atrativos e dinâmicos.

Embora não seja normativamente um jardim botânico, o espaço apresentado no estudo traz semelhanças estruturais no que diz respeito ao seu uso e potenciais aplicações como espaço não formal de ensino. Ao se referir a aqueles espaços, Queiroz et al. (2017) apontam a existência de “dos materiais informativos como placas banners e também com monitores da própria instituição dotados de grande informação técnica sobre o local visitado” como um ponto importante e enfatizam a possibilidade de abordar diversas temáticas em todos os níveis e modalidades.

O apelo visual das espécies de Acanthaceae, devido às suas estruturas florais e vegetativas, colabora com a captura do olhar e conseqüente atenção dos alunos em campo. Esse passo é importante para então poder instrumentalizar as abordagens morfológicas incluindo discussões que perpassam desde aspectos mais gerais como os diversos hábitos, até podendo dar elementos de ampliação dos entendimentos de relações ecológicas ao abordar as síndromes de polinização.

Desse modo, tanto a área de estudo quanto o grupo de plantas analisados mostram-se como possibilidade de atividades de ensino-aprendizagem.

## 4 | CONCLUSÃO

Nesse contexto, a utilização de espaços não formais propicia aos estudantes vivência distinta do ambiente formal da sala de aula, onde geralmente pouca informação é retida pelo decréscimo da atenção, em contra partida aos estímulos propiciados em ambientes distintos. O apelo sensorial de plantas em campo, especialmente o aspecto visual, atrai os estudantes e possibilita um recurso didático inestimável.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Ao então diretor do Museu Biológico Mello Leitão senhor Hélio de Queiroz Boudet Fernandes pelo inestimável apoio e incentivo ao trabalho.

## REFERÊNCIAS

BRAZ, D. M.; VIEIRA, M. F.; CARVALHO-OKANO, R. M. Aspectos reprodutivos de espécies de Acanthaceae Juss. de um fragmento florestal do município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 47, n. 2, p. 229-239, 2000.

DOLL, S.; HENSEN, I.; SCHMIDT-LEBUHN, A.; KESSLER, M. Pollination ecology of *Justicia rusbyi* (Acanthaceae), a common understory plant in a tropical mountain forest in eastern Bolivia. **Plant Species Biology**, v. 22, p. 211-216, 2007.

FRISCH, J.D.; FRISCH, C.A.D. **Jardim dos Beija Flores**. São Paulo: Dalgas-Ecoltec Ecologia Técnica, 1995. 272 p.

GOHN, M. G. Educação não-formal, participação da sociedade civil e estruturas colegiadas nas escolas. **Ensaio: Avaliação e Políticas Públicas em Educação**, v.14, n.50, p. 27-38, 2006.

INMA. **Parque do Museu de Biologia Professor Mello Leitão**. Disponível em: <http://inma.gov.br/parque-do-museu/> (03/05/2020).

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P.; DONOGHUE, M. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

LIMA, N. A. S.; VIEIRA, M. F.; CARVALHO-OKANO, R. M.; AZEVEDO, A. A. Cleistogamia em *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern e *R. brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra (Acanthaceae) em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 443-449, 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 1 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1995. 720 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1999. 1088 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 1088 p.

MENDONÇA, L. B.; ANJOS, L. Beija-flores (Aves, Trochilidae) e seus recursos florais em uma área urbana do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 51-59, 2005.

PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. 2020. Acanthaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000033> (02/05/2020).

QUEIROZ, R.; TEIXEIRA, H.; VELOSO, A.; TERÁN, A.; QUEIROZ, A. G. A caracterização dos espaços não formais de educação científica para o ensino de ciências. **Revista Areté - Revista Amazônica de Ensino de Ciências**, v. 4, n. 7, p. 12-23, 2017.

SCHMIDT-LEBUHN, A. N.; SCHWERDTFEGER, M.; KESSLER, M.; LOHAUS, G. Phylogenetic constraints vs. Ecology in the nectar composition of Acanthaceae. **Flora**, v. 202, p. 62-69, 2007.

SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. *Ruellia brevifolia* (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): fenologia da floração, biologia da polinização e reprodução. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 1, p. 35-42, 2002.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 736 p.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica: organografia, quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2003. 124 p.

WASSHAUSEN, D. Acanthaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. N.; HEALD, S. V. **Flowering plants of the Neotropics**. Princenton: Princenton University Press, 2004. 594 p.

## FORMAÇÃO DE BANCO DE SEMENTES (GERMOPLASMA) COM PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO NORTE DO PIAUÍ

*Data de submissão: 27/05/2020*

*Data de aceite: 18/06/2020*

### **Iara Fontenele de Pinho**

Universidade Federal do Delta do Parnaíba  
(UFDPAr)/Campus Ministro Reis Velloso  
Parnaíba - Piauí

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2009014896707122>

### **Maria da Conceição Sampaio Alves Teixeira**

Universidade Estadual do Piauí/Campus Prof.  
Alexandre Alves de Oliveira  
Parnaíba - Piauí

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2526966823331714>

### **Jesus Rodrigues Lemos**

Universidade Federal do Delta do Parnaíba  
(UFDPAr)/Campus Ministro Reis Velloso  
Parnaíba - Piauí

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0603749727482775>

Este trabalho foi resultante do Projeto “Formação de banco de sementes (germoplasma) com plantas nativas da região norte do Piauí”, desenvolvido no âmbito do Edital no 007/2018-CPESI/PROPESQI/UFPI, por meio do Programa PIBIC/CNPq/UFPI, pelo discente Iara Fontenele de Pinho e orientação do Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos

**RESUMO:** A grande elevação do desgaste de recursos genéticos tem aumentado o interesse

em conservação e, com isso, surgiram os Bancos de Germoplasma. Estes apresentam, como principal objetivo, o resgate de espécies vegetais que se extinguíram ou que tenham importantes características biológicas a serem preservadas ou, ainda, que estejam em risco de extinção. Este trabalho tem como finalidade inventariar espécies vegetais nativas, em seu estágio fértil, de uma área de vegetação subcaducifolia no norte do Piauí, para que se alcancem frutos e sementes, sendo estes últimos utilizados para se formar um banco de sementes destas espécies. Foram realizadas, mensalmente, caminhadas aleatórias ao longo de toda a extensão da área trabalhada (Sítio da Gurita-Bom Princípio, norte do Piauí) para a coleta de sementes (em média 800 por espécie) em seu estado de maturação fisiológica. Em laboratório, as sementes foram beneficiadas e acondicionadas em recipientes de vidros, com tampas presas neste por garras e vedados com um filme de parafina plástica, e armazenados na câmara fria da Universidade Federal do Delta do Parnaíba. Até o presente momento foram coletadas sementes de 17 espécies distribuídas em seis famílias botânicas. Com as espécies coletadas até o momento foi possível inicializar, efetivamente, um banco de germoplasma na citada Universidade, ainda inexistente para plantas da região, salvaguardando diásporos de espécies vegetais nativas. Este banco pode

tornar-se um subsídio para a comunidade escolar, como material didático, além da função social/ambiental no que concerne à possibilidade de recolonização de áreas degradadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Banco de sementes, diásporos, vegetação xerófitas.

## SEED BANK FORMATION (GERMPLASM) WITH NATIVE PLANTS IN THE NORTH REGION OF PIAUÍ STATE

**ABSTRACT:** The great increase in the wear and tear of genetic resources has increased the interest in conservation and, with that, the Germplasm Banks appeared. These have, as main objective, the rescue of plant species that have become extinct or that have important biological characteristics to be preserved or, still, that are at risk of extinction. This work aims to inventory native plant species, in their fertile stage, from an area of subcaducifolia vegetation in the north of PiauÍ state, so that fruits and seeds can be reached, the latter being used to form a seed bank of these species. Random walks were carried out monthly along the entire extension of the worked area (Sítio da Gurita-Bom PrincÍpio, northern PiauÍ state) to collect seeds (on average 800 per species) in their state of physiological maturation. In the laboratory, the seeds were processed and placed in glass containers, with lids attached by claws and sealed with a plastic paraffin film, and stored in the cold chamber of the Federal University of Delta do ParnaÍba. To date, seeds of 17 species have been collected, distributed in six botanical families. With the species collected so far, it was possible to effectively start a germplasm bank at the aforementioned University, which does not yet exist for plants in the region, safeguarding diaspores of native plant species. This bank can become a subsidy for the school community, as didactic material, in addition to the social / environmental function with regard to the possibility of recolonizing degraded areas.

**KEYWORDS:** Seed bank, diaspores, xerophytic vegetation.

## 1 | INTRODUÇÃO

A importância das sementes para a vida humana decorre, antes de tudo, do fato de que a evolução do gênero *Homo* se processou numa época geológica em que quase todos os tipos de vegetação terrestre do planeta já haviam sido dominados por plantas fanerógamas (LABOURIAU, 1990). Mesmo antes da agricultura, já se encontram evidências arqueológicas do consumo de sementes como alimento (VEIGA et al., 2012).

A grande elevação das taxas de desgaste de recursos genéticos e a perda de componentes da biodiversidade em decorrência do seu uso desorganizado e do crescimento acelerado da população tem aumentado o interesse pela conservação de germoplasma e a implantação destas coleções já é uma realidade em vários países (PANIS; LOMBARDI, 2006).

Os bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso prolongado, onde não ocorre o descarte de acessos, o que os diferencia das coleções de trabalho, que são aquelas em que se elimina o que não

interessa ao melhoramento genético (VEIGA, 2008).

Os recursos genéticos vegetais, por seu turno, são definidos como a fração da biodiversidade com possibilidade de uso atual ou futuro. Assim, compreendem as variedades tradicionais, variedades melhoradas, linhas avançadas e espécies nativas (QUEIROZ, 1999). Estes recursos são estudados em várias etapas bem definidas, tais como coleta ou multiplicação, beneficiamento, conservação, caracterização/avaliação e uso (HAWKES, 1982). Tais atividades se desenvolvem em sua maioria em Bancos Ativos de Germoplasmas-BAGs. Um dos aspectos de maior importância dos BAGs é que estes podem assegurar a diversidade dos recursos genéticos das espécies nativas ou tradicionais, focalizando principalmente as espécies raras e/ou endêmicas preservando-as do risco de extinção.

Holl e Kappelle (1999) ressaltam que o conhecimento da biologia de espécies nativas é fundamental para os programas de conservação *in situ* e *ex situ* e implantação de modelos de recomposição vegetal.

Entre outros métodos empregados para a conservação, destacam-se aquelas denominadas *in situ* e *ex situ*. Segundo Floh et al. (2017) conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas e a conservação *ex situ* é aquela onde as espécies vegetais são mantidas fora do seu ambiente natural, seja por meio de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes, ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro*.

Os métodos de cultivo *in vitro*, aplicando-se o crescimento lento, vêm sendo vistos como alternativa para os bancos de sementes, pois visam à conservação de germoplasma vegetal. Para Carvalho et al. (2008) a conservação do germoplasma através da preservação *in vitro*, é especialmente útil para espécies com sementes recalcitrantes, como a maior parte das espécies perenes tropicais, que perdem a sua viabilidade em curto período de tempo nos sistemas convencionais de conservação.

Autores como Aguiar et al. (1993) e Floriano (2004) reforçam que o armazenamento de sementes é constituído por um conjunto de procedimentos voltados à preservação da qualidade do produto mantendo as características físicas, fisiológicas e sanitárias, proporcionando a formação de mudas saudáveis para plantios comerciais e manutenção de recursos genéticos em bancos de genes de florestas nativas.

Diante de todas estas questões, este trabalho tem como finalidade inventariar espécies vegetais nativas de uma área de vegetação subcaducifólia no norte do Piauí, em seu estágio fértil, para que se alcancem também elementos reprodutivos tais como frutos e sementes, sendo estes últimos com o propósito principal de formar um banco de sementes destas espécies.

## 2 | BREVE EMBASAMENTO LITERÁRIO

### 2.1 Caracterização e papel ecológico de uma Semente

A semente é o principal órgão reprodutivo da grande maioria das plantas superiores (NIEMBRO, 1988), estas desempenham uma função fundamental na renovação, persistência e dispersão das populações de plantas, na regeneração das florestas e na sucessão ecológica (FLORES, 2010).

Do ponto de vista ecológico, as sementes representam um meio de sobrevivência das espécies vegetais, visto que algumas podem resistir a condições adversas que poderiam ser fatais às plantas que lhes deram origem (MOJENA; GUERRA, 2018). Constituem uma das mais importantes adaptações das gimnospermas e das angiospermas para a vida terrestre. Elas são o principal veículo de reprodução das plantas por meio do tempo e no espaço, perpetuando as características advindas da evolução. Além disso, as sementes podem armazenar reservas nutritivas, que garantem o desenvolvimento do embrião, até que se torne uma nova planta (OLIVEIRA, 2016).

A conservação da biodiversidade em geral pode ser realizada envolvendo os métodos *in situ* e *ex situ*. O primeiro método consiste na permanência destas espécies em seu habitat natural. Já para o método de conservação *ex situ*, as espécies são mantidas fora de seu habitat (BRASIL, 2000), por exemplo, pelo armazenamento em bancos de germoplasma (PERES, 2016).

### 2.2 Banco de germoplasma no Brasil

Os bancos de germoplasma apresentam, como principal objetivo, o resgate de espécies vegetais que se extinguíram, ou que tenham importantes características biológicas a serem preservadas (HIEMSTRA et al., 2000), ou ainda espécies localmente adaptadas ou em risco de extinção (RAMOS et al., 2011).

Segundo Veiga et al. (2012), no Brasil, as ações de conservação de recursos genéticos deram-se por ação de estrangeiros como Maurício de Nassau, no século 17, com a criação de um Jardim Zoobotânico no Recife, Pernambuco. Outro acontecimento importante em relação aos bancos de germoplasma se deu em 1970, com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen), conhecido hoje como Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Com a conscientização da importância dos recursos genéticos, faz-se imprescindível a adoção de medidas e procedimentos no intuito de salvaguardá-los (WETZEL; BUSTAMANTE, 2000). Desta maneira, a formação e constituição de bancos de germoplasma devem ser reguladas, conforme legislações específicas em cada país. Atualmente, o acesso e a conservação dos recursos genéticos da biodiversidade brasileira podem ser definidos de acordo com a legislação vigente no Ministério do Meio Ambiente-MMA.

No Brasil, existem bancos de germoplasma coordenados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por meio de um sistema conhecido como Plataforma Nacional

de Recursos Genéticos e distribuídos em várias instituições, como universidades federais e estaduais, institutos estaduais de pesquisa e desenvolvimento e empresas estaduais (FERREIRA et al., 2005), como por exemplo a Sociedade Brasileira de Ciência do Solo-SBCS, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo-ESALq/USP, Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina-EPAGRI, entre outros.

Hoje a Embrapa é vista como a principal guardadora de recursos genéticos *ex situ* do país, bem como uma das principais do mundo (VEIGA et al., 2012). Estima-se a existência de aproximadamente 200 mil acessos de germoplasma vegetal, conservados no médio e longo prazo, distribuídos em cerca de 250 BAGs (KNUDSEN, 2000).

### **3 | MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de coleta das sementes**

A área objeto deste estudo refere-se ao “Sítio da Gurita”, propriedade particular localizada a 6 km do centro da cidade de Bom Princípio (03°11’27” S e 41°38’39” O), a qual possui uma área de 521,572 km<sup>2</sup> e está localizada a 260 km da capital do Estado, a uma altitude de 70 metros (Figura 1). Sua população estimada em 2015 é de 5.497 habitantes (IBGE, 2010). A área possui a flora ainda relativamente preservada, quando comparada com o entorno geral. Apresenta potencial turístico por possuir, no seu interior, rochas e pequenas cavernas com pinturas rupestres, fontes de água para banhistas e uma diversidade florística representativa da vegetação de caatinga.

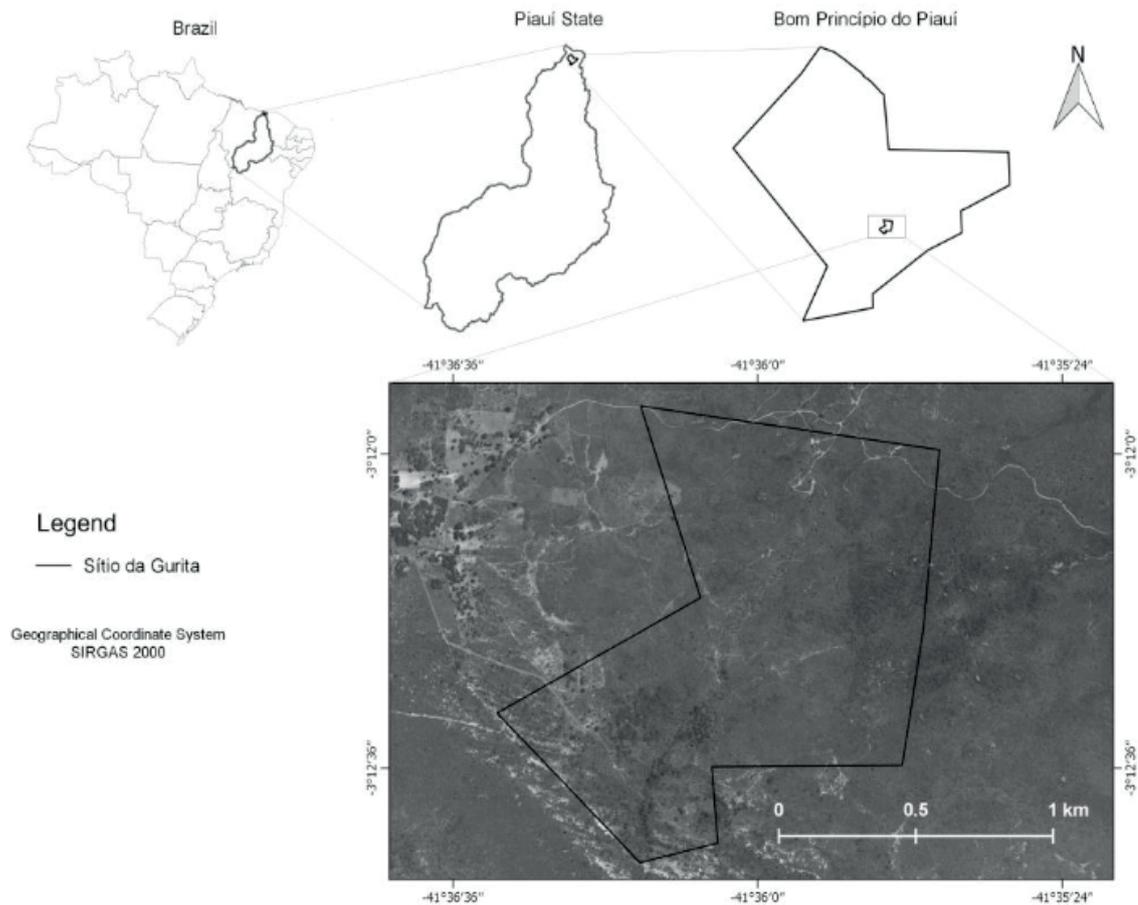


Figura 1: Localização da área de coleta de semente, Sítio da Gurita, Bom Princípio, Piauí. Fonte: Araújo et al. (2018).

### 3.2 Metodologia de coleta das sementes

Como a época da coleta varia em função da espécie, do ano e de indivíduo para indivíduo, há a necessidade de acompanhar o estágio de maturação para estabelecer o momento da coleta das sementes, especialmente para os frutos deiscentes, com sementes pequenas, pois é necessário coletar antes que ocorra a abertura dos mesmos e, conseqüentemente, a dispersão das sementes. Desta maneira, foram realizadas, mensalmente, caminhadas aleatórias ao longo de toda a extensão da área de estudo.

A coleta foi realizada quando as sementes atingiram a maturação fisiológica, visto que nessa época, segundo Way e Gold (2014), elas apresentam maior porcentagem de germinação, maior vigor e maior potencial de armazenamento. Utilizou-se podões para as árvores mais altas, chacoalhamento leve de galhos, escaladas pelas árvores e a coleta manual para recolher as sementes de plantas em que se podia alcançar. Para algumas espécies foi necessário coletar frutos frescos, pois as sementes são muito pequenas, e seu modo de dispersão é por meio de zoocoria, o que dificulta a coleta apenas da semente.

Para um melhor controle dentro do banco de sementes, foi adotado um número padrão mínimo de coleta de sementes, 800 de cada espécie, baseado em Way e Gold (2014), pois futuramente caso seja preciso verificar a viabilidade das sementes, ou realizar testes, em algum estudo proposto pela comunidade acadêmica, este é, portanto, um número confiável.

Após a coleta, as sementes que estavam presas nos frutos foram transportadas o mais breve possível até o local de beneficiamento - Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Delta do Parnaíba - *Campus* Ministro Reis Velloso (UFDPAr-CMRV) - pois a permanência desses no campo por maior tempo pode danificar as sementes, visto que ficam sujeitas às variações ambientais.

No Laboratório, todas as sementes foram separadas e preparadas para o beneficiamento. Este foi realizado manualmente com auxílio de peneiras, bandejas grandes, martelo, pinças, escova de cerdas, luvas, com o intuito de retirar os materiais indesejáveis (como restos de frutos, galhos, sementes chochas e de outras espécies, etc.), que devem ser removidos a fim de facilitar a secagem, o armazenamento (diminuindo o volume, reduzindo o risco de doenças e facilitar o uso futuro) e a semeadura. Esse beneficiamento aumenta a qualidade do lote de sementes, e, conseqüentemente, sua longevidade (TERRY; SUTCLIFFE, 2014).

Em seguida, as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidros com tampas presas neste por garras e vedados com um filme de parafina plástica, pois se estes não forem bem selados, as sementes gradativamente absorverão água e sua longevidade será afetada (GOLD; MANGER, 2014), depois etiquetados e posteriormente armazenadas na câmara fria da UFDPAr/Campus Ministro Reis Velloso.

### 3.3 Análise e processamento dos dados botânicos

Todo o material botânico foi identificado à medida que as coletas em campo foram sendo realizadas. Esta identificação inicial foi baseada em consulta à bibliografia especializada e através de comparação com material tombado nos herbários virtuais de instituições de ensino e pesquisa, tais como Flora do Brasil, *Specieslink*, entre outros.

As sinonímias foram atualizadas e os nomes dos autores verificados por meio de pesquisas ao Herbário virtual Flora do Brasil (2020) e o sistema de classificação adotado foi o *Angiosperm Phylogeny Group IV* (APG, 2016).

Ademais, ao mesmo tempo em que ocorria as pesquisas de identificação das espécies, foi verificada a distribuição geográfica destas, através de consultas à literatura especializada, bem como em acervos de Herbários virtuais, inclusive no banco de dados do Flora do Brasil, que também contribuiu para a pesquisa e confirmação sobre o tipo de vegetação nas quais estas espécies são registradas. Além disso, verificou-se também a naturalidade destas no país. Da mesma forma, utilizando a bibliografia especializada, analisou-se a utilidade das espécies coletadas em diferentes categorias de uso, o que torna o banco de sementes mais relevante, visto que guardará espécies localmente significativas do ponto de vista etnobotânico.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo dados de Araújo et al. (2018), a diversidade da flora do Sítio da Gurita, Bom Princípio, é representada principalmente por espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas, distribuídas em 52 famílias, sendo Fabaceae, Rubiaceae, Malvaceae e Poaceae as que apresentaram maior riqueza de gêneros.

Até o presente momento, para este propósito, foram coletadas sementes de 17 espécies, distribuídas em sete famílias (Tabela 1).

Mesmo com todo o beneficiamento adequado das sementes e esterilização dos recipientes, algumas sementes da família Fabaceae, frequentemente são atacadas por insetos, assim, pressupõe-se que isto ocorra em detrimento de uma mudança na semente, pois segundo Schmidt (1978) as sementes de diversas espécies têm alto nível de tolerância no lugar onde se desenvolvem, o que torna o seu manejo menos problemático, no entanto, outras são altamente evoluídas a um habitat particular, sendo compassivas a qualquer tipo de estresse. Atrelado a isso, algumas espécies de *Coleoptera* e *Lepidoptera*, se alimentam de sementes por serem altamente nutritivas (JANZEN, 1971). A ação dos insetos predadores na fase pré-dispersão pode ter grande impacto em suas plantas hospedeiras e assim diminuir a germinação e sobrevivência das plântulas jovens (KOLB et al., 2007; TOMAZ et al., 2007) e pode comprometer também a inclusão destas ao banco de sementes (ANDERSEN, 1988).

Família/Espécie	Hábito	Nome popular	Número de sementes	Naturalidade no país
<b>ANACARDIACEAE</b>				
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	Arv	Aroeira	361	Não é endêmica
<b>APOCYNACEAE</b>				
<i>Allamanda puberula</i> A.DC.	Arb	Pente-de-macaco	251	É endêmica
<i>Aspidosperma pyriformium</i> Mart. & Zucc.	Arv	Pereiro	212	Não é endêmica
<b>BIGNONIACEAE</b>				
<i>Fridericia subverticillata</i> (Bureau & K.Schum.) L.G.Lohmann	-	Cipó branco	268	É endêmica
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	Arv	Pau d'arco roxo	352	Não é endêmica
<b>BROMELIACEAE</b>				
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Erv	Macambira	872	É endêmica
<b>COMBRETACEAE</b>				
<i>Combretum duarteanum</i> Cambess.	Arb	Mofumbo de xerém	387	Não é endêmica
<i>Combretum leprosum</i> Mart.	Arb	Mofumbo	501	Não é endêmica
<b>EUPHORBIACEAE</b>				
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	Arb	Pinhão bravo	24	Desconhecida

## FABACEAE

<i>Abrus precatorius</i> L.	Lia	Jeriquiti	289	Não é endêmica
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Arv	Angico vermelho	621	Não é endêmica
<i>Dioclea grandiflora</i> Mart. ex Benth.	Lia	Mucunã	22	É endêmica
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Arv	Tamboril, orelha de negro	848	Não é endêmica
<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz	Arv	Jucá, pau-ferro	456	É endêmica
<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.	Arv	Sabiá	371	É endêmica
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Arv	Jurema preta	556	Não é endêmica
<i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke	Arv	Jurema branca	436	É endêmica

Tabela 1: Espécies coletadas até o mês de Fevereiro/2020 no Sítio da Gurita e armazenadas no Banco de Sementes da UFPI-CMRV. Arv= árvore; Arb= arbusto; Lia= liana; Erv= erva.

A diferença na quantidade de sementes colhidas entre as espécies se dá no momento do beneficiamento, quando todas as sementes impróprias são retiradas para não prejudicar a qualidade das demais. Outro fator que implica nessa disparidade relaciona-se com a coleta em campo, pois neste momento algumas espécies, quando recolhidas as sementes, já estavam no final do seu período de dispersão ou não estavam em seu estágio ideal de desenvolvimento, não sendo adequado coletar, pois seu tempo de vida será reduzido.

De acordo com Araújo et al. (2018) algumas espécies apresentam pouca pequena amplitude de distribuição na circunscrição da área estudada, ocorrendo esporadicamente. Assim, com isto, seguiu-se a recomendação de Way e Gold (2014) de não coletar mais de 20% das sementes maduras disponíveis por dia, para não comprometer a sobrevivência da população a longo prazo, sendo assim suficientes para a regeneração natural.

### 4.1 Distribuição geográfica das espécies do Banco de sementes

As espécies presentes no Banco de semente, oriundas da área informada, encontram-se também distribuídas, segundo o Flora do Brasil (2020) em diferentes regiões do país e em diversas outras formações vegetais (Tabela 2).

Espécies	Distribuição geográfica	Vegetação
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	<b>Norte</b> (Pará, Tocantins) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Estacional Semidecidual

<i>Allamanda puberula</i> A.DC.	<b>Norte</b> (Tocantins) <b>Nordeste</b> (Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Campo Rupestre.
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. & Zucc.	<b>Norte</b> (Pará, Tocantins) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Estacional Semidecidual
<i>Fridericia subverticillata</i> (Bureau & K.Schum.) L.G.Lohmann	<b>Nordeste</b> (Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> )
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	<b>Norte</b> (Acre, Pará, Rondônia, Tocantins) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo)	Área Antrópica, Carrasco, Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Estacional Decidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial), Floresta Ombrófila Mista, Savana Amazônica, Vegetação Sobre Afloramentos Rochosos
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	<b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe)	Campo Rupestre, Vegetação Sobre Afloramentos Rochosos
<i>Combretum duarteanum</i> Cambess.	<b>Norte</b> (Pará) <b>Nordeste</b> (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais, São Paulo)	Área Antrópica, Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> )
<i>Combretum leprosum</i> Mart.	<b>Norte</b> (Pará, Tocantins) <b>Nordeste</b> (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte) <b>Centro-Oeste</b> (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Espírito Santo, Minas Gerais)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Carrasco, Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	<b>Norte</b> (Rondônia) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais)	Área Antrópica, Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> )
<i>Abrus precatorius</i> L.	<b>Norte</b> (Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) <b>Sul</b> (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina)	Área Antrópica, Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial), Restinga

<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)	<b>Nordeste</b> (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) <b>Sul</b> (Paraná)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial)
<i>Dioclea grandiflora</i> Mart. ex Benth.	<b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Carrasco
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	<b>Nordeste</b> (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) <b>Sul</b> (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial)
<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz	<b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Sudeste</b> (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Carrasco, Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial)
<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.	<b>Norte</b> (Amazonas, Pará, Rondônia) <b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte) <b>Centro-Oeste</b> (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul) <b>Sudeste</b> (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) <b>Sul</b> (Paraná, Santa Catarina)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> ), Cerrado ( <i>lato sensu</i> ), Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial)
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	<b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) <b>Sudeste</b> (Minas Gerais)	Área Antrópica, Caatinga ( <i>stricto sensu</i> )
<i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke	<b>Nordeste</b> (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe)	Caatinga ( <i>stricto sensu</i> )

Tabela 2: Distribuição geográfica e vegetação predominante de cada espécie, segundo Flora do Brasil, 2020.

Torna-se perceptível, quando se analisa a tabela acima, que todas as espécies são registradas em áreas de vegetação de caatinga, embora, algumas espécies também são encontradas em outros tipos vegetacionais, a exemplo de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, entre outras.

De acordo com os dados da Tabela 2, pode-se observar que apenas quatro das espécies ocorrem somente na região Nordeste, enquanto as demais estão distribuídas no Nordeste, em outras regiões do País e no mundo. Esta informação respalda ainda mais a diversidade florística do Sítio da Gurita, o que implica diretamente na construção do Banco de Sementes, pois assim haverá uma maior variedade de espécies e, conseqüentemente, sementes.

Um banco de sementes não deve ser ressaltado somente pela importância biológica das espécies presentes nele, mas também, verificadas do ponto de vista econômico e da contribuição social que a mesma possa exercer. Neste sentido, levantou-se, na literatura especializada, alguns usos das espécies já catalogadas no banco.

Assim, quanto à utilização, algumas destas espécies possuem uso medicinal, tais como *L. ferrea*, popularmente conhecida como “jucá” ou “pau-ferro”. Esta é indicada popularmente para tratar diversas afecções de saúde. Ensaios farmacológicos com *L. ferrea* vêm sendo realizados e têm demonstrado atividade inibitória contra *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*, assim como o seu potencial anti-inflamatório atribuído à inibição de prostaglandinas e atividades cicatrizantes (CARVALHO et al., 1996; SAMPAIO et al., 2009). Na medicina popular a tintura da vagem desta planta é recomendada para estancar hemorragias e em compressas contra luxações.

*Mimosa tenuiflora* também é utilizada para fins medicinais devido à presença dos metabólitos secundários. Pela alta quantidade de dimetilriptamina-DMT (alcaloide indólico com acentuada ação psicoativa), a casca é utilizada para fins psicoativos (SOUZA et al., 2008). Já o extrato da casca inibe o peristaltismo intestinal e facilita o aumento do tônus muscular da parede do estômago (MECKES-LOZOYA et al., 1990). Gonçalves et al. (2005), observaram uma alta atividade antimicrobiana do extrato hidro-alcoólico da planta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*. Já Lozoya et al. (1989) observaram que substâncias extraídas com etanol (95%) também eram eficientes contra a *Candida albicans*.

Outras são utilizadas nos serviços de carpintaria, como *Anadenanthera colubrina* (Griseb.) Altschul., por exemplo. Sua madeira é empregada em tabuado, tacos, marcenaria, obras internas, ripas, implementos, embalagens, na construção civil e naval. Também é muito utilizada para a produção de carvão vegetal (lignina com cinzas de 28%) (PEREIRA, 2011).

*Aspidosperma pyriforme* Mart. & Zucc, *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e *Combretum leprosum* Mart. são indicados para restauração de áreas degradadas, pois se adaptam a condições severas de seca e solos rasos e pedregosos. Esta última tem um crescimento rápido e não é preferida pelos animais para sua alimentação (ROQUE, 2013).

As plantas são o nosso maior patrimônio ambiental, além de abrigarem pássaros, deixarem o ambiente mais agradável, tem uso diversos em nossa vida, como medicinal, na carpintaria, construções civis, navais, como também em colonização de áreas degradadas, com isso torna-se importante e fundamental preservar espécies vegetais, desembocando, em última instância, em uma melhor qualidade de vida.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com as espécies coletadas até o momento foi possível inicializar, efetivamente, um banco de germoplasma na Universidade Federal do Delta do Parnaíba, salvaguardando diásporas de espécies vegetais nativas presentes na porção norte do estado do Piauí. Assim,

como demonstrado, há uma grande variedade de espécies presentes na área de estudo, o que irá contribuir para uma ampla diversidade do acervo de sementes, gerando, inclusive, subsídios para pesquisas futuras.

Vale salientar que a proposição desta pesquisa não é estática, pelo contrário, este Banco continuará sendo alimentado indefinidamente, de forma que possa vir a ser uma fonte adicional para estudos vegetais, principalmente que envolvam diásporas, relacionados a espécies nativas presentes na flora do norte do Piauí.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, M. B.; FIGLIOLA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993.

ANDERSEN, A. N. Insect seed predators may cause far greater losses than they appear to. **Oikos**, v.52, p.337-340, 1988.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, p.1-20, 2016.

ARAÚJO, L. S.; CERQUEIRA, E. C.; LEMOS, J. R. A Survey of Angiospermic Flora and the Economic Potential of Species in Caatinga-Cerrado Transition Vegetation in the Piauí State, Northeastern Brazil. In: BEATRICE WELCH; MICHEAL WILKERSON. (Org.). **Recent Advances in Plant Research**. 1ed. New York: Nova Science Publishers Inc., 2018, p. 239-259.

BRASIL. **Convenção sobre Diversidade Biológica**: Conferência para Adoção do Texto Acordado da CDB – Ato Final de Nairóbi. Brasília: MMA/SBF. 2000. 60p.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S. F.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti – inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, n.3 p.175-178, 1996.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, M. A. **Preservação e Intercâmbio de Germoplasma**. Campina Grande, PB : Embrapa, 2008.

FERREIRA, M. A. J. F.; WETZEL, M. M. V. S.; VALOIS, A. C. C. O estado da arte dos recursos genéticos vegetais nas Américas. **Agrociência**, v.9, n.1-2, p.85-90, 2005.

FLOH, E. I. S. **Estabelecimento de um banco de germoplasma ex situ de plantas do bioma cerrado**. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p.3-13, 2017.

FLORA DO BRASIL. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 02 fev. 2020.

FLORES, E. M. Biología de las sementes. In: HERSHEY, A. (Org.). **Manual de Sementes de Árboles Tropicales**. Departamento de agricultura de los Estados Unidos Servicio Forestal. p.156, 2010.

FLORIANO, E. P. Armazenamento de sementes florestais. **Caderno didático**. Santa Rosa: ANORGS, 1.ed. n.1-10 2004.

- GOLD, K.; MANGER, K. **Selecionando recipientes para conservação em longo prazo de sementes**. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014. Disponível em: <http://www.recursosgeneticos.org/publicacao/selecionando-recipientes-para-conservacao-em-longo-prazo-de-sementes>. Acesso em: 12 jan. 2020.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3, p.353-358. 2005.
- HAWKES, J. G. Germplasm collection, preservation, and use. In: FREY, K. J., ed. **Plant Breeding II**. Ludhiana: Kaliyana Publishers, p. 57-83, 1982.
- HIEMSTRA, S. J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: SONNINO, A; RUANE, J. (Org.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, p.25-35, 2000.
- HOLL, K. D.; KAPPELLE, M. **Tropical forest recovery and restoration**. Tree, p.378-379, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico**, 2010. Retratos do Brasil e do Piauí, 2011. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/pdf/censo\\_2010\\_piaui.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/pdf/censo_2010_piaui.pdf)/ Acesso: 02 fev. 2020.
- JANZEN, D. H. Predation by animals. Annual Review of Ecology: **Systematics**, v.2, p.465-492, 1971.
- LABOURIAU, L. F. G. O interesse do estudo das sementes. **Estudos avançados**. São Paulo, v.4 n.9, p.228-242, Mai./Ago. 1990
- LOZOYA, X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J. T.; KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigacion Medica**, v.20, n.1, p.87-93, 1989.
- KNUDSEN, H. **Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe**. Roma: IPGRI, 2000. 369 p.
- KOLB, A.; EHRLÉN, J.; ERIKSSON, O. Ecological: evolutionary consequences of spatial; temporal variation in pre-dispersal seed predation. Perspectives in Plant Ecology, Evolution. **Systematics**, v.9, p.79-100, 2007.
- MECKES-LOZOYA M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. L. In vitro pharmacological properties of some extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de Investigacion Medica**, v. 21, n.2, p.163-169, 1990.
- MOJENA, P. A.; GUERRA, A. D. **Experimentos Sobre Superação da Dormência em Sementes Florestais**. 1 ed. Appris, 2018.
- NIEMBRO, R. A. **Semillas de árboles y arbustos, ontogenia y estructura**. México: Limusa, 285p, 1988.
- OLIVEIRA, L. E. M. **Temas em Fisiologia Vegetal**. Setor Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade federal de Lavras, 2016.
- PANIS, B. & LAMBARDI, M. **Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)**. FAO, Rome, Italy. P.61-78, 2006.
- PEREIRA, M. S. **Manual técnico Conhecendo e produzindo sementes e mudas da caatinga**. Fortaleza: **Associação Caatinga**. 60 p, 2011.

PERES, S. Saving the gene pool for the future: Seed banks as archives. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 55, p. 96-104. 2016.

QUEIROZ, M. A. de; RAMOS, S. R. R.; ROMÃO, R. L.; SILVA, M. A. S.; DIAS, R. de C. S.; LIMA, M. F.; ASSIS, J. G. de A.; FERREIRA, M. A. J.; BORGES, R. M. E.; SOUZA, F. de F. Recursos genéticos vegetais: o caso do Banco de Germoplasma de cucurbitáceas (BAG) da Embrapa Semi-Árido. In: **ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE**, 13, 1998, Feira de Santana-BA. Resumos... Feira de Santana: SBG/UEFS, 1999. p.260-261.

RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. **Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.35, n.2, p.104-107, 2011.

ROQUE, A. A.; LOIOLA, M. I. B. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. **Revista Caatinga**, v.26, n.4, p.88-98, 2013.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.289-294, 2009.

SCHMIDT, H. R.; LAUTENSCHLAGER, R. A. **Predadores da mariposa cigana**. Departamento de Agricultura dos EUA, Programa Combinado de Pesquisa e Desenvolvimento de Pragas Florestais, 1978.

SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.5, p.937-947, 2008.

TERRY, J.; SUTCLIFFE, V. **Limpendo sementes para conservação em longo prazo**. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014. Disponível em: <http://www.recursosgeneticos.org/publicacao/limpendo-sementes-para-conservacao-em-longo-prazo>. Acesso em: 12 jan. 2020.

TOMAZ, C. A.; KESTRING, D.; ROSSI, W. N. Effects of the seed predator *Acanthoscelides schrankiae* on viability of its host plant *Mimosa imucronata*. **Biological Research**, v.40, p.281-290, 2007.

VEIGA, R. F. de A.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C.; VALLS, J. F. M. Bancos de Germoplasma: importância e organização. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. (Org.). **Conservação de Recursos Genéticos no Brasil**. Brasília, DF : Embrapa, 2012. cap.03. p.104-124.

VEIGA, R. F. de A. **Bancos de germoplasma**. Biota, 2008. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap04.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2020.

WAY, M.; GOLD, K. **Avaliando uma população para coleta de sementes**. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014. Disponível em: <http://www.recursosgeneticos.org/publicacao/avaliando-uma-populacao-para-coleta-de-sementes>. Acesso em: 22 jan. 2020.

WETZEL, M. M. V. S.; BUSTAMANTE, P. G. **Sistema de Curadoria de Germoplasma**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Série Documentos, v.53, 44p, 2000.

## REGISTRO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE CHRYSOMELIDAE NO SUDOESTE DO PARANÁ, COM ÊNFASE EM ALTICINI (GALERUCINAE)

Data de submissão: 03/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

**Lucas Frarão**

Universidade Federal da Fronteira Sul

Realeza – PR

<http://lattes.cnpq.br/6971251404010930>

**Adelita Maria Linzmeier**

Universidade Federal da Fronteira Sul

Realeza - PR

<http://lattes.cnpq.br/2311018305073299>

**RESUMO:** Os crisomelídeos compõem uma das maiores famílias de besouros, tendo grande importância econômica seja no seu uso como controle biológico de plantas daninhas ou por causarem grandes danos em diversos cultivos mundialmente. Devido a isso, é essencial que sejam estabelecidas relações entre esses insetos às suas plantas hospedeiras. Buscando por essas relações, nessa pesquisa foram realizadas 14 coletas manuais entre novembro de 2018 e junho de 2019, em fragmentos de Floresta com Araucária em sucessão secundária, nos municípios de Realeza e Planalto, no sudoeste do Paraná. Como resultados, foi possível relacionar 33 espécies de crisomelídeos às suas respectivas plantas hospedeiras, sendo que dessas, 12 pertencem à Alticini, 11 Criocerinae, três Chrysomelinae,

três Eumolpinae, dois Galerucinae s. str. e dois Cassidinae.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Chrysomelidae*, Alticini, Planta Hospedeira, Controle Biológico, Relação Inseto-Planta.

### RECORDS OF *CHRYSOMELIDAE* HOST PLANTS IN THE SOUTHWESTERN PARANÁ, WITH EMPHASIS ON ALTICINI (*GALERUCINAE*)

**ABSTRACT:** Chrysomelids are one of the largest families of beetles, having great economic importance whether in their use as biological control of weeds or because they cause great damage in several crops around the world. Because of this, it is essential that relationships are established between these insects and their host plants. Searching for these relationships, in this research, 14 manual samples were made between November 2018 and June 2019, in fragments of Forest with Araucaria in areas of secondary succession, in the municipalities of Realeza and Planalto, in southwest Paraná. As a result, it was possible to relate 33 species of chrysomelids to their respective host plants, of which 12 belong to Alticini, 11 Criocerinae, three Chrysomelinae, three Eumolpinae, two Galerucinae s. str. and two Cassidinae.

**KEYWORDS:** *Chrysomelidae*, Alticini, Host Plant, Biological Control, Insect-Plant

## 1 | INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os crisomelídeos compõem uma das famílias com maior número de espécies, com aproximadamente 36.000 registradas. Dentre elas, 9.900 espécies são validadas para os 557 gêneros da tribo Alticini (KONSTANTINOV, 2016). São popularmente conhecidos como besouros pulga, devido à presença de uma mola metafemoral que os permite saltar rapidamente na presença de ameaças como predadores. Esse mecanismo saltatório é descrito por Ruan, et al. (2020) e devido à ele, os Alticini são facilmente reconhecidos por seus fêmures posteriores visivelmente dilatados (KONSTANTINOV, 2016).

É um grupo fitófago e assim como grande parte dos crisomelídeos, desenvolveram grande especificidade em relação à sua alimentação (TERMONIA et al. 2001). Isso quer dizer que a maioria das espécies são consideradas monófaga ou oligófagas, ou seja, que se alimentam de plantas cujos gêneros são intimamente relacionados (monófagos) ou se alimentam de plantas de diferentes gêneros cujas famílias estão relacionadas (oligófagos) (BIONDI, 1996).

Algumas espécies possuem potencial no controle biológico de plantas daninhas, outras são importantes pragas como as do gênero *Epitrix* que atacam batata, tomate, tabaco e berinjela (BIENKOWSKI; ORLOVA-BIENKOWSKAJA, 2017) e outras se mostram como potenciais indicadores de qualidade de habitat. Além disso, conhecer a relação entre insetos fitófagos e suas plantas hospedeiras é imprescindível já que esses respondem mais rapidamente às mudanças em seus ecossistemas (LEWINSOHN; FREITAS; PRADO, 2005). No entanto, pouco se conhece sobre a relação da maioria dos crisomelídeos com suas plantas hospedeiras não sendo encontrados trabalhos que trazem como foco esse tema específico de modo que as informações quando disponíveis encontram-se bastante dispersas na literatura e restritas a poucas espécies, principalmente àquelas de importância econômica.

Quando falamos de Alticini no Brasil, existem poucos estudos recentes com esse grupo de crisomelídeos, e os artigos publicados se resumem a estudos realizados principalmente no sul do país, mais especificamente em florestas de araucária no estado do Paraná, por Linzmeier e Ribeiro-Costa, falando sobre diversidade, composição e padrões de sazonalidade dos Alticini, e também outros autores com pesquisas no Rio Grande do Sul (LINZMEIER; RIBEIRO-COSTA; MARINONI, 2006; LINZMEIER; RIBEIRO-COSTA, 2008; 2013; MOURA, 2016; GROLL, MOURA, 2017; ).

Métodos de coleta quantitativos não permitem fazer relações inseto-planta já que as amostras são muito abrangentes problema que só pode ser resolvido a partir da coleta manual com observações em campo (LEWINSOHN; PRADO; ALMEIDA, 2001). Além disso, o trabalho de coletar e obter informações a partir de observações em campo é de muita importância considerando a crescente redução de habitats naturais, o que pode

estar contribuindo inclusive para a extinção de espécies, tornando esse tipo de pesquisa essencial na busca de informações que podem auxiliar nos entendimentos dos padrões e na preservação das espécies. Como os crisomelídeos de modo geral desenvolveram grande especificidade em relação à sua alimentação ao longo do tempo (Termonia et al. 2001), é necessário conhecer as plantas hospedeiras de cada espécie.

Pensando nisto, este estudo buscou relacionar espécies de crisomelídeos à suas plantas hospedeiras, principalmente Alticini, a partir de dados obtidos em observações feitas em campo em fragmentos de mata de araucária do estado do Paraná.

## 2 | OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo reconhecer as plantas hospedeiras de espécies de *Chrysomelidae*, principalmente de Alticini encontrados em fragmentos florestais no sudoeste do Paraná, bem como registrar aspectos biológicos e comportamentais dessas espécies.

## 3 | MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas 14 coletas manuais entre os meses de novembro de 2018 e junho de 2019, em fragmentos de Floresta com Araucária em áreas de sucessão secundária, nos municípios de Realeza e Planalto, sudoeste do Paraná. Os crisomelídeos foram alfinetados, etiquetados e identificados ao menor nível taxonômico possível utilizando as chaves de Witte (1931) para subfamílias de *Chrysomelidae* e as de Scherer (1983), Monrós (1959) e Hincks (1952) para os gêneros de Alticini, Criocerinae e Cassidinae, respectivamente. As plantas coletadas que possuem flores ou frutos foram herborizadas e estão depositadas no herbário REAL da UFFS de Realeza, em forma de exsicatas, as quais foram identificadas a partir da coleção botânica do Herbário REAL, com o auxílio da professora Dra. Berta Villagra.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível relacionar 33 espécies de crisomelídeos à suas respectivas plantas hospedeiras (Tabelas 1, 2 e 3), dessas, 12 pertencem à Alticini, 11 Criocerinae, três Chrysomelinae, três Eumolpinae, dois Galerucinae s. str. e dois Cassidinae.

A importância econômica de Alticini, além de seu potencial no controle biológico contra plantas invasoras, se dá também por serem pragas em uma grande diversidade de cultivos, como o gênero *Epitrix*, que possui muitas espécies introduzidas indevidamente em áreas principalmente na Europa, América do Norte e Ásia, onde são consideradas pragas em plantações de batata, tomate, tabaco e berinjela, todas plantas da família Solanaceae. (ORLOVA-BIENKOWSKAJA & BIENKOWSKI, 2017; ORLOVA-BIENKOWSKAJA & BIENKOWSKI, 2016). O mesmo gênero, é também uma praga agrícola no Brasil e foi listado

por Barbosa (1981) como um dos maiores causadores de danos em cultivos de batata, junto com *Diabrotica speciosa* (Galerucini), praga polífaga amplamente difundida em território brasileiro e em alguns países da América do Sul, sendo também considerada o segundo maior vetor de viroses em plantas das Américas (VIANA, 2010).

Nessa pesquisa, das cinco espécies de *Epitrix* relacionadas às suas plantas hospedeiras, quatro alimentaram-se de *Solanum mauritianum* (Solanaceae), uma herbácea, pioneira (Bohs, 1994) muito comum em bordas de mata. *Epitrix* estava sempre presente, em abundância, quando a espécie da planta era inspecionada durante as coletas. Tais espécies consomem as folhas deixando pequenos orifícios, mais ou menos do seu próprio tamanho. Enquanto isso, a outra espécie de *Epitrix* foi encontrada em *Commelina benghalensis* (Commelinaceae), cujo gênero é comumente hospedeiro de Criocerinae. *Epitrix* sp. 1 foi visto ainda utilizando *Passiflora* sp. 1 (*Passifloraceae*), como hospedeira, juntamente com *Trichaltica* sp. 1. Neste caso não foi possível verificar se as espécies estavam se alimentando, das flores, de pólen ou causando algum dano. Como *Passiflora* é um gênero muito importante para a economia brasileira, é necessário estudar melhor essa relação inseto-planta, verificando se as espécies de Alticini encontradas podem vir a se tornar potenciais pragas, ou então possíveis polinizadores do maracujá, já que as espécies foram encontradas em abundância no pólen das flores.

Quanto aos Criocerinae, estes foram majoritariamente encontrados em habitats perturbados, com alto nível de luz, em bordas de floresta e de rios, em plantas de crescimento secundário, se alimentando da superfície adaxial das folhas e deixando sulcos estreitos e paralelos nas ervas monocotiledôneas, exatamente como descrito por Leschen e Vencel (2014).

Tanto adultos quanto larvas têm maior preferência pelas famílias de monocotiledôneas Commelinaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Marantaceae, Orchidaceae e Poaceae, e também por Solanaceae (dicotiledônea) (CHABOO, C. S. SCHIMITT, M., 2015). Das 11 espécies de Criocerinae encontradas, 9 se alimentaram de Commelinaceae, sendo elas: *Neolema* sp. 1; *Neolema* sp. 4; *Neolema* sp. 5; *Neolema* sp. 6; *Neolema* sp. 7; *Neolema* sp. 8; *Neolema* sp. 9; *Neolema* sp. 10 e *Quasilema* sp. 1. A única outra família encontrada como planta hospedeira de Criocerinae, também equivalente aos dados da literatura, foi Marantaceae, relacionada à *Neolema* sp. 1, *Neolema* sp. 2, *Neolema* sp. 3 e *Neolema* sp. 4. Sendo assim, *Neolema* sp. 1 e *Neolema* sp. 4 podem ser consideradas polípagas, pois foram vistas se alimentando de duas famílias distintamente relacionadas filogeneticamente (STEVENS, 2017).

Comelinaceae é uma erva daninha de fácil proliferação, e é importante ressaltar a eficácia dos criocerinos no controle biológico dessa família de monocotiledôneas. Na Nova Zelândia já estão sendo usadas três espécies de Criocerinae importadas do Paraná (Brasil) para controlar uma espécie do gênero *Tradescantia* (Comelinaceae) que se alastra massivamente pelo solo neozelandês, e limita o crescimento da floresta de regeneração nativa (FOWLER. S. V. et. al., 2013). O Brasil possui um total de 136 espécies de Criocerinae nativas e o conhecimento de suas relações com as plantas hospedeiras pode ser um grande aliado no combate à infestação de ervas daninhas não somente dentro do país, mas também

fora dele, como no exemplo recém citado (SEKERKA, L. 2020).

Além de Criocerinae, outros crisomelídeos são utilizados como controle biológico de ervas daninhas em outros países. O gênero *Platyphora* sp. (Chrysomelinae), além de encontrado uma única vez em *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae), foi visto várias vezes em campo alimentando-se de *Solanum* sp. 1 (Solanaceae), planta muitas vezes relatada por outros autores como sendo hospedeira de *Platyphora* (WINDSOR, et. al. 2013; PEDROSA-MACEDO, et. al., 2003; FLINTE, et. al., 2017). Existem estudos sobre o uso de espécies brasileiras desse gênero, juntamente com espécies de Alticini e Galerucinae, utilizadas como controle biológico de solanáceas em regiões da África onde a planta é uma grande invasora, reforçando ainda mais a importância dos crisomelídeos como controle biológico até mesmo fora do Brasil (PEDROSA-MACEDO, et. al., 2003).

*Colaspis* sp. (Eumolpinae) também foi encontrado em *Solanum* sp., alimentando-se das pétalas da planta. Essa relação também foi feita por Clark et al. (2004) em uma revisão que traz 1.261 espécies de crisomelídeos dos Estados Unidos associados às suas plantas hospedeiras, porém os autores não citam qual parte da planta foi consumida. *Colaspis* foi encontrado ainda se alimentando de Melastomataceae, família que não aparece associada à Eumolpinae na revisão citada anteriormente. Também não foram encontrados registros para a América do Sul.

Quanto aos Galerucinae, foi possível associar *Buckibrotica cinctipennis* (Baly, 1886), à Commelinaceae e *Acalymma* foi encontrada em plantação de Abóbora (*Cucurbita* sp.), destruindo as folhas e flores da Cucurbitácea, que é amplamente cultivada em território brasileiro. *Acalymma* possui 72 espécies na América, principalmente na região Neotropical e é uma praga comum em Cucurbitáceas nos Estados Unidos (CABRERA, 1999; CLARK, et al. 2004). De acordo com a Embrapa (2004), *Acalymma* foi o gênero mais presente atacando culturas de abóboras em um estudo realizado no Distrito Federal (DF). *A. vittatum* é conhecida como besouro listrado do pepino, causando danos em plantações de Cucurbitaceae, Rosaceae, Fabaceae e Asteraceae (CAPINERA, 2001). Devido ao grande potencial de dano nas plantações, foram desenvolvidas técnicas para o controle dessa e de outras pragas de Galerucini da América do Norte, baseadas em controle biorracional e orgânico utilizando, por exemplo, predadores e parasitas naturais e monitoramento populacional (ATTRA, 2008). Porém, como o Brasil possui ecossistemas distintos dos norte-americanos, para que seja possível o desenvolvimento de técnicas de manejo semelhantes, devemos conhecer melhor espécies locais, incluindo sua relação com as plantas hospedeiras, ciclo de vida e predadores naturais possibilitando dispensar o uso de agrotóxicos e outros meios potencialmente nocivos ao meio ambiente.

São conhecidos hospedeiros de aproximadamente 63% dos gêneros de Cassidinae (BOROWIEC, L. 1999), porém devido às espécies observadas passarem maior parte do seu tempo imóveis ou quase imóveis nas folhas, foi difícil observar alimentação para essa subfamília. Relacionamos *Chlamidocassis cribripennis* à *Hyptis lagenaria* (Lamiaceae) e *Anacassis* sp. à Melastomataceae, quando esta espécie foi mantida em cativeiro num pote plástico junto com a planta onde foi encontrada. Eliminou-se a possibilidade de alimentação

forçada por falta de recursos disponíveis pois o besouro se alimentou poucos minutos após ser coletado. O mesmo espécime ovipôs nas folhas logo após a alimentação.

<b>Subfamília de Chrysomelidae</b>	<b>Espécies de Chrysomelidae</b>	<b>Planta Hospedeira</b>
Galerucinae	<i>Acalymma</i> sp. 1	<i>Cucurbita</i> sp. (Cucurbitaceae)
	<i>Buckibrotica cinctipennis</i> (Baly, 1866)	Commelinaceae
Aleticini	<i>Alagoasa</i> sp. 1	<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (Verbenaceae)
	<i>Syphraea</i> sp. 1	<i>Amaranthus blitum</i> L. (Amaranthaceae)
	<i>Omophoita octoguttata</i> (Fabricius, 1775)	<i>Ocimum</i> sp. 1 (Lamiaceae) <i>Ocimum</i> sp. 2 (Lamiaceae)
	<i>Systema</i> sp. 2	Asteraceae
	<i>Epitrix</i> sp. 1	<i>Solanum mauritianum</i> (Solanaceae) <i>Passiflora</i> sp. 1 (Passifloraceae)
	<i>Epitrix</i> sp. 2	<i>Solanum mauritianum</i> (Solanaceae)
	<i>Epitrix</i> sp. 3	<i>Solanum mauritianum</i> (Solanaceae)
	<i>Epitrix</i> sp. 4	<i>Solanum mauritianum</i> (Solanaceae)
	<i>Epitrix</i> sp. 5	<i>Commelina benghalensis</i> (Commelinaceae)
	<i>Trichaltica</i> sp. 1	<i>Passiflora</i> sp. 1 (Passifloraceae)
	<i>Capraita</i> sp. 2	<i>Austroeupatorium</i> sp. 1 (Asteraceae)
	<i>Capraita</i> sp. 4	<i>Austroeupatorium</i> sp. 1 (Asteraceae)
Eumolpinae	Eumolpinae sp. 1	<i>Vernonanthura tweediana</i> (Asteraceae)
	Eumolpinae sp. 2	Asteraceae
	<i>Colaspis</i> sp. (Eumolpinae sp. 3)	<i>Solanum</i> sp. 1 (Solanaceae)

Tabela 1: Relação entre espécies de *Chrysomelidae* e suas respectivas plantas hospedeiras.

<b>Subfamília de Chrysomelidae</b>	<b>Espécies de Chrysomelidae</b>	<b>Planta Hospedeira</b>
Criocerinae	<i>Neolema</i> sp. 1 (Lema)	<i>Maranta</i> sp. 2 (Marantaceae); <i>Commelina</i> sp. 1 (Commelinaceae), <i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 2 (Lema)	<i>Maranta</i> sp. 2 (Marantaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 3 (Lema)	<i>Maranta</i> sp. 2 (Marantaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 4 (Lema)	<i>Maranta</i> sp. 1 (Marantaceae), <i>Commelina diffusa</i>
	<i>Neolema</i> sp. 5 (Lema)	Commelinaceae
	<i>Neolema</i> sp. 6 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 3 (Commelinaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 7 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 3 (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 4 (Commelinaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 8 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 3 (Commelinaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 9 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 3 (Commelinaceae)
	<i>Neolema</i> sp. 10 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae) <i>Commelina</i> sp. 3
	<i>Quasilema</i> sp. 1 (Lema)	<i>Commelina diffusa</i> (Commelinaceae)

Tabela 2: Relação entre espécies de *Chrysomelidae* e suas respectivas plantas hospedeiras.

Subfamília de Chrysomelidae	Espécies de Chrysomelidae	Planta Hospedeira
Cassidinae	<i>Chlamidocassis cribripennis</i>	<i>Hyptis lagenaria</i> (Lamiaceae)
	<i>Anacassis</i> sp.	Melastomataceae
Chrysomelinae	<i>Platyphora</i> sp. 1	<i>Solanum</i> sp. 1 (Solanaceae)
	<i>Platyphora</i> sp. 4	<i>Asclepias curassavica</i> (Asclepiadaceae)
	Chrysomelinae sp. 3	<i>Mikania</i> sp. (Asteraceae)

Tabela 3: Relação entre espécies de *Chrysomelidae* e suas respectivas plantas hospedeiras.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações apresentadas a partir das coletas e observações feitas em campo mostram que as relações entre crisomelídeos e suas plantas hospedeiras são muito complexas e específicas tendo extrema importância seja usando os besouros como controle biológico de ervas daninhas, bioindicadores de diversidade ou relações que ainda não foram descobertas, como no caso da relação entre *Passiflora* e Alticini, que pode ser um potencial polinizador de maracujá.

Os estudos que relacionam Alticini, e não só este táxon, às suas plantas alimentícias são extremamente escassos, mostrando a importância de expandir as pesquisas sobre os crisomelídeos de maneira geral, principalmente na sua relação com as plantas hospedeiras. Esta relação é essencial para compreender a função das espécies em seus ecossistemas, entender padrões ecológicos e de diversidade, além de contribuir na descoberta de espécies com potencial econômico, seja ele negativo ou positivo, como no caso da relação entre *Passiflora* e Alticini, que pode ser um potencial polinizador de maracujá ainda não revelado.

Não podemos deixar de citar a dificuldade de realizar esse tipo de estudo, considerando uma série de fatores decisivos ao estabelecer uma relação inseto-planta. Como principais, temos a dificuldade de encontrar o espécime se alimentando em campo e a identificação tanto do crisomelídeo quanto da planta, que não pode ser identificada adequadamente sem a presença de flores ou frutos. Já que cada região do Brasil possui espécies de crisomelídeos diferentes, também é necessário o uso de chaves de identificação para cada região, colocando mais uma barreira no caminho dos pesquisadores.

## REFERÊNCIAS

ATTRA. **Cucumber Beetles: Organic and Biorational Integrated Pest Management**. In: ATTRA. Estados Unidos, 2008. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20100816153647/http://www.attra.org/attra-pub/PDF/cucumberbeetle.pdf>>. Acesso em: janeiro de 2020.

BARBOSA, S.; FRANÇA, F. H. **Pragas da Batata e seu Controle**. In.: Batata/Tecnologia de Produção. Agropec, Belo Horizonte, c. 7, p. 76, 1981. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/184388/1/Pragas-da-batata.pdf>>. Acesso em: março de 2020.

BIENKOWSKI; ORLOVA-BIENKOWSKAJA. **World checklist of flea-beetles of the genus *Epitrix* (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini)**. In.: Zootaxa. Nova Zelândia, v. 4268(4), p. 523-540, 2017. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4268.4.4>>. Acesso em: dezembro de 2018.

BIONDI M. **Proposal for an ecological and zoogeographical categorization of the Mediterranean species of the flea beetle genus *Longitarsus* Berthold**. In.: Jolivet PHA, Cox ML (Eds) *Chrysomelidae biology 3 General Studies*. SPV Academic Publishing. Amsterdam, p. 13–35, 1996. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/257940047\\_Proposal\\_for\\_an\\_ecological\\_and\\_zoogeographical\\_categorization\\_of\\_the\\_Mediterranean\\_species\\_of\\_the\\_flea\\_beetle\\_genus\\_Longitarsus\\_Berthold](https://www.researchgate.net/publication/257940047_Proposal_for_an_ecological_and_zoogeographical_categorization_of_the_Mediterranean_species_of_the_flea_beetle_genus_Longitarsus_Berthold)>. Acesso em: julho de 2019.

BOHS, L. **Flora Neotrópica. *Cyphomandra* (Solanaceae)**. In.: The New York Botanical Garden. Nova York, v. 63, 1-175, 1994.

BOROWIEC, L. **A world catalogue of the Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae)**. In.: Biologica Silesiae, Wrocław, 476 pp, 1999.

CABRERA, N. **Contribución para el conocimiento del género *Acalymma* en la Argentina (Coleoptera: Chrysomelidae)**. In.: Rev. Soc. Entomol. Argentina. Argentina. v. 58, p. 91-105, 1999. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/RSEA/article/download/32563/28936>>. Acesso em: fevereiro de 2020.

CAPINERA, J. L. **Handbook of Vegetable Pests**. In.: Academic Press. 800 p. 2001.

CHABOO, C. S. SCHIMITT, M. **Beetles (Coleoptera) of Peru: A Survey of the Families. *Chrysomelidae: Criocerinae***. In.: Journal of the Kansas Entomological Society. Kansas, EUA, v. 88(3), p. 384–386, 2015. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/288022555\\_Beetles\\_Coleoptera\\_of\\_Peru\\_A\\_Survey\\_of\\_the\\_Families\\_Chrysomelidae\\_Criocerinae](https://www.researchgate.net/publication/288022555_Beetles_Coleoptera_of_Peru_A_Survey_of_the_Families_Chrysomelidae_Criocerinae)>. Acesso em: janeiro de 2020.

CLARK, S.; LEDOUX, D. G.; SEENO, T. N. RILEY, E. G.; GILBERT, A. J.; SULLIVAN, J. M. **Host Plants of Leaf Beetle Species Occurring in the United States and Canada (Coleoptera: Orsodacnidae, Megalopodidae, *Chrysomelidae* exclusive of Bruchinae)**. In.: *Coleopterists Society*. n. 2. 615 p. 2004. Disponível em: <[https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/pdf/clark\\_ledoux\\_et\\_al\\_2004.pdf](https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/pdf/clark_ledoux_et_al_2004.pdf)>. Acesso em: fevereiro de 2020.

EMBRAPA. **Diversidade de Crisomelídeos-Praga (Coleoptera: *Chrysomelidae*) no Distrito Federal**. In.: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/185301/1/bp076.pdf>>. Acesso em: fevereiro de 2020.

FLINTE, V.; ABEJANELLA, A.; DACCORDI, M.; MONTEIRO, R. F.; MACEDO, M. V. ***Chrysomelinae* species (Coleoptera, *Chrysomelidae*) and new biological data from Rio de Janeiro, Brazil**. In.: Zootaxa. v. 720, p. 5-22, 2017. Disponível em: <<https://zookeys.pensoft.net/article/13963/>>. Acesso em: fevereiro de 2020.

FOWLER, S. V.; BARRETO, R.; DODD, S.; MACEDO, D. M.; PAYNTER, Q.; PEDROSA-MACEDO, J. H.; PEREIRA, O. L.; PETERSON, P.; SMITH, L.; WAIPARA, N.; WINKS, C. J.; FORRESTER, G. ***Tradescantia fluminensis*, an exotic weed affecting native forest regeneration in New Zealand: Ecological surveys, safety tests and releases of four biocontrol agents from Brazil**. In.: Biological Control. Elsevier. United States, v. 64, p. 323-329. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964412002599>>. Acesso em: janeiro de 2020.

GROLL, E.; MOURA, L. A. **Comparative morphology of two species of *Caraguata* Bechyné (Coleoptera, *Chrysomelidae*, Galerucinae, Galerucini)**. In.: Iheringia: Série Zoologia, v. 107, p. 1-11, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/isz/v107/1678-4766-isz-107-e2017009.pdf>>. Acesso em: março de 2020.

KONSTANTINOV A. F. **Possible living fossil in Bolivia: A new genus of flea beetles with modified hind legs (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini)**. In.: ZooKeys. Washington DC-USA, v. 592, p. 103–120. 2016. Disponível em: <<https://zookeys.pensoft.net/article/8180/>>. Acesso em: dezembro de 2018.

LESCHEN, R. A. B. VENCL, F. V. **Handbook of Zoology A Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom: Arthropoda: Insecta. Tb. 40: Coleoptera (Beetles). Vol 3: Morphology and Systematics (Phytophaga)**. In.: De Gruyter. Berlim, v. 2, p. 8-8, 2014. Disponível em: <[https://www.degruyter.com/view/Zoology/bp\\_027370-0\\_14](https://www.degruyter.com/view/Zoology/bp_027370-0_14)>. Acesso em: 06 jan. 2020.

LEWINSOHN T. M., FREITAS A. V. L., PRADO P. I. **Conservação de Invertebrados Terrestres e seus Habitats no Brasil**. In.: Desafios e Oportunidades para a Conservação da Biodiversidade no Brasil - Megadiversidade. Org. Conservação Internacional Brasil. Belo Horizonte, v. 1, n°1, p. 62-69. 2005.

LEWINSOHN T. M., PRADO P. I. K. L., ALMEIDA A. M. **Inventários Bióticos Centrados em Recursos: Insetos Fitófagos e Plantas Hospedeiras**. In.: Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. ed. Vozes. Petrópolis, RJ, 430 p. 2001.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, R. C. **Fauna de Alticini (Newman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em diferentes estágios sucessionais na Floresta com Araucária do Paraná, Brasil: diversidade e estimativa de riqueza de espécies**. In.: Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 50, n. 1, p.101-109, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0085-56262006000100015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262006000100015)>. Acesso em: março de 2019.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S. **Seasonality and temporal structuration of Alticini community (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) in the Araucaria Forest of Paraná, Brazil**. In.: Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 289-295, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0085-56262008000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262008000200009)>. Acesso em: março de 2019.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S. **Seasonal pattern of Chrysomelidae (Coleoptera) in the state of Paraná, southern Brazil**. In.: Revista Biota Neotropica. Campinas, v. 13, n. 1, p. 153-162, 2013. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v13n1/en/abstract?article+bn04013012013>>. Acesso em: março de 2019.

MOURA, L. A. **New species, new combinations and synonymies of Neotropical Galerucini (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae)**. In.: Zootaxa. v. 4066, p. 063-070, 2016. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4066.1.4>>. Acesso em: março de 2020.

PEDROSA-MACEDO, J. H.; OLCKERS, T.; VITORINO, M. D.; CAXAMBU, M. G. **Phytophagous Arthropods Associated with *Solanum mauritianum* Scopoli (Solanaceae) in the First Plateau of Paran-, Brazil: A Cooperative Project on Biological Control of Weeds Between Brazil and South Africa**. In.: Neotropical Entomology. Paraná, v. 32, p. 519-522, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ne/v32n3/18774.pdf>>. Acesso em: fevereiro de 2020.

REN, J.; GUNTEN, N.; KONSTANTINOV, A. S.; VENCL, F. V.; GE, S.; HU, D. L. **Chewing Holes for Camouflage**. In.: Zoological Science. Japão, v. 35, p. 199-207. 2018. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/Zoological-Science/volume-35/issue-3/zs170136/Chewing-Holes-for-Camouflage/10.2108/zs170136.full>>. Acesso em: dezembro de 2018.

RUAN, Y.; KONSTANTINOV, A. S.; SHI, G.; TAO, Y.; LI, Y.; JOHNSON, A. J.; LUO, X.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; WU, J.; LI, W.; GE, S.; YANG, X. **The jumping mechanism of flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticini), its application to bionics and preliminary design for a robotic jumping leg**. In.: Zootaxa. Bulgária, v. 915, p. 87-105. 2020. Disponível em: <<https://zookeys.pensoft.net/article/38348/>>. Acesso em: março de 2020.

SEKERKA, L. 2020. **Criocerinae**. In.: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. [s. d.]. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/118159>>. Acesso em: fevereiro de 2020.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Versão 14. Universidade de Missouri. Missouri, St. Louis.,

2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/welcome.html>>. Acesso em: julho de 2019.

TERMONIA, A.; HSIAO, T. H.; PASTEELS, J. M. MILINKOVITCH, M. C. **Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomelinae leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end.** In.: PNAS USA. Arizona-USA, v.98, p. 3909–3914. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC31152/>>. Acesso em: dezembro de 2018.

VIANA, P. A. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho.** In.: Circular Técnica. Sete Lagoas, MG. v. 141, p. 1-6. 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/manejo-de-diabrotica-speciosa-na-cultura-do-milho.pdf/a0ec3a33-2864-47b3-ac6e-b2fc63d4fa02>>. Acesso em: março de 2020.

WINDSOR, D. M., DURY, J. G.; FRIEIRO-COSTA, F. A.; LANCKOWSKY, S.; PASTEELS, J. M. **Subsocial Neotropical Doryphorini (*Chrysomelidae*, *Chrysomelinae*): new observations on behavior, host plants and systematics.** In.: Zootaxa. v. 322, p. 71-93, 2003. Disponível em: <[https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=3100&element\\_type=9](https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=3100&element_type=9)>. Acesso em: fevereiro de 2020.

## TOBACCO MIXTURE IN THE FIGHT AGAINST COWPEA APHID DURING THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *V. unguiculata*

Data da submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### **Marcelo Ferreira de Souza**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/9634167478959057>.

### **José Ivo Soares**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/1866131069257809>.

### **Ana Cristina Macedo de Oliveira**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/1437190889259396>.

### **Sebastião Erailson de Sousa Santos**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/8787348625130381>.

### **Maíres Alves Cordeiro**

Reginal University from the Cariri.

Crato - Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/9315236243199122>.

### **Jeyce Layse Bezerra Silva**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte – CE.

<http://lattes.cnpq.br/0352531440184888>.

### **Maria Regina de Oliveira Cassundé**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/4578909597841321>.

### **Ananda Jackellynne Vaz da Silva**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/6006539353001168>.

### **Lucas Ermeson Soares das Neves**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/6684137374751882>.

### **José Wiliam Pereira Brito**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/2333059135997982>.

### **Karol Águida Santos Rocha**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/7225571305492679>.

### **Italo Ferreira da Silva**

Faculty of Tecnology from the Cariri.

Juazeiro do Norte - CE.

<http://lattes.cnpq.br/4849310162147116>.

**ABSTRACT:** This work aimed to identify the dosage and the most economical methodology of the tobacco mixture to use it as an alternative pesticide and apply it in the fight against the cowpea aphid *Alphis craccivora* in plants of the species *V. unguiculata*. The test was conducted at Fatec - Cariri, in the extreme south of Ceará, with plots measuring 79.0 m<sup>2</sup>, with all the desirable conditions for the development of the

cultivation, being evaluated the variables of stem height (SH), number of leaves (NL) and stem diameter (SD). The plots were submitted to dosages 0 (D0): 0.0 g L<sup>-1</sup>; D1: 2.5 g L<sup>-1</sup>; D2: 5.0 g L<sup>-1</sup> e; D3: 25.0 g L<sup>-1</sup>, in the tobacco mixture preparation. This way, it was possible to verify that the application in the proportion of mixture diluted in water of 5.0 g L<sup>-1</sup> had better response in SH and NL, getting to, 20 DAIT, 38.0 cm and 29 leaves, respectively; the SD did not obtain significantly results during the applications. It was concluded that the application D2 is more economical, using 5.0 g L<sup>-1</sup>, to be distributed in an area of 655 L ha<sup>-1</sup> proportion.

**KEYWORDS:** *Alphis craccivora*; entomology; diluted tobacco; alternative pesticide.

## CALDA DO FUMO NO COMBATE DO PULGÃO DURANTE O CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO *V. unguiculata*

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo identificar a dosagem e a metodologia mais econômica da calda do fumo para utilizá-la como pesticida alternativo e aplicar no combate do pulgão *Alphis craccivora* em plantas da espécie *V. unguiculata*. O ensaio foi realizado na Fatec - Cariri, no extremo sul do Ceará, com parcelas medindo 79,0 m<sup>2</sup>, com todas as condições desejáveis ao desenvolvimento da cultura, sendo avaliadas as variáveis de altura caulinar (AC), número de folhas (NF) e diâmetro caulinar (DC). As parcelas foram submetidas às dosagens 0 (D0): 0,0 g L<sup>-1</sup>; D1: 2,5 g L<sup>-1</sup>; D2: 5,0 g L<sup>-1</sup> e; D3: 25,0 g L<sup>-1</sup>, na preparação da calda de fumo. Desta forma, foi possível verificar que a aplicação na proporção de calda diluída em água de 5,0 g L<sup>-1</sup> teve melhor resposta na AC e NF, chegando a atingir, aos 20 DAIT, 38,0 cm e 29 folhas, respectivamente; o DC não obteve significativamente resultados durante as aplicações. Concluiu-se que a aplicação D2 é mais econômica, utilizando-se 5,0 g L<sup>-1</sup>, para ser distribuída em uma área de proporção 655 L ha<sup>-1</sup>.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Alphis craccivora*; entomologia; fumo diluído; pesticida alternativo.

## 1 | INTRODUCTION

With the introduction of agriculture in the cultivation of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] In extensive areas, conditions favorable to the occurrence of species that could become pests were created. During the colonization of Brazil, the aphids, native to Asia and Europe, arrived along with the caravels, finding an environment and climate favorable for proliferation, free of their natural enemies, in bean crops, factors that allowed the aphids population explosion, besides species of sporadic occurrence (GASSEN, 1999 apud VICENTE and RESENDE JÚNIOR, 2011). These insects, considered a secondary pest in the cultivation of beans, have become important in Brazilian family agriculture.

The tobacco that goes by the scientific name of *Nicotiana tabacum* and has its common name known as tobacco is originated from South America: from the leaves the substance called nicotine is extracted, which at first was used for therapeutic purposes, but researches have shown that medical-therapeutic meaning of tobacco has fallen into disuse over the decades. But, for many years it has been used in agriculture as a fungicide and the recipes

are passed on from generation to generation (PREVIERO et al., 2010).

The tobacco recipes are normally used to control aphids, which are easily settled in cowpea plantations in the North and Northeast, especially for farmers in Ceará, with an average yield of irrigated cowpea from 1200 to 1950 Kg ha<sup>-1</sup> (FREIRE FILHO, RIBEIRO and BANDEIRA, 1997). But in other cases, most of small farmers do not use high technology or seeds resistant to this pest and creole seeds that have no certainty of their characteristics. Mainly, access to genetically modified seeds resistant to the attack of this pest (SILVA, 2016).

The deficiency of application in researches in favor of analyzing the efficiency of nicotine is an aggravating factor, once its effectiveness and effects must still be better known for its use to be stimulated (PREVIERO et al., 2010; SILVA et al., 2017).

The goal of this work was to identify the dosage and a more economical methodology of tobacco working as an alternative pesticide that may be used to control the aphid *Alphis craccivora* in plants of the species *V. unguiculata*.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

The work were carried out at Faculty of Technology from the Cariri (Fatec Cariri), when the climate in this region is of the AW “type, characteristic of a tropical rainy climate” (Köppen classification), with an annual average rainfall of 1033 mm (distributed in a rainy season from January to May), average temperatures throughout the year between 75.0 ° F and 80.6 ° F, with minimum averages of 64.4 ° F and maximum of 91.4 ° F. The area’s soil is characterized by classification as Red Yellow Argisol (EMBRAPA, 2013).

The planting of cowpea was conducted on October 15, 2018, in clayish soil, the one which the soil analysis can be seen in Table 1, and with plots measuring 79 m<sup>2</sup>. The experiment was carried out with 4 mixture treatments entitled Dosage 0 (Control) D0; dosage 1 (D1), dosage 2 (D2) and; dosage 3 (D3), in the tobacco mixture preparation, after checking, during irrigation, the rise in the presence of aphid in the plant’s body.

Layer	Chemical Features <sup>1</sup>						
	pH (H <sub>2</sub> O)	P	Al exchangeable	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	MO
m	-	mg dm <sup>-3</sup>		cmolc dm <sup>-3</sup>			g kg <sup>-1</sup>
0,02 – 0,20	5,20	2,00	0,10	0,09	0,80	0,40	3,7

<sup>1</sup>P and K extractor, Mehlich<sup>-1</sup>; Organic Matter (MO).

Table 1. Result of the chemical analysis of the soil in the experimental area of Fatec Cariri.

The cycle of occurrence of the pest in the plantation lasted approximately one month and a half from the detection of the pest until the fight against. The application of the tobacco mixture was carried out when approximately 50% of the attacked plants, in two moments and repeated ten days after the first, in the same proportion and method, always keeping

the irrigation constant according to the need of the crop and the soil analysis of previously conducted, observing if there is any occurrence of new pests during the crop cycle.

There was no precipitation during the occurrence of aphids and the applications of the treatments, that precipitation was only accounted for in the whole cycle of 75 mm, collected by the rain gauge, one month after the conduction of the last treatments and the data collection of growth and development of plants.

The tobacco mixture was applied only to the parts of the branches, stems and leaves of the bean plants, as can be seen through Figure (A, B, C and D), in equal proportions of approximately  $655 \text{ L ha}^{-1}$ , however with a mass concentration preparation different: treatment 1,  $0.0 \text{ g L}^{-1}$  (control); treatment 2,  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ; treatment 3,  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  e; treatment 4,  $25.0 \text{ g L}^{-1}$ .



Figure 1. Bucket with diluted mixture for application (A); Chopped tobacco and prepared to be diluted in water (B); Manual plant sprayer (C); Application of mixture on the aphids on affected plants (D).

The experiment had three moments of sample collection: Evaluation 1 (EV1), Evaluation 2 (EV2) and Evaluation 3 (EV3), from which were determined in time from the beginning of the application of treatments, counting in 5 days after the beginning of treatments (5 DABT), 10 DABT and 20 DABT, in other words, referring to EV1, EV2 and EV3, respectively.

The evaluations are comprised of non-destructive samples for determination of variables: stem height (SH), stem diameter (SD) and Number of Leaves (NL). Using, respectively, for the conduction of these evaluations a 50 cm graduated ruler (centimeter) and a manual caliper mm (millimeter), except for the number of leaves.

The results were submitted to analysis of variance and the significant variables were evaluated by regression analysis, at the level of 5% of error, by the Sisvar® program, in a design model entirely randomized.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The figure 2 is being represented by the behavior of stem height, in centimeters (cm), as a function of the increasing dosages of tobacco mixture D0: 0.0 g.L<sup>-1</sup> replaced by the number 1; D1: 2.5 g.L<sup>-1</sup> replaced by number 2; D2: 5.0 g.L<sup>-1</sup> replaced by number 3 and; D3: 25.0 g.L<sup>-1</sup> replaced by number 4, to make the understanding of the figures easier. The dosage axis also repeated itself in the figure 3, but relating it to the number of leaves.

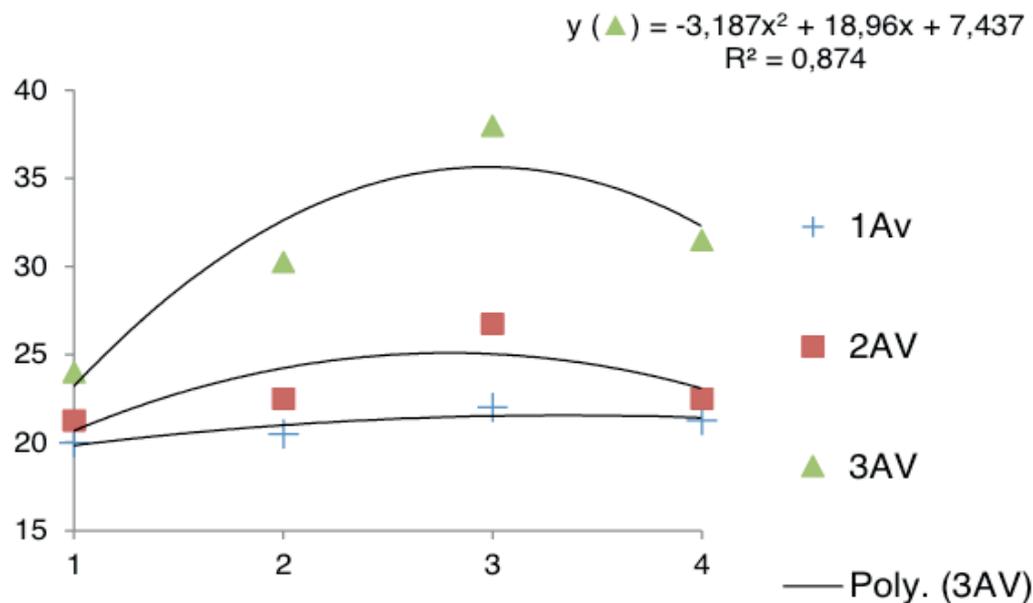


Figure 2. Behavior of the Stem Height (SH) assessments on the Y axis in cm, submitted to the 4 levels of tobacco mixture, X axis.

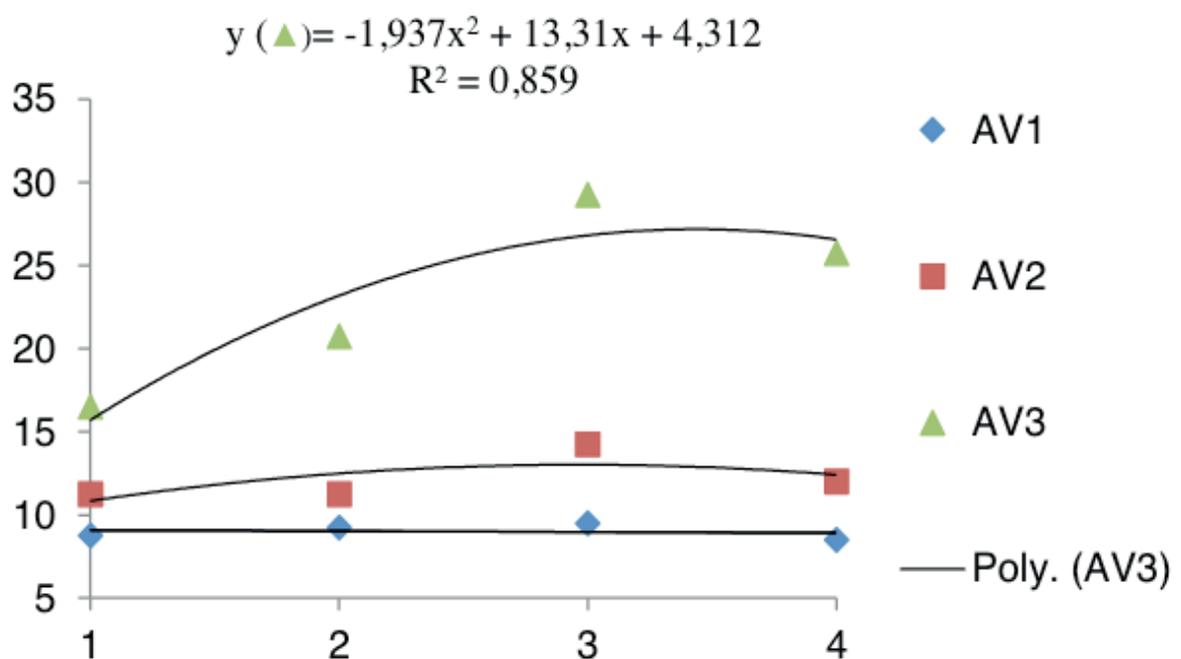


Figure 3. Behavior of Leaf Number (LN) assessments on the Y axis, for the 4 levels of tobacco mixture doses.

The behavior of the stem height in relation to the tobacco mixture doses, based upon the EV1 and EV2, demonstrated that they did not influence the growth of the plants of the plots that received these dosages, keeping the SH values for the data of the collections of these samples very close. On the other hand, EV3 had a different behavior, that Dosage 3 ( $5.0 \text{ g L}^{-1}$ ) was the one that obtained the most accentuated SH mean in figure 2.

The behavior of the Number of Leaves (NL) in relation to tobacco mixture doses, based on EV1 and EV2, demonstrated that they did not significantly influence their increase in the plants of the plots that received these dosages, thus keeping the NL values for the data of the collections of these samples very close even with the presence of the aphid in the plants. On the other hand, EV3 demonstrated that D3 ( $5.0 \text{ g L}^{-1}$ ) was the one that obtained the most accentuated mean NL among the plants' means of the plot that received this dosage in figure 3.

Cysne, Costa and Cleicher et al. (2014) evaluating the control efficiency exercised by several commercial brands of neutral detergents in different concentrations, in the search for alternative substances for dealing with black aphids in beans, concluded that the neutral detergents studied (Brilux® (DNBR), Ypê® (DNY), Invicto® (DNI), Limpol® (DNL), Minuano® (DNM), BioBrilho® (DNBI), Pedra 90® (DNP) and Barra® (DNBA), besides the distilled water (witness)), concluded that they showed no adverse effects on the growth and development of the cowpea plants attacked by the aphid.

This represents a viable alternative compared to the use of tobacco mixture, however, the health of the operator, the plants and the environment, when tobacco is used to neutralize the attack of this pest, becomes effective in factors like, for example, substances or residues of the detergent in contact with the edible parts of plants that are consumed by animals and / or humans, which are cancerous, in the least cases, and may be able to contaminate the environment (Os Produtos ..., 2015?).

The dosages 3 and 4 showed efficiency of 100% of aphid reduction (*Alphis craccivora*); the dosage 1 responded to the attack of the pests, with the reduction in the size of the plants, shriveled leaves and consequently reduction in the production.

## 4 | CONCLUSION

The alternative that is closest to the reality of producers, in order to have better savings in applications is by applying  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  diluting in water to be used the solution per area of  $655 \text{ L ha}^{-1}$  and controlling the pest after two applications during its occurrence.

## 5 | ACKNOWLEDGEMENTS

To the Cearense Foundation for Support for Scientific and Technological Development - Funcap, for the financial support of the scientific initiation scholarship holder (BICT), the

Technological Education Center (Centec) and the Centec Cariri Technology Faculty (Fatec Cariri), for the investment of time, financial resources and manpower for the acquisition of the research material.

## REFERENCES

CYSNE, A. Q.; COSTA, J. V. T. A.; BLEICHER, E. **Atividade inseticida de detergentes neutros sobre pulgão preto em feijão-caupi**. Rev. Ciências Agroambientais, v.12, n.1, Alta Floresta, MT. 2014. p. 75-81. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/128521/1/10-artigo-rcaa-v12n1a2014-1.pdf>>. Acesso em: 10 jan 2020.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, Brasil. 353p. 2013.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BANDEIRA, L. M. R. **Cultivares de feijão-caupi recomendadas para o plantio nas regiões do Norte e Nordeste: Ano Agrícola 1997/98**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Terezina/PI. folhetos. 1997/98. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/51640/cultivares-de-feijao-caupi-recomendadas-para-o-plantio-nas-regioes-norte-e-nordeste-ano-agricola-19979>>. Acesso em: 10 out. 2018.

GASSEN, D. N. **Vermelho não produz**. Revista Cultivar Grandes Culturas, Pelotas. Edição nº 10, Novembro 1999. Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=92>>. Acesso em: 12 jun 2018.

PREVIERO, C. A., JÚNIOR, B. C. L., FLORENCIO, L. K., SANTOS, D. L. **Receitas de plantas com propriedades inseticidas no 1 controle de pragas**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP/ULBRA 1ª Ed. 2010. p. 21. Disponível em: <<file:///C:/Users/BBV%2002/Downloads/receitas-plantas-cartilha-CEULP-ULBRA-CNPq-2010.pdf>>. Acesso em 15 de dez. de 2018.

SILVA, L. M., CALDAS, A. P., RODRIGUES, A. L. M., OLIVEIRA, J. S. SIMONETTI, E. R. S. **O uso do extrato de fumo (Nicotina tabacum) como alternativa para o controle de pragas em hortaliças**. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (COINTER). PDVagro. 2017. Disponível em: <<file:///C:/Users/BBV%2002/Downloads/O-USO-DO-EXTRATO-DE-FUMO-Nicotina-tabacum-COMO-ALTERNATIVA-PARA-O-CONTROLE-DE-PRAGAS-EM-HORTALI%C3%87AS.pdf>>. Acesso em: 15 de dez. de 2018.

SILVA, P. H. S. **Pragas da cultura do feijão-caupi**. In: BASTOS, E. A. A cultura do feijão-caupi no Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) & Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio-Norte). Terezina/PI. 2016. p. 27-29.

## WOULD THE VOLATILE TERPENES OF *Mesosphaerum suaveolens* HAVE A PHYTOTOXIC EFFECT?

Data de submissão: 26/05/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### **José Weverton Almeida Bezerra**

Universidade Regional do Cariri - URCA,  
Departamento de Ciências Biológicas  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/5570296179611652>

### **Rafael Pereira da Cruz**

Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3675589918865790>

### **Thaís da Conceição Pereira**

Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/4401806283932426>

### **Maria Haiele Nogueira da Costa**

Universidade Regional do Cariri - URCA,  
Departamento de Ciências Biológicas  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/8328357468951603>

### **Emanoel Messias Pereira Fernando**

Universidade Federal de Campina Grande –  
UFCG, Programa de Pós-graduação Ciências  
Florestais Patos – Paraíba  
<http://lattes.cnpq.br/1672846763497019>

### **Helder Cardoso Tavares**

Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/1226778256396637>

### **Talita Leite Beserra**

Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/0190569712221971>

### **Kleber Ribeiro Fidelis**

Universidade Regional do Cariri - URCA,  
Departamento de Ciências Biológicas  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/2413206173320592>

### **José Iago Muniz**

Universidade Regional do Cariri - URCA,  
Departamento de Ciências Biológicas  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/0756453532947473>

### **Maria Aurea Soares de Oliveira**

Universidade Regional do Cariri - URCA, Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/0232906796291639>

### **Talina Guedes Ribeiro**

Universidade Regional do Cariri - URCA,  
Departamento de Ciências Biológicas  
Crato – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/5431838022677389>

**ABSTRACT:** Plants used in reforestation, such as the cactus *Pilosocereus gounellei* (F.A.C.Weber) Byles & Rowley subsp. *gounellei*, may undergo allelopathic effect of other plants, especially weeds, such as *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze. So that the coexistence of the species can bring consequences to the ecological succession of one of the species. To evaluate the allelopathic action of the essential oil of *M. suaveolens* on the germination of seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei*. The essential oil obtained from the leaves was diluted in various concentrations (125-1000 µg/mL) and applied to the seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei*, accompanied by a control group. The seeds that germinated were counted and some variables were measured, such as percentage and germination, Germination Speed Index and T50. It has been shown that the oil is able to delay and inhibit the germination of *P. gounellei* subsp. *gounellei* at concentrations  $\geq 1000$  µg/mL. The essential oil of *M. suaveolens* is capable of retarding germination and inhibiting the germination of *P. gounellei* subsp. *gounellei*. With that in mind, should avoid the cactus seed sowing in places where it has a large population of *M. suaveolens*.

**KEYWORDS:** *Hyptis suaveolens*; Terpene; Allelochemical; Caatinga.

## 1 | INTRODUCTION

Allelopathy is a phenomenon in which certain plant species produce substances that act favorably or unfavorably in the development of other species (RICE, 2012). From species that are produced have allelochemicals herbicides which are used in agriculture for the control of weeds (SODAEIZADEH et al., 2010). However, in reforestation programs, these compounds may be a problem, as they may delay the germination of other species (HUANG et al., 2013). Thus, it is important to know the plants that have allelopathic action and that may interfere in the development of plants used in reforestation, so that the cultivation of these plants in nearby areas is avoided (BEZERRA et al., 2018).

The allelopathic action is derived from the secondary metabolisms of plants, and may belong to the group of terpenes, phenolic compounds or nitrogen compounds (RICE, 2012). In the case of terpenes, the main allelopathic agents, also called allelochemicals, are the essential oils, which are complex mixtures of mono- and sesquiterpenes. These can be released into the environment by volatilization and decomposition, in a way that affects the surrounding vegetation (BEZERRA et al., 2017; OOTANI et al., 2017).

Among the plants of the Caatinga, a seasonally dry tropical forest in Brazil, which are being used in reforestation, we can mention the representatives of the Cactaceae family due to their great importance to the local fauna during the dry season, as well as the use of their representatives in forage (GOMES et al., 2016) . One species of this family *Pilosocereus*

*gounellei* (F.A.C.Weber) Byles & Rowley subsp. *gounellei*, is an endemic cactus of Brazil popularly known as “xique-xique”, is important for fauna and is highlighted by its fruits and flowers participating in the energy chain (GOMES et al., 2017) (Figure 1).



Figure 1 – Highlighted of mature fruit of *Pilosocereus gounellei* subsp. *gounellei*.

In the field, as well as the cactus *Cereus jamacaru* DC subsp. *Jamacaru* (BEZERRA et al., 2018), it is observed that the species *P. gounellei* subsp. *gounellei* does not occur frequently in the same place as some weeds of allelopathic potential. Among these species is *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze, an herbaceous plant known as “bamburral” and “lavender-brava” belonging to the Lamiaceae family (AFREEN et al., 2017; SHARMA et al., 2019). The representatives of this species are used in folk medicine for the treatment of several diseases, among them the treatment of respiratory diseases, this is due to the presence of the essential oil present in the leaves of the species (BEZERRA et al., 2017; ROQUE et al., 2010).

It has been demonstrated that the presence of *M. suaveolens* in an environment causes a negative impact on the vegetation, in a way that reduces the number of species occurring in that place, diversity, richness and uniformity (SHARMA et al., 2009; SHARMA et al., 2017). In this way, the allelopathy of the species can contribute with this, since it presents allelopathic action in the *C. jamacaru* cactus (BEZERRA et al., 2018).

Considering these aspects it is important to investigate whether the above-mentioned annual plant may interfere with *P. gounellei* subsp. *gounellei* reforestation programs, with the purpose of this research was to evaluate the *M. suaveolens* essential oil allelopathy on the germination of *P. gounellei* subsp. *gounellei*.

## 2 | METHODOLOGY

### 2.1 Plant Material

The mature fruits of *P. gounellei* subsp. *gounellei* were collected in a preserved Caatinga area, in the municipality of Quixelô - CE, with coordinates of Lat: -6°21'5.396 ", Long: -39°27'1.424 " and altitude of 245 m, in the period of June 2016. The fruits were pulped to obtain the seeds. After obtaining the seeds, they were conditioned in glass bottles until the moment of the allelopathic tests. The material was identified by José Bezerra Weverton Almeida pressed and deposited in the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade Lima – HCDAL under voucher #13,623.

As for the leaves of *M. suaveolens*, these were collected in the morning (09:00 hrs) in March 2015 under coordinates of Lat: -6 ° 15'43.0056 ", Long: -39 ° 16'2.5926 " and altitude of 193 m of altitude. Fertile branches were treated according to the collection procedures, and later deposited in the same herbarium, under voucher #12.104.

### 2.2 Extraction of essential oil

The essential oil of *M. suaveolens* was extracted from dried leaves, submitted to hydrodistillation in Clevenger apparatus. After collection, the leaves were crushed into small pieces (150 g) and filled into a 1 L volumetric flask, where 2 L of distilled water was added. The flask was coupled to the Clevenger apparatus under the heating mantle and the temperature adjustment was carried out until the water boiled. After boiling, the 2 h time of the extraction cycle was started. At the end of each extractive cycle, the oil contained in the apparatus was collected with the aid of a pipette and stored in amber and refrigerated bottles. After extraction, sodium sulphate was used to remove the aqueous phase present in the essential oil (BEZERRA et al., 2017; MATOS, 2009).

### 2.3 Allelopathic activity of essential oil

The seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei* were first selected and immersed in 5% hypochlorite for five minutes, followed by washing under running water for the same time. Subsequently, the essential oil was diluted in 1% Dimethylsulfoxide (DMSO) to avoid interference with germination, and subsequently diluted in different concentrations (125 - 1000 µg/mL) to perform the allelopathic bioassays. All solutions were adjusted for pH, while osmolality levels were determined<sup>4</sup>.

The concentrations used in this study are based on the fact that *M. suaveolens* has an annual leaf fall of 3 tons of leaves per hectare, and as its oil has a yield of 0.153% of dry weight, it will have a ratio of about 459 µg of oil per mL of soil (BEZERRA et al., 2018).

The tests were performed in quadruplicatas with 25 seeds per unit, totaling 100 seeds per treatment. The seeds were distributed in Petri dishes lined with two sheets of germitest paper moistened with 3 mL of distilled water. Afterwards, the plates were packed in Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) chambers with 12-hour photoperiod at a constant temperature of

30 °C (MEIADO et al., 2016). The readings were performed every 24 hours for 7 days, where the seeds were considered as germinated when their rootlets had a size of 2 mm in length.

## 2.4 Variables analyzed

The percentage of germination (PG), germination speed index (GSI) according to Maguire's (WANG et al., 2009), and T50 were analyzed.

## 2.5 Statistical analysis

For the statistical analysis of the data, the mean ( $\pm$  standard deviation) was used and the GraphPadPrism 6 software was analyzed with one-way ANOVA analysis, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

# 3 | RESULTS

## 3.1 Chemical physical analysis

According to table 1, the essential oil of *M. suaveolens* showed a higher pressure proportional to the concentration. At 1000  $\mu\text{g/mL}$  the oil had a pressure of -0.404 MPa. As for the pH natural product presented as being basic.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	pH measured	Adjusted pH	Osmolarity (MPa)
125	9.61	6.89	-0.027
250	9.52	6.73	-0.074
500	9.25	7.18	-0.154
1000	4.68	6.87	-0.404

Table 1: Physicochemical parameters of *Mesosphaerum suaveolens* essential oil.

## 3.2 Percentage of germination

Concerning the percentage of germination of the cactus seeds under study, it is possible to observe that at concentrations  $\leq 500 \mu\text{g/mL}$ , the essential oil does not significantly affect the germination. However, at the highest concentration used in this study, 1000  $\mu\text{g/mL}$ , it was demonstrated that there was a negative allelopathic action of the oil, since only 51.25% of the seeds germinated, whereas in the control group 90% of the seeds had their germination effected (Figure 2).

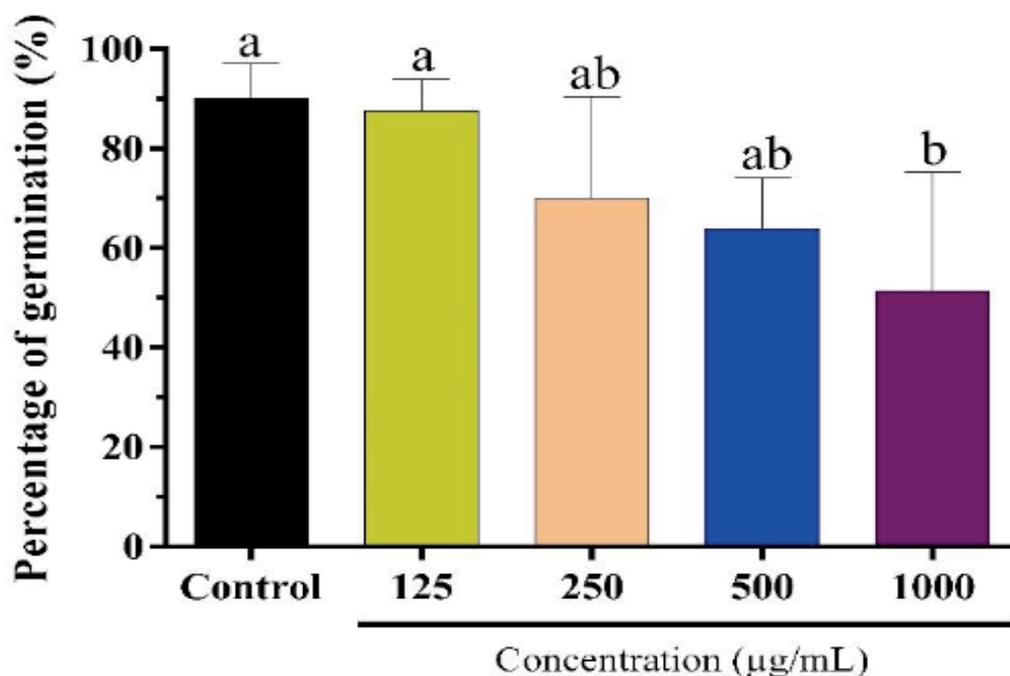


Figure 2 - Percentage of seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei* germinated in front of the OE of *M. suaveolens*. Bars with different letters differ statistically by the Tukey test at 5%.

### 3.3 Germination speed index (GSI) and T50

As regards the GSI, it was observed that, as well as the percentage of germination, only the concentration of 1000 µg/mL had an influence on the germination of the seeds. While the other concentrations did not differ statistically from the control group (Table 2). As for  $T_{50}$ , this index uses the number of seeds germinated in the treatment. From this, it calculates the time that 50% of these seeds took to germinate. In this way, it was demonstrated that the oil of *M. suaveolens* is not able to modify the time that the seeds took to germinate.

Concentration (µg/mL)	GSI	$T_{50}$ (days)
0 (Control)	3.76±0.31a	4.40±0.14a
125	3.86±0.30a	4.03±0.27a
250	2.90±0.88ab	4.43±0.12a
500	2.75±0.43ab	4.31±0.40a
1000	2.04±0.99b	4.64±0.59a

Means with different letters in the same column differ statistically by the Tukey test at 5%.

Table 2: Germination Speed Index (GSI) and T50 of the seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei* front to the OE of *M. suaveolens*.

## 4 | DISCUSSION

The terpenes present in the leaves of *M. suaveolens* have a negative allelopathic effect on the seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei*, this may be related to the action of the main constituents of this oil, which was already characterized in the study by Bezerra et al (2017). As the main constituents are β-Caryophyllene (18.57%), the sabinene (15.99%) and

spathulenol (11.09%), in the case of the former, it is an important volatile sesquiterpene and is also an allelochemical that influences the growth of neighboring plants (WANG et al., 2009).

The oils' allelopathic effects may be due to the action of the major constituents or by a synergism from all or some of the EO's chemical constituents (SIMÕES et al., 2017). The EO's allelochemical mechanisms of action are varied and may have effects similar to those from flavonoids, which may act as ion channel regulators involved in oxidative phosphorylation or may close these channels, thus preventing ions from flowing through the cytoplasmic membrane. In addition, when these constituents are in high concentrations in the intracellular medium, they may hyperpolarize such membranes, altering ATP pump functioning and, consequently, preventing germination (MARTINO et al., 2012).

In addition to the terpenes, it was shown that *M. suaveolens* leachates exhibit allelopathic action, as in the study by Maiti et al (2015), which demonstrated that the leachate inhibited the germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Among the constituents which are present in weed species studied, there is a diterpene suaveolic acid (ISLAM et al., 2014). This diterpene can liberate itself in the environment along with other terpenes by means of the decomposition of its aerial parts and to cause allelopathy in other species, in a way that will affect the structure of the environment (AFREEN et al., 2017).

Bezerra et al. (2018) demonstrated that weed oil is able to inhibit and retard the germination at concentrations  $\geq 125$   $\mu\text{g/mL}$  of cactus seeds of *Cereus jamacaru* subsp. *jamacaru*, an endemic cactus of Brazil, so that the action of this weed species can bring several damages to this taxon of great importance in the Brazilian Northeast.

## 5 | CONCLUSION

Thus, it is evidenced that the essential oil of *M. suaveolens* is able to retard the germination and inhibit the germination of the seeds of *P. gounellei* subsp. *gounellei*. With this in mind, one should avoid sowing cactus seeds in places where there is a large population of *M. suaveolens*.

## REFERENCES

- AFREEN, T.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, H.; SINGH, J. S. **Effect of invasion by *Hyptis suaveolens* on plant diversity and selected soil properties of a constructed tropical grassland**. Journal of Plant Ecology, v. 11, n. 5, p. 751-760, 2018.
- BEZERRA, J. W. A.; COSTA, A. R.; SILVA, M. A. P.; ROCHA, M. I.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J. B. T.; BARROS, L. M.; KAMDEM, J. P. **Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina***. South African Journal of Botany, v. 113, p. 437-442, 2017.
- BEZERRA, J. W. A.; SANTOS, M. A. F.; MEIADO, M. V.; LINHARES, K. V.; BOLIGON, A. A.; LEANDRO, C. S.; RODRIGUES, M. D. P.; SILVA, A. K. F.; SILVA, D. L.; BEZERRA, J. S.; SILVA, V. B.; SILVA, M. A. P. **Allelopathy of Aromatic Species on the Germination of *Cereus jamacaru* DC. subsp. *jamacaru* (Cactaceae)**. Journal of Agricultural Science, v. 10, p. 337-348, 2018.

- GOMES, V. G. N.; MEIADO, M. V.; QUIRINO, Z. G. M.; ARAUJO, H. F. P.; MACHADO, I. C. **Synchronous fruiting and common seed dispersers of two endemic columnar cacti in the Caatinga, a dry forest in Brazil.** *Plant ecology*, v. 218, n. 11-12, p. 1325-1338, 2017.
- GOMES, V. G. N.; MEIADO, M. V.; QUIRINO, Z. G. M.; MACHADO, I. C. **Seed removal by lizards and effect of gut passage on germination in a columnar cactus of the Caatinga, a tropical dry forest in Brazil.** *Journal of arid environments*, v. 135, p. 85-89, 2016.
- HUANG, W.; HU, T.; CHEN, H.; WANG, Q.; HU, H.; TU, L.; JING, L. **Impact of decomposing *Cinnamomum septentrionale* leaf litter on the growth of *Eucalyptus grandis* saplings.** *Plant physiology and biochemistry*, v. 70, p. 411-417, 2013.
- ISLAM, A. K. M.; OHNO, O.; SUENAGA, K.; KATO-NOGUCHI, H. **Suaveolic acid: A potent phytotoxic substance of *Hyptis suaveolens*.** *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- MAITI, P.; BHAKAT, R. K.; JHA, Y.; BHATTACHARJEE, A. **Allelopathic potential of *Hyptis suaveolens* on physio-biochemical changes of mung bean seeds.** *Communications*, v. 5, n. 3-4, p. 67-75, 2015.
- MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R. P.; ALMEIDA, L. F. R.; FEO, V. **In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids.** *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 5, p. 5406-5419, 2012.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC; 2009.
- MEIADO, M. V.; ROJAS-ARÉCHIGA, M.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; LEAL, I. R. **Effects of light and temperature on seed germination of cacti of Brazilian ecosystems.** *Plant Species Biology*, v. 31, n. 2, p. 87-97, 2016.
- OOTANI, M. A.; REIS, M. R.; CANGUSSU, A. S. R.; CAPONE, A.; FIDELIS, R. R.; OLIVEIRA, W.; BARROS, H. B.; PORTELLA, A. C. F.; AGUIAR, R. S.; SANTOS, W. F. **Phytotoxic effects of essential oils in controlling weed species *Digitaria horizontalis* and *Cenchrus echinatus*.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 12, p. 59-65, 2017.
- RICE, E. L. **Allelopathy.** Academic press, 2012.
- ROQUE, A. D. A.; ROCHA, R. D. M.; LOIOLA, M. I. B. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil).** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.
- SHARMA, A.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; JARYAN, V.; KOHLI, R. K. **The impact of invasive *Hyptis suaveolens* on the floristic composition of the periurban ecosystems of Chandigarh, northwestern India.** *Flora*, v. 233, p. 156-162, 2017.
- SHARMA, A.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. **Chemical profiling, cytotoxicity and phytotoxicity of foliar volatiles of *Hyptis suaveolens*.** *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 171, p. 863-870, 2019.
- SHARMA, G. P.; RAIZADA, P.; RAGHUBANSHI, A. S. ***Hyptis suaveolens*: An emerging invader of Vindhyan plateau, India.** *Weed biology and management*, v. 9, n. 3, p. 185-191, 2009.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento.** 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
- SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; VAN DAMME, P. **Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L., and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil.** *Industrial Crops and Products*, v. 31, n. 2, p. 385-394, 2010.

WANG, R.; PENG, S.; ZENG, R.; DING, L. W.; XU, Z. F. **Cloning, expression and wounding induction of  $\beta$ -caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* HBK and allelopathic potential of  $\beta$ -caryophyllene.** *Allelopathy J*, v. 24, p. 35-44, 2009.

## CONHECIMENTO TRADICIONAL DE MICROARTRÓPODES EM UMA COMUNIDADE RURAL DA CAATINGA

Data de submissão: 15/05/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### **Francisco Éder Rodrigues de Oliveira**

Universidade Estadual do Ceará - UECE,  
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI  
Iguatu – Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/7114898055139766>

### **Mikael Alves de Castro**

Universidade Estadual do Ceará - UECE,  
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI  
Iguatu – Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/7376147239040908>

### **Marlos Dellan de Souza Almeida**

Universidade Federal Rural de Pernambuco -  
UFRPE  
Recife - Pernambuco

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/6584944075950770>

### **Célio Moura Neto**

Universidade Estadual do Ceará - UECE,  
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI, Departamento do curso de  
Ciências Biológicas  
Iguatu – Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/6536186677259292>

### **Helba Araújo de Queiroz Palácio**

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Ceará – IFCE  
Iguatu - Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/1342025407561435>

### **Jefferson Thiago Souza**

Universidade Estadual do Ceará - UECE,  
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI, Departamento do curso de  
Ciências Biológicas  
Iguatu – Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/5589855068988374>

**RESUMO:** A relação do homem do campo com a fauna do solo está diretamente ligada pelo uso das áreas agrícolas explorada por ambos. O objetivo do presente estudo é identificar o conhecimento tradicional de uma comunidade rural sobre aspectos ecológicos de microartrópodes de solo e do manejo do solo. O estudo foi realizado junto a moradores da comunidade do sítio Itans, onde foram aplicados questionários semiestruturados com perguntas abertas e fechadas sobre a percepção e relação direta e indireta com os microartrópodes do solo. A tabulação dos dados ocorreu com auxílio de tabelas dinâmicas na plataforma eletrônica do excel, sendo posteriormente confeccionados gráficos para melhor discussão dos dados. A

pesquisa Etnoecologia no Sítio Itans mostrou o conhecimento tradicional dos moradores sobre microartrópodes do solo e sua relação direta com esses animais. Verificou-se que para os entrevistados a maior parte dos animais relatados prejudicam a lavoura. Com isso, justifica-se a reação dos mesmos em eliminar esses animais de forma mecânica e com o uso de produtos químicos indústrias. A visão dos moradores em relação à quantidade de indivíduos e diversidade de microartrópodes é que a lavoura se sobressai sobre a mata nativa. O manejo adotado proporciona uma variação na composição e quantificação de microartrópodes do solo, conforme a percepção dos moradores entrevistados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Etnologia Agrícola, Conhecimento rurícola, Fauna do solo.

## TRADITIONAL KNOWLEDGE OF MICROARTHROPODS IN A RURAL COMMUNITY OF CAATINGA

**ABSTRACT:** The relationship of the rural man with the soil fauna is directly linked by the use of agricultural areas explored by both. The aim of the present study is to identify the traditional knowledge of a rural community on ecological aspects of soil microarthropods and soil management. The study was carried out with residents of the Itans community, where semi-structured questionnaires were applied with open and closed questions about the perception and direct and indirect relationship with soil microarthropods. The tabulation of the data occurred with the aid of dynamic tables in the electronic platform of excel, and later graphs were made for better discussion of the data. The Ethnoecology research at Sítio Itans showed the traditional knowledge of residents about soil microarthropods and their direct relationship with these animals. It was found that, for the interviewees, most of the animals reported damage the crop. Thus, their reaction to eliminate these animals mechanically and with the use of chemical products in industries is justified. The residents' view regarding the number of individuals and the diversity of microarthropods is that the crop stands out over the native forest. The adopted management provides a variation in the composition and quantification of soil microarthropods, according to the perception of the interviewed residents.

**KEYWORDS:** Agricultural Ethnology, Rural knowledge, Soil fauna.

## 1 | INTRODUÇÃO

O relacionamento entre agricultor e fauna do solo está diretamente ligado ao uso da terra e seu manejo na agricultura tradicional que utiliza práticas não conservacionistas de manejo do solo (FALCÃO, 2019), influenciando no conhecimento dos mesmos sobre esses animais. Desse modo a maior parte da microfauna, mesofauna e macrofauna do solo, são tidos como pragas que afetam de forma negativa as lavouras e pecuárias trazendo prejuízos incalculáveis para as áreas dos agricultores. Animais da macrofauna como formigas e cupins estão entre os mais rejeitados pelos produtores, pois esses grupos, em muitos casos se alimentam das lavouras dos agricultores, enquanto que as minhocas são tidas

como auxiliadoras das lavouras por fazerem a aeração do solo através de suas galerias (SCHIAVON et al., 2015).

A interação dos agricultores com a fauna do solo é fonte de estudo para ciências como etnobiologia, etnozologia, etnoecologia, que de forma geral tenta entender a relação do homem com o meio onde ele está inserido. Contudo, ao explorar a inter-relação do meio natural, cultural, crenças e os meios sociais dos agricultores, pode-se ver que a etnoecologia “tem um valor substancial para esclarecer as maneiras pelas quais os membros dos grupos culturais conceituam os ecossistemas dos quais são dependentes para a própria sobrevivência” (ROSA & OREY, 2014). Conforme Prado e Murrieta (2015), diversas discussões no âmbito científico tem buscado a “dicotomia natureza/cultura”, visando interpretar a relação do homem com o meio ambiente.

Essa relação do homem do campo com a natureza, dando enfoque aos microartrópodes do solo, tem sido repassada de forma tradicional de pais para filhos no decorrer dos séculos, junto com a forma de cultivar a terra e cuidar dos animais. Contudo, com o surgimento de novas tecnologias, manejos culturais, métodos alternativos de plantio que visam o uso sustentável dos recursos naturais, além de estudos que comprovam a importância dos microartrópodes para a qualidade do solo, tem levado algumas comunidades rurais a modificarem sua relação com a natureza, realizando práticas de solos mais conservacionistas, que melhoram as estruturas químicas, físicas e biológicas do solo (TOLEDO & BARRERA-BASSOLS, 2009; DIAS & MOTA, 2015).

A conservação da biodiversidade, no caso do Bioma Caatinga, está ligada diretamente à forma como as populações locais tratam os recursos naturais que estão ao seu acesso. Essa relação geralmente é replicada pelos filhos ao verem seus pais interagindo com a natureza em busca de sua sobrevivência (TOLEDO & BARRERA-BASSOLS, 2009). Com isso, a Etnoecologia junto a Etnobiologia, tentam explicar os motivos que levam certas atitudes a serem realizadas dentro das comunidades pelos moradores, que em muitos casos prejudicam de forma direta a diversidade local. Tais ações são justificadas pelos costumes e tradições locais, que são repassadas ao decorrer dos anos pelos moradores mais velhos, onde estes saberes populares se perpetuam durante anos dentro da comunidade (OLIVEIRA, 2008).

Com isso, o objetivo do presente estudo foi identificar o conhecimento tradicional de uma comunidade rural sobre aspectos ecológicos de microartrópodes de solo e do manejo do solo, além de entender a relação entre a percepção local sobre microartrópodes do solo encontrados nas áreas de plantio.

## **2 | METODOLOGIA**

### **2.1 Local do estudo**

O estudo que corresponde à observação etnobiológica foi realizado na comunidade rural denominada de Sítio Itans, localizada a aproximadamente 7 km de distância da sede

do município de Iguatu-CE (06°21'34"S e 39°17'55"W). A comunidade margeia o Rio Jaguaribe em seu lado Sul, que durante o período chuvoso serve de fonte de renda pela pesca e área de lazer com banho em seu leito. O Sítio Itans faz divisas em suas extremidades com a Vila Cajazeiras e o Sítio Gadelha, para onde os moradores se deslocam à procura de atendimento médico, esperar transportes de linha e fazer compras periódicas. Na comunidade residem aproximadamente 84 famílias, que retiram sua renda da agricultura, auxílios governamentais, prestação de serviços no comércio e/ou indústria no município de Iguatu, ou desenvolvem atividades remuneradas em regime formal e/ou informal no Instituto Federal de Iguatu.

O Sítio Itans tem características geográficas de relevo plano, com solos férteis, vegetação nativa arbustiva e disponibilidade hídrica de fácil acesso por sua proximidade ao rio Jaguaribe. Devido à localidade dispor de tais vantagens, parte de sua extensão corresponde a áreas agricultáveis com culturas de sequeiro (milho e feijão), fruteiras (banana, coqueiro), capineiras (espontânea e exótica), e criação de bovinos (vacas leiteiras e gado de corte). Existe na comunidade um parque de vaquejada e balneários privados, uma associação de moradores com aproximadamente oitenta e oito sócios e uma Igreja Cristã (Católica), onde os moradores se reúnem para expressar sua fé.

## 2.2 Coleta e análise dos dados

A pesquisa etnoecológica levou em consideração o conhecimento popular e a interação dos moradores rurais com os recursos naturais utilizados nas áreas de plantio, além da relação direta e indireta dos produtores com a fauna do solo em suas áreas de cultivo. A abordagem descritiva quantitativa usou pesquisa in loco. Inicialmente realizou-se uma participação na reunião dos moradores da associação para apresentar o projeto e integrar a comunidade ao assunto estudado, além de estabelecer um diálogo junto aos moradores da comunidade. No segundo momento a pesquisa foi feita de forma individual com um grupo amostral de 15 agricultores, utilizando questionários com perguntas objetivas e subjetivas sobre a percepção e relação dos produtores com os microartrópodes do solo presentes em suas áreas. A todos os entrevistados foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE de que trata a resolução 466/2012, garantindo sigilo à identidade dos participantes.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Conhecimento dos moradores do sítio Itans sobre microartrópodes do solo

A entrevista buscou registrar o conhecimento que os moradores tinham sobre animais do solo, bem como, entender quais as relações que estes exercem com os microartrópodes. Dessa forma, foi possível verificar a interação que os agricultores exercem tanto na comunidade como em suas lavouras. Ao quantificar as espécies de animais conhecidas pelos moradores (Figura 1), notou-se que há uma variação, em que uns citaram diversas espécies, enquanto

outros foram mais sucintos ao responder. Nota-se que apenas um morador (E10) abrangeu de forma mais elaborada a sua resposta, sendo os demais mais simplórios em suas falas.

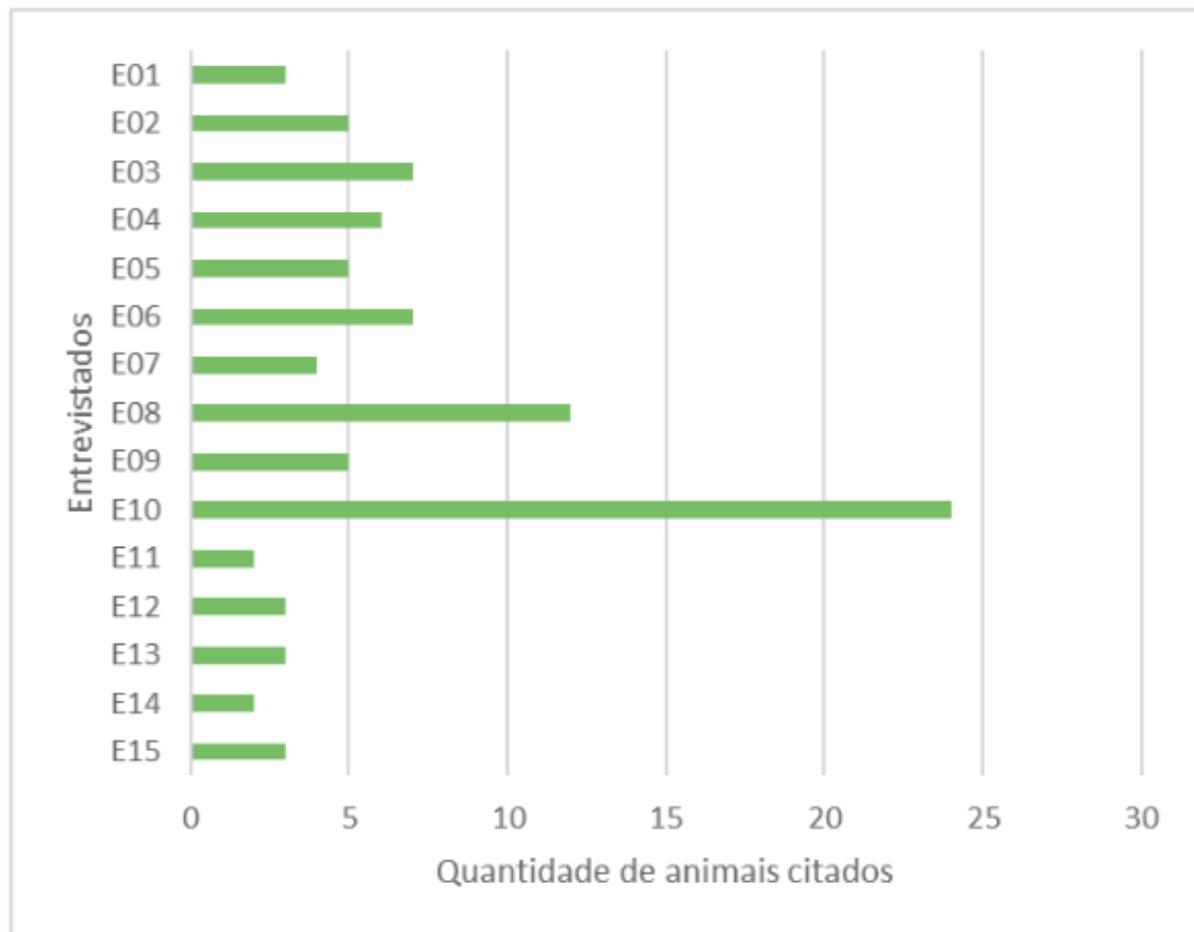


FIGURA 1: Quantidade de espécies citadas pelos moradores da comunidade Sítio Itans, Iguatu-CE.

Contudo, as experiências vividas pelos agricultores em suas áreas, mesmo com todas as dificuldades, proporcionaram um conhecimento empírico das mais diversas espécies de animais e vegetais presentes na comunidade, mas tal conhecimento vai sendo adquirido no decorrer dos anos que eles vão convivendo com essa biodiversidade. A quantificação desse conhecimento pode variar entres as pessoas, isso pode ser visto nos resultados da (Figura 1), o que pode estar também relacionado ao período de tempo que o mesmo reside na comunidade e/ou a sua atuação profissional.

As informações fornecidas pelos moradores sobre os animais nocivos e benéficos ao solo dentre os que eles conheciam, demonstram que as formigas e as minhocas, seguidas das aranhas e abelhas são considerados os que mais trazem benefícios ao solo (Figura 2).

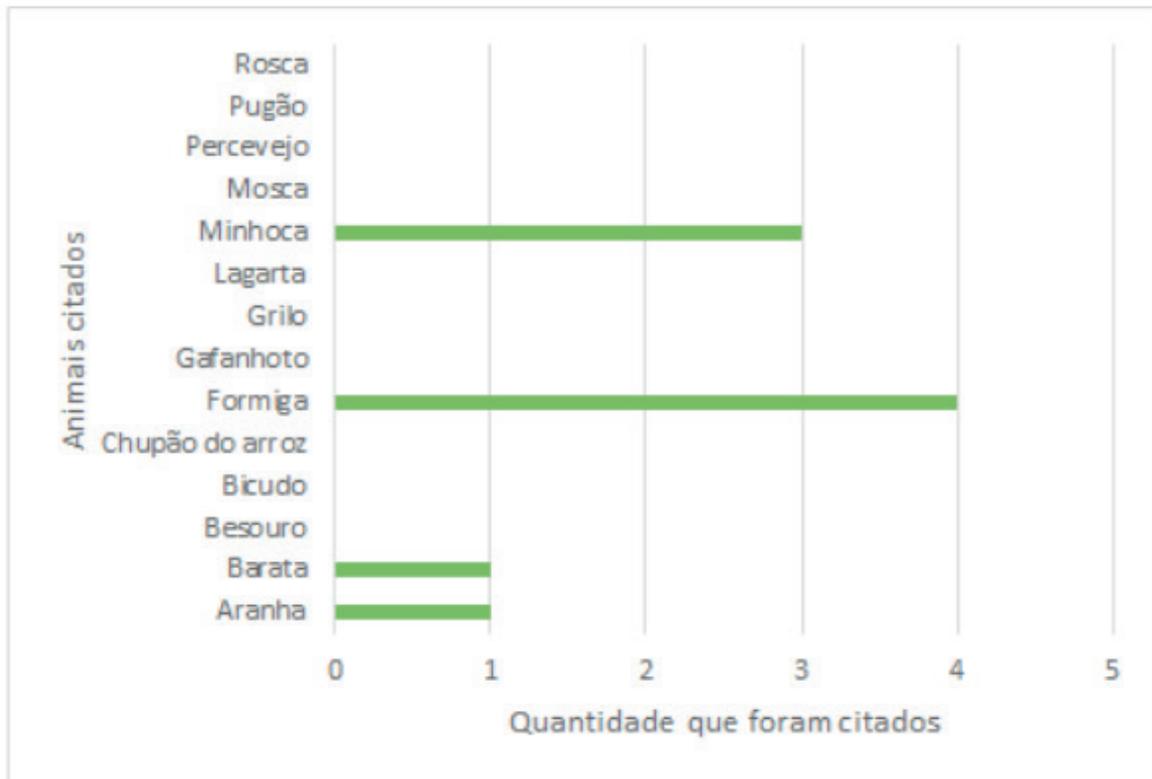


FIGURA 2: Animais que beneficiam o solo das lavouras segundo os moradores da comunidade Itans, Iguatu-CE.

A visão dos agricultores sobre os animais presentes no solo de suas lavouras é bastante irregular, pois há quem acredite que esses animais não têm uma função ecológica para o equilíbrio da biodiversidade e que eles só trarão prejuízos ao solo e às plantações. Contudo, podemos encontrar produtores que defendem que alguns animais trazem benefícios relevantes às estruturas físicas, químicas e biológicas do solo, além de auxiliarem na maior produção agrícola (WINK et al., 2005).

No entanto há outros animais citados como não benéficos (Figura 3). Ao analisar as Figuras 2 e 3, vale salientar que houve algumas controvérsias sobre as funções ecológicas desses animais no solo, nota-se que para os entrevistados, há um número maior de animais que prejudicam o solo, podendo ser explicado pelo fato dos mesmos, apenas notarem que alguns animais são tidos como pragas das lavouras no período do plantio.

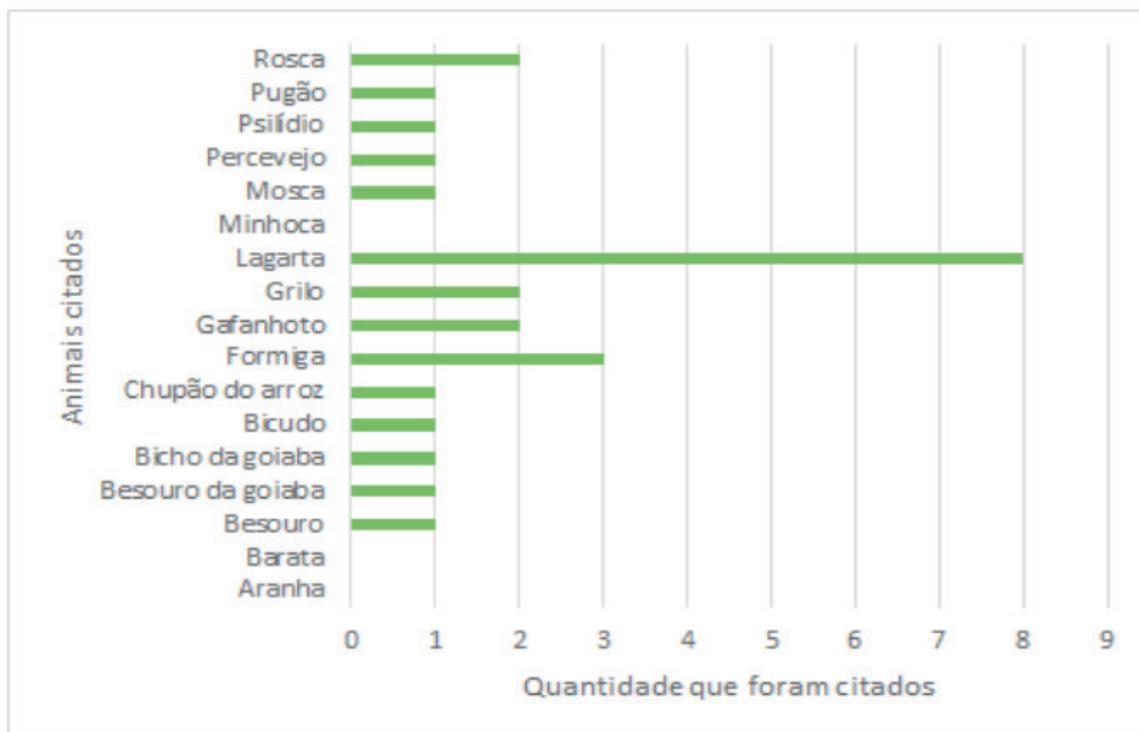


FIGURA 3: Animais que prejudicam o solo na área de plantio segundo os moradores da comunidade Itans, Iguatu/ CE.

A lista de animais citados como prejudiciais ao solo é maior que a de animais que auxiliam. Nota-se que para alguns, a formiga tanto ajuda como pode danificar o solo (Figura 3), sendo a lagarta o animal que mais prejudica o solo, onde dos 15 pesquisados, oito pessoas acreditam que a mesma não traz benefícios ao solo. Animais como grilos e gafanhotos, geralmente conhecidos pelas pessoas que vivem nas comunidades rurais por atrapalharem a roça, também foram citados pelos entrevistados. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos realizados com o cultivo de berinjela, onde grilos atacaram a plantação e não foi possível manter o controle desses indivíduos (JUNQUEIRA, 2013).

Outra pergunta feita aos moradores foi com relação aos animais que os mesmos conseguiram observar nas lavouras. Entre os animais citados, grande parte são dos grupos dos insetos e aracnídeos e até animais vertebrados como cobra. A ordem dos coleópteros foi a mais citada, onde maior parte dos entrevistados relatou já ter visto besouros nas áreas de cultivo, seguidos das lacraias que pertencem à ordem Scolopendromorpha e as caranguejeiras da ordem araneae. Entretanto, vários outros animais também foram citados, como a mosca, formiga, barata, etc. (FIGURA 4).

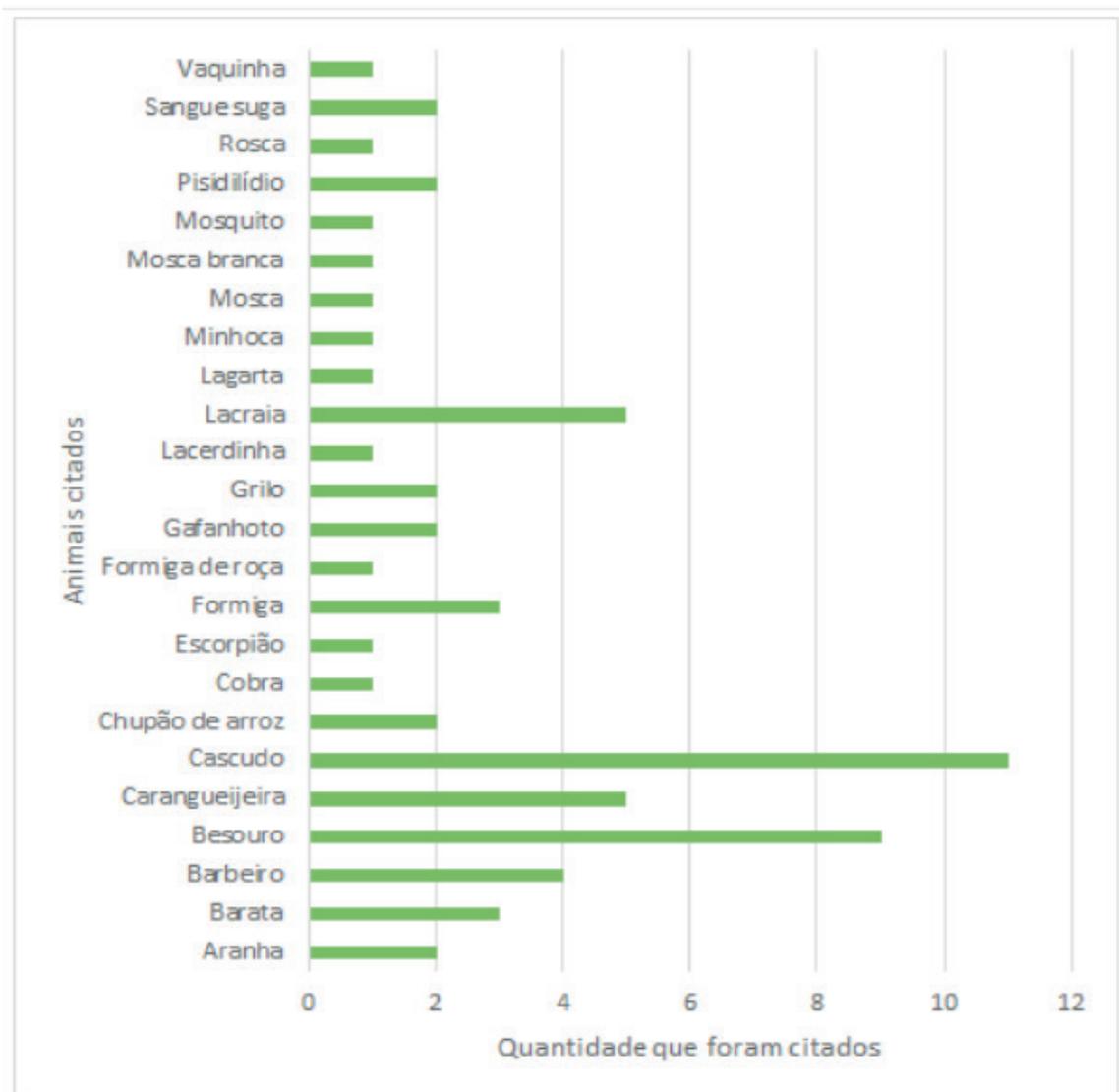


FIGURA 4: Animais vistos na lavoura conforme os moradores da comunidade Itans, Iguatu/CE

A lagarta é considerada a principal praga na comunidade pelo fato desta se alimentar das culturas de sequeiro (milho e feijão) que os agricultores cultivam em suas lavouras no início do inverno, período que algumas espécies de borboletas e mariposas põem seus ovos. Enquanto que a minhoca é conhecida por auxiliar o solo fazendo degradação da matéria orgânica, a liberação dos nutrientes e adubação (AQUINO, 1992; HENDRIX et al., 2006; SANTOS, 2016) Contudo, percebe-se que ao responderem quais animais podem ser vistos nas lavouras, um número maior de pessoas respondeu que foi o besouro (Figura 4), esse resultado pode estar ligado ao fato que muitas pessoas relacionam a imagem de muitos insetos vistos no solo com a ordem dos coleópteros. A classificação de animais de grupos distintos a um mesmo grupo taxonômico por moradores da comunidade rurais é bastante comum, como o agrupamento de animais como crustáceos terrestres, oligoquetas e aracnídeos ao grupo de insetos (SOUZA, 2007), o agrupamento desses animais a uma mesma categoria zoológica pode estar interligada a cultura e conhecimento tradicional da população local.

A reação dos pesquisados ao verem os animais no solo varia entre os mesmos, sendo que a principal reação é a de eliminá-los, para que os mesmos não prejudiquem a lavoura

conforme relatado (Figura 5). Dentre as principais maneiras de eliminar esses animais, os mesmos comentaram que o fazem com veneno ou mecanicamente com objetos presentes nas lavouras como pedra, paus e/ou calçados. Dependendo dos animais vistos nas áreas, alguns pesquisados relataram que não matam, pois os mesmos não trazem danos à lavoura, ou relataram ainda, que estes têm o direito de viver.

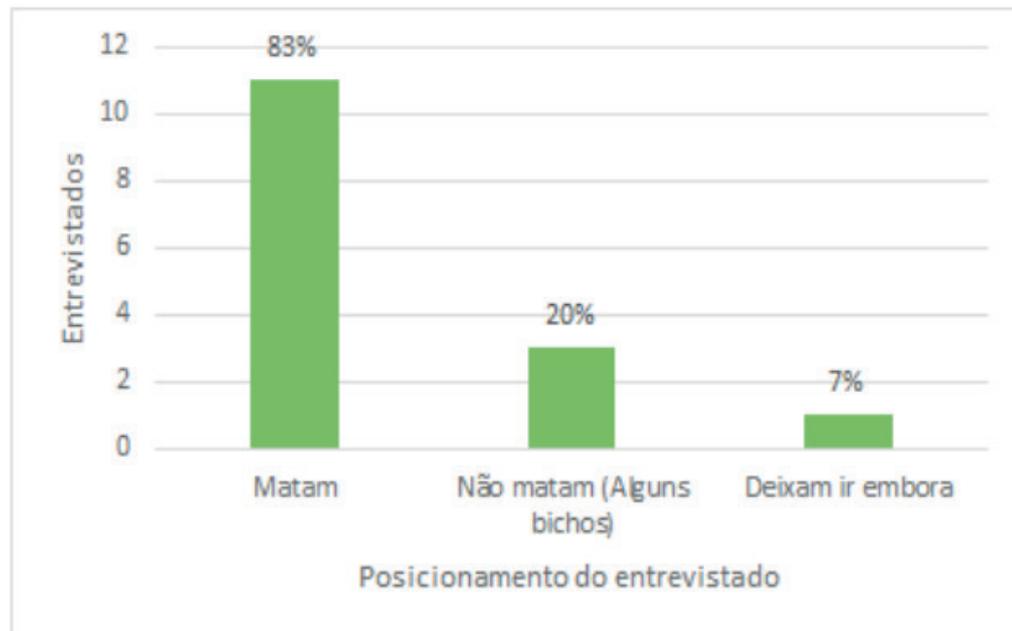


FIGURA 5: Reação dos moradores da comunidade Itans, Iguatu/CE ao encontrarem animais do solo nas lavouras.

Procurando avaliar a percepção da comunidade sobre conservação da natureza, foi questionado aos moradores quais animais do solo os mesmos conseguiram observar na mata antes de ser brocada. Os entrevistados relataram ter visto diversos animais, entre eles, animais vertebrados e invertebrados. Dos 18 animais relatados verifica-se que a lagarta, abelha, cobra e formigas, foram os mais observados (Figura 6). Nota-se também que os entrevistados disseram ter visto outros animais ao adentrar a mata, tendo em vista que muitos desses animais relatados não são animais que vivem no solo.

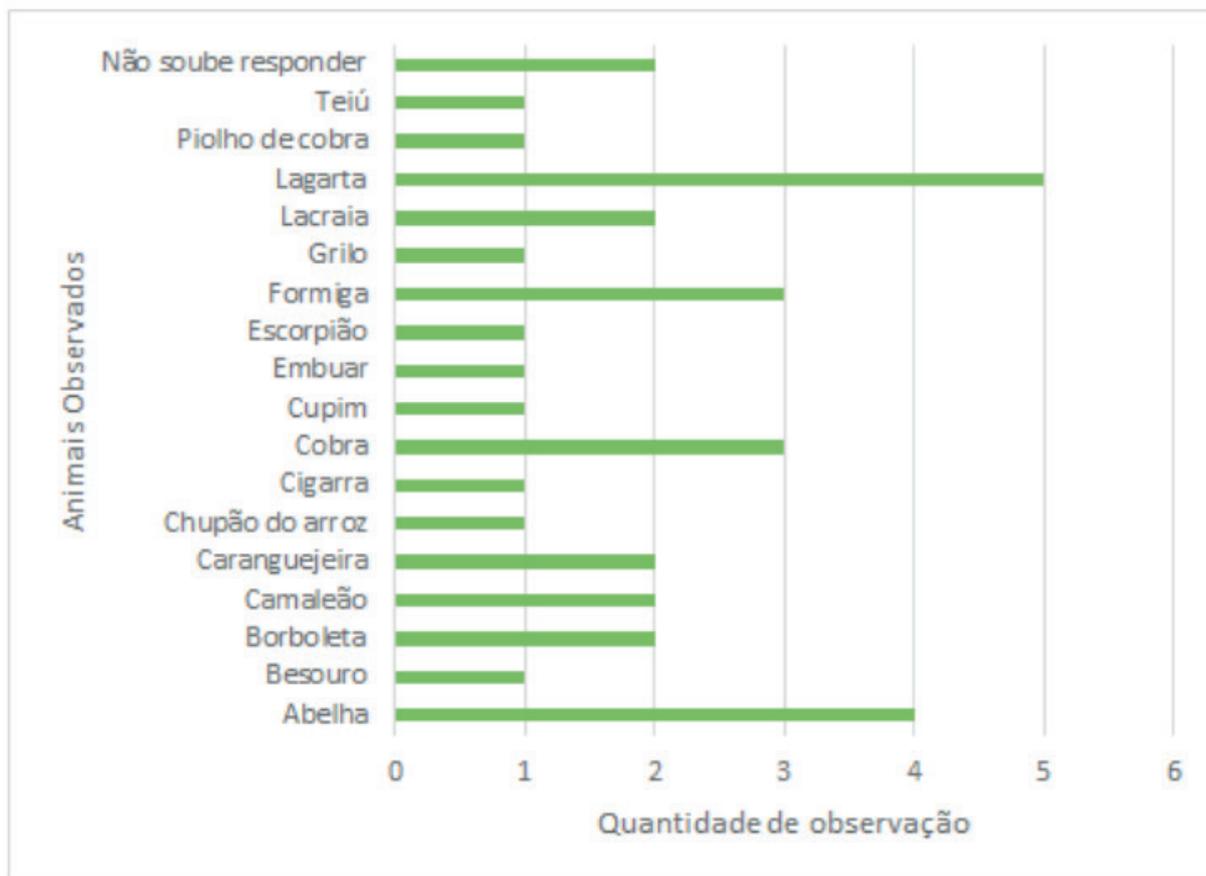


FIGURA 6: Animais observados pelos moradores da comunidade Itans, Iguatu/CE em área de mata conservada.

Em áreas de Caatinga com mata preservada, encontramos uma grande biodiversidade de organismos vivos que interagem entre si e fazem sucessões ecológicas que garantem a sobrevivência da comunidade biológica e o equilíbrio dos grupos de indivíduos que compõem tal comunidade. Em áreas de Caatinga antropizada a biodiversidade local é reduzida tornando o equilíbrio da comunidade local mais vulnerável a mudanças periódicas (NUNES et al., 2009).

Correlacionando com a pergunta acima que tratava sobre a reação dos entrevistados ao se depararem com estes animais e investigando se utilizavam algum tipo de produto químico industrial ou natural para combater esses animais, cerca de 73% (11) dos entrevistados relataram que ao verem esses animais na lavoura, fazem uso de produtos químicos industriais (inseticidas e pesticidas) para eliminá-los (Figura 7). Segundo Costa-Neto, (1999) citado por Jorge et al. (2014), os sentimentos de aversão e fobia a alguns tipos de animais, entre eles os insetos, levam pessoas a terem reações instantâneas de matá-los. Contudo, houve um entrevistado que relatou preservar esses animais em sua lavoura, pois acredita que toda biodiversidade tem o direito de viver, além de receber ajuda desses animais na fertilidade do solo.

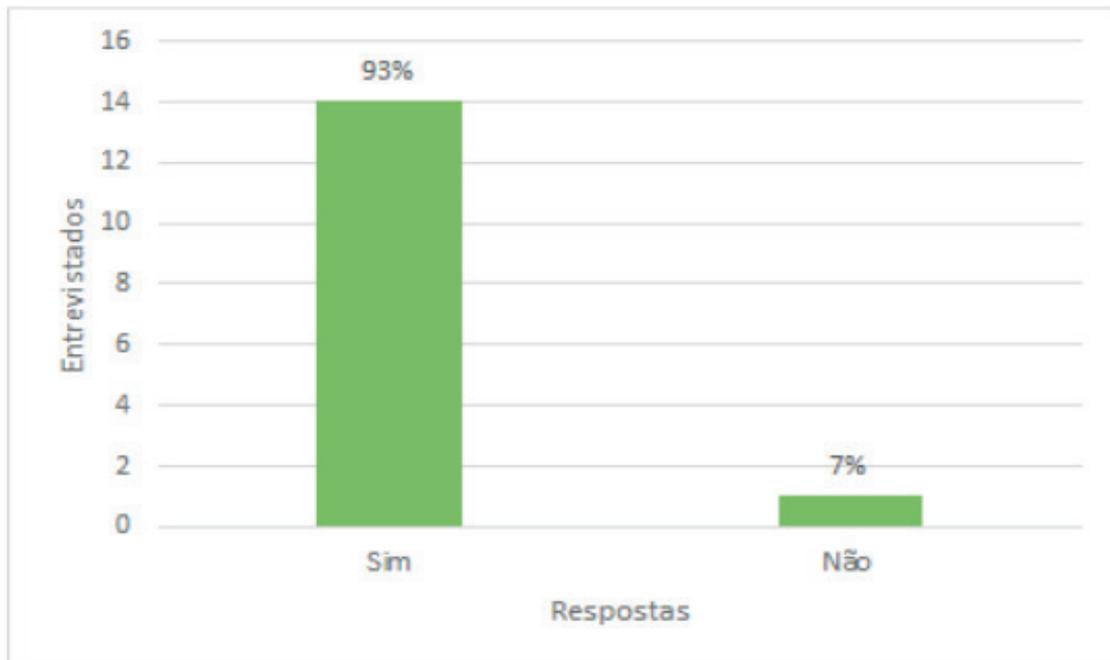


FIGURA 7: Utilização de produtos químicos no controle de pragas da lavoura.

Observou-se com os resultados que quase em sua totalidade as pessoas pesquisadas demonstraram utilizar veneno para combater os animais que eles disseram atrapalhar as lavouras (Figura 7). Para isso, o veneno utilizado por todos na lavoura são os químicos industriais, que os mesmos compram nas casas agronômicas presentes no município.

Assim como na floresta, diversos animais puderam ser vistos após a primeira broca da vegetação para implantação de culturas agrícolas e formação de pasto forrageiro para os animais (Figura 8). Muitos dos animais e vegetais antes vistos na floresta não compõem mais a biodiversidade das áreas que foram desmatadas e introduzidas novas espécies de vegetais.

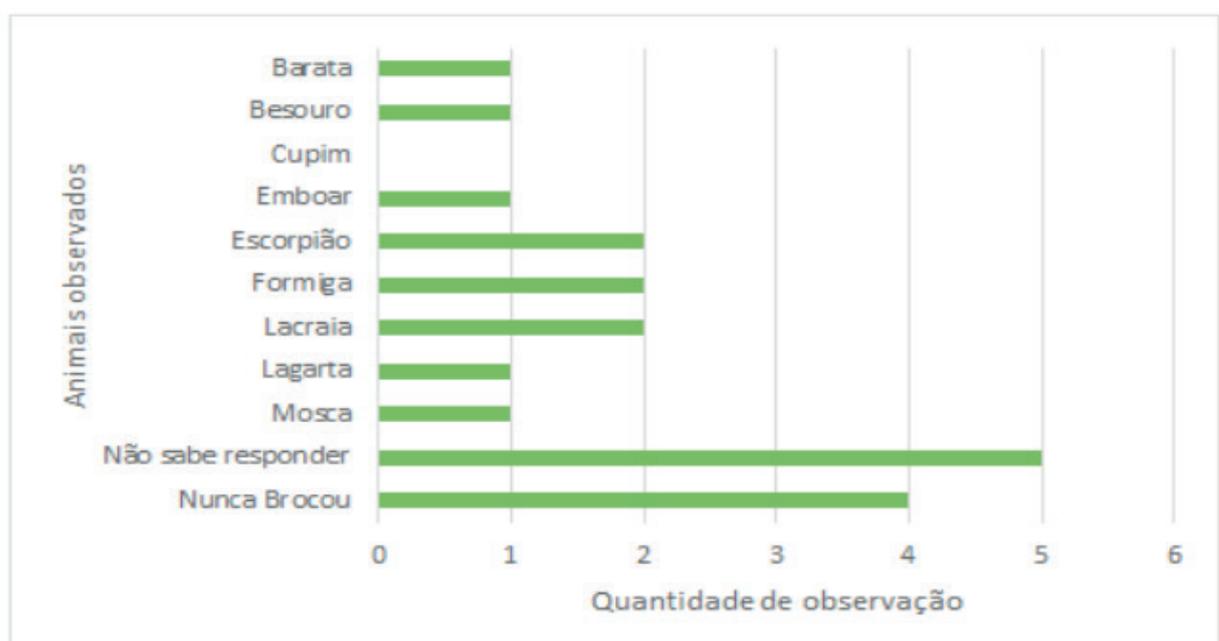


FIGURA 8: Animais observados pelos entrevistados na broca da mata.

Ao serem perguntados sobre quais animais foram vistos na área após a broca da mata, os mesmos relataram observarem algumas espécies de animais, dentre eles o escorpião, formiga, lacraia, como pode ver observado na (Figura 8). Verificou-se também que a maior parte deles relataram não saber e/ou nunca ter brocado a floresta, levando aos mesmos a não relatarem quais animais eles poderiam ver após a broca da mata.

Ao compararmos a diversidade de animais observada pelos agricultores na mata preservada e aos vistos na área de lavoura após a primeira broca, (Figura 6 e 8), percebermos uma redução no número desses animais descritos. Percebe-se que com a retirada da mata, a diversidade de animais torna-se mais imperceptível, predominando um grupo maior de espécies mais adaptadas ao local modificado. Córdova et al. (2009), verificou mudanças nas quantidades de espécies e volume de indivíduos da mesma espécie em locais de vegetação nativa e floresta de *Pinus* sp., de modo que pode ser verificado uma redução de espécies em locais de monocultura.

A percepção dos pesquisados sobre a quantidade de animais do solo que podem ser vistos, em relação aos observados na mata nativa, demonstra que a maior parte dos entrevistados observou que atualmente existe uma quantidade maior de animais na lavoura em relação à mesma área quando era mata nativa (Figura 9). Tal fato foi comentado por 80% das pessoas pesquisadas que justificaram verem mais pragas nas lavouras ao decorrer dos anos.

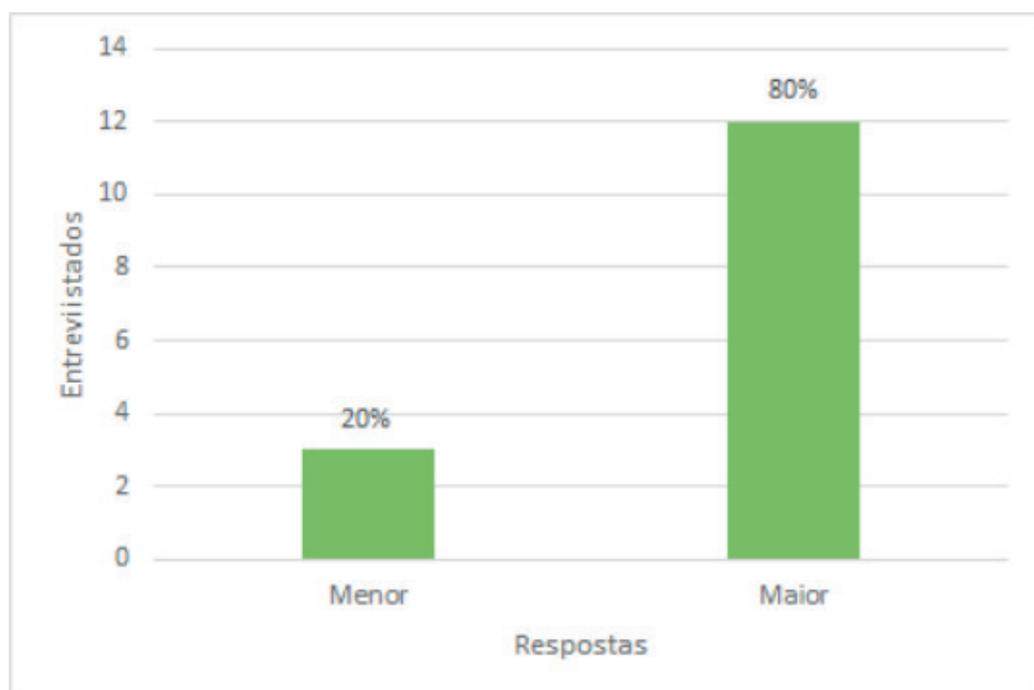


FIGURA 9: Percepção dos moradores da comunidade Itans, Iguatu/CE sobre a quantidade atual de animais.

A variedade de animais existentes nos dias atuais nas lavouras quando comparado à área no período que era mata nativa, foi outro ponto pesquisado junto aos moradores.

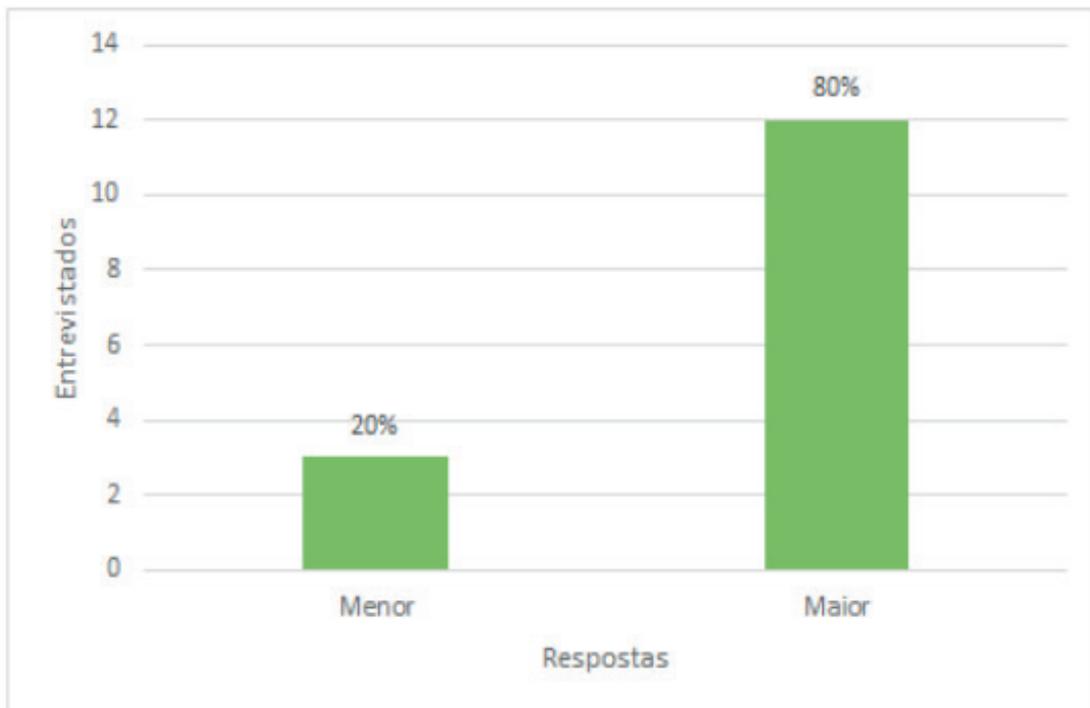


FIGURA 10: Percepção dos entrevistados sobre a diversidade de animais na lavoura nos dias atuais.

Conforme pode ser visto na Figura 10, maior parte dos entrevistados acreditam que atualmente existe uma diversidade maior de animais do solo nas lavouras quando comparado o período que na área era ocupada pela mata. E apenas 20% deles (3 pessoas) relataram acreditar que a variedade de animais nas áreas atuais de lavouras é menor que no período que a área possuía mata nativa.

O aumento periódico de herbivoria e predação das culturas comerciais faz com que os moradores de comunidades rurais acreditem que haja um número maior de animais nas áreas de plantio, em relação às áreas de Caatinga preservada. Essa percepção pode estar ligada à quantidade de indivíduos que podem ser vistos e dizem que as áreas antropizadas, utilizadas para o plantio de culturas comerciais. Nas (Figuras 9 e 10) mostra-se a visão dos moradores sobre a quantidade e diversidade de animais na atualidade. Nota-se que para a maior parte dos entrevistados, cerca de 80% (13), há uma quantidade maior de bichos nas lavouras nos dias atuais que em áreas preservada na Caatinga, entretanto, quando tratamos da diversidade de animais na atualidade, percebemos que cerca de 80% dos moradores também acreditam que a diversidade é maior nas lavouras que na mata. As interações ecológicas de predação e herbivoria nas lavouras por diversos animais (tidos como pragas) muitas vezes desconhecidos pelos moradores levam os mesmos a acreditar que há superioridade no número de espécies nas lavouras e que os animais das matas estão sendo totalmente extintos pela degradação da mata e uso excessivo de agroquímicos que estão dizimando os animais da mata como foi relatado pela moradora. Tal fato pode estar ligado à mudança na composição química causada pelos agrotóxicos (organoclorados) no solo aliado a temperatura externa que provocam toxicidade em espécies de microartrópodes (JEGEDE et al., 2017 citado por LOPES E ALBUQUERQUE, 2018).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento dos moradores da comunidade Itans sobre microartrópodes do solo está ligado à cultura, costumes e tradições que lhe foram repassados e adquiridos na localidade. O manejo adotado proporciona uma variação na composição e quantificação de microartrópodes do solo, conforme a percepção dos moradores pesquisados. A visão dos moradores do Sítio Itans sobre os microartrópodes do solo revela o pouco conhecimento sobre os mesmos.

O conhecimento empírico trazido por comunidades tradicionais sobre os animais que estão presentes no solo e que contribuem para a agricultura precisa ser registrado e compreendido, para que se pense em técnicas de conservação, uma vez que, os microartrópodes possuem um importante papel na manutenção e conservação das propriedades edáficas que podem contribuir para o melhoramento das plantações dos pequenos agricultores. Nesse sentido, as relações etnoecológicas com microartrópodes precisam ser abordadas em mais pesquisas acadêmicas, e assim estudos mais robustos são recomendados.

## REFERÊNCIAS

- AQUINO, A. M.; DE ALMEIDA, D. L.; DA SILVA, V. F.. **Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: Vermicompostagem**. Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 1992.
- CÓRDOVA, M.; CHAVES, C. L.; MANFREDI-COIMBRA, S.. **Fauna do solo x vegetação: estudo comparativo da diversidade edáfica em áreas de vegetação nativa e povoamentos de pinus sp.** Geoambiente On-line, n. 12, p. 01-12 pág., 2009.
- COSTA-NETO, E. M. A. **etnocategoria “inseto” e a hipótese da ambivalência entomoprojetiva**. Acta Biol. Leopold, n. 21, v.1, p.7-14. 1999.
- DIAS, O. A.; MOTA, N. D. **Percepção ambiental em comunidades rurais circundantes a uma Reserva Particular do Patrimônio Natural**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1153-1161, 2015.
- FALCÃO, Breno Marinho Leite et al. **A percepção do agricultor familiar sobre solos e agroecologia: estudo de caso em Boa Vista-PB**. 2019.
- HENDRIX, Paul F. et al. **Invasion of exotic earthworms into ecosystems inhabited by native earthworms**. In: Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species. Springer, Dordrecht. p. 87-100. 2006.
- JEGEDE, O. O.; OWOJORI, O. J. ; RÖMBKE, J. **Temperature influences the toxicity of deltamethrin, chlorpyrifos and dimethoate to the predatory mite Hypoaspis aculeifer (Acari) and the springtail Folsomia candida (Collembola)**. Ecotoxicol. Environ.Saf. [internet]. v. 140, n. 1, p. 214-221, 2017.
- JORGE, V. C.; SÁNCHEZ, D. C. M.; SOUZA, M. D. de.; PASA, M. C.; REZENDE, E. H. **Conhecimentos entomológicos pelos moradores do bairro verdão em Cuiabá – MT**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v.10, n.18; p. 2014.
- JUNQUEIRA, A. C.; SCHLINDWEIN, M. N; CANUTO, J. C.; NOBRE, H. G.; SOUZA, T. J. M.. **Sistemas agrofloretais e mudanças na qualidade do solo em assentamento de reforma agrária**. Revista Brasileira de Agroecologia, v. 8, n. 1, 2013.

- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática**. Saúde Debate, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, P. 518-534, 2018.
- NUNES, L. A. P. L.; ARAÚJO FILHO, J. A. de.; MENEZES, R. Í. de Q. **Diversidade da fauna edáfica em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo no Semi-árido nordestino**. Scientia Agraria, v.10, n. 1, p.043-049, 2009.
- OLIVEIRA, A. M. **Saberes camponeses e práticas pedagógicas no campo**. Revista Mercator, Ceará, v. 7, n. 13, p. 47-58, 2008.
- PRADO, H. M.; MURRIETA, R. S. S. **A etnoecologia em perspectiva: origens, interfaces e correntes atuais de um campo em ascensão**. Revista Ambiente & Sociedade, São Paulo v. 18, n. 4 n p. 139-160, 2015.
- ROSA, M.; OREY, D. C. **Aproximando diferentes campos de conhecimento em educação: a etnomatemática, a etnobiologia e a etnoecologia**. Revista VIDYA, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2014.
- SANTOS, L. F.; CALIXTO, J. S.; DUARTE, E. G.; CARNEIRO, D. D.; MOTA, L. P. L.; PEREIRA, R. T. G.. **Densidade de minhocas como indicador de qualidade do solo**. Cadernos de Agroecologia, v. 10, n. 3, 2016.
- SCHIAVON, G. de A.; LIMA, A. C. R. de.; SCHIEDECK, G.; SCHWENGBER, J. E.; SCHUBERT, R. N.; PEREIRA, C. V. **O conhecimento local sobre a fauna edáfica e suas relações com o solo em agroecossistema familiar de base ecológica: um estudo de caso**. Revista Ciência Rural, v.45, n.4, p. p.658-660 2015.
- SOUZA, J. H. de. **Os aracnídeos (Arachnidae: Araneae, Scorpiones) na comunidade quolimbola de Mesquita, Goiás: um estudo de caso sobre etnobiologia**. 2007. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – Brasília – Instituto de Ciências Biológicas.
- TOLEDO, V. M.; BARRERA-BASSOLS, N. **A etnoecologia: uma ciência pós-normal que estuda as sabedorias tradicionais**. Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente, n. 20, p. 31-45, 2009.
- WINK, C.; GUEDES, J. V. C.; FAGUNDES, C. K.; ROVEDDER, A. P. **Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental**. Revista de Ciências Agroveterinárias, v.4, n.1, p. 60-71, 2005.

## MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLADAS DE OTITES DE CÃES E GATOS: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO A ÓLEOS ESSENCIAIS

Data de aceite: 18/06/2020

### **Raquel Santos da Silva**

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0158676439244009>

### **Ludmilla Tonani**

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2223866522704252>

### **Marcia Regina von Zeska Kress**

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8032658250894594>

Link Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-1239-7722>

**RESUMO:** *Malassezia pachydermatis* é uma levedura polimórfica que faz parte da microbiota de pele e mucosa e é frequente causadora de

infecções do canal auditivo de cães e gatos. A patogenia da *Malassezia* sp. está relacionada com o sistema imune do hospedeiro e aos fatores de virulência do fungo. A emergência de linhagens de *M. pachydermatis* resistentes aos antifúngicos comerciais resulta na busca de novas alternativas terapêuticas. Os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis altamente concentrados, que são extraídos de plantas e possuem grande diversidade de atividades como, entre outros, a ação antibacteriana e antifúngica. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar, por método molecular, isolados clínicos de *M. pachydermatis* do ouvido externo de gatos e cães domésticos com otite e avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos comerciais cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol, e a atividade antifúngica dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta, Tomilho branco, Manjeriço, Alecrim e Limão-Tahiti. Adicionalmente, a toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada no modelo invertebrado *Galleria mellonella*. Um total de 28 cepas de *M. pachydermatis* foram isoladas e identificadas pelo sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal. O teste de atividade antifúngica revelou que cetoconazol, miconazol e posaconazol apresentaram baixa concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados clínicos de *M.*

*pachydermatis*. Entretanto, alguns isolados clínicos apresentam alta CIM de miconazol ( $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e cetoconazol ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram alta atividade antifúngica contra os isolados clínicos do fungo patogênico *M. pachydermatis* e baixa toxicidade à *G. mellonella*. Embora ensaios adicionais sejam necessários para a aplicação desses óleos essenciais no tratamento de infecções causadas por *M. pachydermatis*, a eficácia antifúngica e a baixa toxicidade mostram um uso promissor desses óleos essenciais no tratamento de infecções fúngicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Malassezia pachydermatis*, antifúngicos comerciais, óleos essenciais, toxicidade, *Galleria mellonella*.

### MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLATED FROM DOGS AND CATS WITH OTITIS EXTERNA: MOLECULAR IDENTIFICATION AND ESSENTIAL OILS SUSCEPTIBILITY

**ABSTRACT:** *Malassezia pachydermatis* is a polymorphic yeast that is part of the skin and mucosa microbiota and a frequent infection-causing agent of ear canal and skin of dogs and cats. *Malassezia* sp. pathogenesis in lesions is related with the host immune system as well as the fungus virulence factors. The emergence of *M. pachydermatis* resistant strains to commercial antifungal results in the search for new therapeutic alternatives. Essential oils are highly concentrated volatile aromatic compounds that are extracted from plants and have a wide range of activities such as, among others, antibacterial and antifungal effect. In addition, the toxicity of essential oils was evaluated in the invertebrate molaria *Galleria mellonella*. A total of 28 strains of *M. pachydermatis* were isolated and identified by the sequencing of the Internal Transcribed Spacer - ITS region of the ribosomal DNA. The antifungal activity test revealed that ketoconazole, miconazole and posaconazole showed low MICs for the clinical isolates of *M. pachydermatis*. However, some clinical isolates have a high MIC of miconazole ( $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and ketoconazole ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). The essential oils of Rosemary Pepper, Clove, Mint and White Thyme showed high antifungal activity against clinical isolates of the pathogenic fungus *M. pachydermatis* and low toxicity to *G. mellonella*. Although additional tests are necessary for the application of these essential oils in the treatment of infections caused by *M. pachydermatis*, the antifungal effectiveness and low toxicity shows a promising use of these essential oils in the treatment of fungal infection.

**KEYWORDS:** *Malassezia pachydermatis*, commercial antifungals, essential oils, toxicity, *Galleria mellonella*.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Malassezia pachydermatis* pertence a um grupo de fungos leveduriformes e lipofílicos que coloniza a pele e mucosa de mamíferos, incluindo gatos e cães saudáveis, sendo a principal espécie fúngica isolada do canal auditivo de cães saudáveis e com otite (Guého-Kellerman et al., 2010, Forster et al., 2018). Embora *M. pachydermatis* seja prevalente em cães, as espécies mais isoladas de gatos inclui principalmente *M. nana*, seguido de *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* e *M. slooffiae* (Bond et al., 2020). A patogenia da

*Malassezia* sp. nas lesões está relacionada com o sistema imune do hospedeiro bem como aos fatores de virulência do fungo, nos quais compõe o grupo de enzimas esterase, lipase, fosfatase ácida, lipoxigenase, protease e fosfolipase. Assim, a ocorrência de otite canina e felina está relacionada com o processo inflamatório associado com a elevação da população de *M. pachydermatis* (Scott et al., 2013). Esta condição dificulta o gerenciamento da doença, e o sucesso do tratamento depende do controle do crescimento excessivo de leveduras e o concomitante crescimento de bactérias, com tratamentos antimicrobianos tópicos ou sistêmicos, além da identificação e correção de possíveis fatores predisponentes (Bond et al., 2020).

As opções de tratamento de otite causada por *M. pachydermatis* em cães e gatos domésticos incluem a terapia sistêmica e principalmente a terapia tópica, com diversos antifúngicos comerciais em associação com antibacterianos. Os derivados azólicos cetoconazol, miconazol e itraconazol são os mais utilizados, além da terbinafina e tiabendazole (Negre et al., 2009). Os procedimentos de referência para o teste *in vitro* de susceptibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos não estão disponíveis. Apesar disso, estudos de susceptibilidade *in vitro* mostram que linhagens de *M. pachydermatis* potencialmente resistentes aos antifúngicos terbinafina (Rougier et al., 2007) nistatina e derivados azólicos (Jesus et al. 2011, Angileri et al., 2019) estão sendo isoladas de cães. A ocorrência de resistência aos antifúngicos leva à insuficiência de tratamento antimicrobiano. Assim, existe uma forte necessidade de um desenvolvimento de novos medicamentos para a cura de infecções provocadas por espécies fúngicas resistentes e multirresistentes.

Os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis (p. ex terpenos e fenilpropanóides) altamente concentrados extraídos de plantas; possuem grande diversidade de atividades já descritas na literatura como, entre outros, efeito antibacteriano e antifúngico (Angioni et al., 2004, Manion and Widder, 2017; Bismark et al., 2019). A atividade antifúngica dos óleos essenciais ocorre por diferentes mecanismos, que podem ser o rompimento da membrana celular, a inibição da atividade da mitocôndria, além de inibição da formação do biofilme (Nazzaro et al., 2017). Existem diversos estudos mostrando a atividade *in vitro* de óleos essenciais contra espécies do gênero *Malassezia*. Estudos realizados com *Malassezia* sp. demonstraram que o óleo essencial de *Zataria multiflora* (Avishan ou Zatar) e *Thymus kotschyanus* (Tomilho) apresentaram fortes propriedades antifúngicas contra a levedura (Khosravi et al., 2016); em outro, o tratamento realizado com uma mistura de óleos essenciais pode limitar as recaídas fúngicas em comparação com o tratamento convencional (Nardoni et al., 2014). Poucos trabalhos mostram a atividade antifúngica dos óleos essenciais contra *M. pachysermatis*. Entre eles, é mostrado que o óleo essencial de orégano e tomilho e seus principais componentes fenólicos (carvacrol, timol) foram fungicidas contra *M. pachydermatis* (Sim et al., 2019). A interação sinérgica também foi estudada entre componentes de óleo essencial e azóis ou nistatina contra *M. pachydermatis*. Entre eles foi testado o clotrimazol e óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), *Mentha piperita* (Hortelã Pimenta) e *Origanum vulgare* (Orégano) (Bohmova et al., 2019), e a combinação dos antifúngicos comerciais miconazol e/ou nistatina com os componentes fenólicos carvacrol ou timol

(Schlemmer et al., 2019) que foram eficazes contra *M. pachydermatis*.

O objetivo deste trabalho foi identificar isolados clínicos de *M. pachydermatis* de ouvido externo de gatos e cães domésticos com otite por ferramenta molecular e avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos comerciais cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol e a atividade antifúngica dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta, Tomilho branco, Manjeriço, Alecrim e Limão-Tahiti.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e identificação molecular dos isolados clínicos de *M. pachydermatis*

Isolados clínicos de *M. pachydermatis* foram selecionados a partir de amostras de secreção de ouvido de cães e gatos com otite. As secreções foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Oxford), enriquecidas com azeite de oliva 1,0% (v/v), tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram selecionadas e as leveduras conservadas em meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose acrescido de glicerol (Sigma-Aldrich) 30% (v/v) em freezer -80°C, para as futuras análises. Todo o estudo foi realizado com a aprovação pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA FCFRP-USP), sendo registrado em 24/11/2016 sob o nº 16.1.930.60.9 em novembro/2016.

Os isolados clínicos foram identificados por método molecular. Para isso, as leveduras foram cultivadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose em caldo enriquecido com azeite de oliva 1,0% (v/v), tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 72 horas. As leveduras foram ressuspensas em tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v)) e rompidas pela adição de pérolas de vidro (Sigma-Aldrich), fenol:clorofórmio (1:1) e agitação mecânica. Após centrifugação a 13000 g por 10 minutos, o DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de igual volume de isopropanol. Após nova centrifugação a 13000 g por 10 minutos, o DNA genômico foi eluído em água livre de Rnase (Promega). A região *Internal Transcribed Spacer* - ITS do DNA ribossomal foi amplificada por PCR com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (White et al., 1990), utilizando a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com normas do fabricante. Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Australia) e comparada com sequências depositadas no banco de dados no GenBank, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

### 2.2 Os antifúngicos e os óleos essenciais

Os antifúngicos e respectivas concentrações testadas neste trabalho foram Cetoconazol (Pfizer) 0,03 a 16 µg mL<sup>-1</sup>, Itraconazol (Merck Sharp & Dohme) 0,03 a 16 µg mL<sup>-1</sup>, Miconazol (Sigma-Aldrich) 0,03 a 16 µg mL<sup>-1</sup> e Posaconazol (Sigma-Aldrich) 0,0019 a 1 µg

mL<sup>-1</sup>. Os óleos essenciais foram Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (Pronat) 0,0039% a 2% (v/v), Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) (CEPLAC) 0,0039% a 2% (v/v), Menta (*Mentha* sp.) (Lapiendrius) 0,0039% a 2% (v/v), Tomilho branco (*Thymus vulgaris*) (*Destilaria Bauru*) 0,0039% a 2% (v/v), Manjeriçãõ (*Ocimum basilicum*) (*Destilaria Bauru*) 0,0058% a 3% (v/v), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (*Destilaria Bauru*) 0,0058% a 3% (v/v), Limão-Tahiti (*Citrus aurantifolia*) (Citrosuco) 0,0058% a 3% (v/v). Os antifúngicos e óleos essenciais foram diluídos em 1% (v/v) de Dimetil sulfóxido (DMSO).

### 2.3 Teste de susceptibilidade in vitro

Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos e óleos essenciais foram realizado de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), com modificações. As leveduras foram inoculadas em ágar Sabouraud Dextrose (Oxford) enriquecido com azeite de oliva 1,0% (v/v) e tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 48 horas. As suspensões das leveduras foram ajustadas a 5 x 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup> em meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico) 0,165 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 acrescido de meio de cultura para *Malassezia* (dextrose 1,8% (p/v), peptona bacteriológica 1% (p/v), glicerol 1% (v/v), tween 80 0,05% (v/v)) (Rincón et al., 2006). As linhagens controle do experimento foram *Aspergillus flavus* ATCC®204304™ e *Candida parapsilosis* ATCC®22019™. Os testes de susceptibilidade nas placas de microdiluição em caldo foram incubados a 37°C com leitura visual das linhagens controle em 48 horas e dos isolados clínicos de *M. pachydermatis* em 72 horas de incubação. Os resultados foram expressos relatando a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico e, além disso, pela média geométrica (MG-CIM), que indica a tendência central dos valores de CIM obtidos para cada antifúngico e óleo essencial.

### 2.4 Teste de toxicidade dos óleos essenciais em *Galleria mellonella*

A toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada pelo modelo invertebrado alternativo de toxicidade *Galleria mellonella*, de acordo com Paziani et al. (2019), com modificações. Grupos de 5 larvas no sexto instar de desenvolvimento e pesando 200 ± 50 mg foram inoculadas com 5 µL de óleos essenciais, utilizando micro seringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 uL. Os óleos essenciais foram diluídos em PBS1X acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 80, nas seguintes concentrações finais: Alecrim pimenta 0,007%, 0,014% e 0,028%; Cravo-da-Índia 0,042%, 0,084% e 0,168%; Menta 0,020%, 0,040% e 0,080%; Tomilho branco 0,025%, 0,050% e 0,100%; Manjeriçãõ 0,217%, 0,434% e 0,868%; Alecrim 0,104, 0,209% e 0,419%; Limão-Tahiti 0,461%, 0,922% e 1,84%. O controle do experimento foram larvas inoculadas com PBS1X acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 80. Após a inoculação, as larvas permaneceram em temperatura de 37°C, totalmente privadas de ração e iluminação direta. Durante o tempo experimental, foi realizada a limpeza a cada 12 h para a retirada da pré-pupa de todas as larvas, para retardar o processo de metamorfose do inseto. Foram feitas

avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 10 dias.

## 2.5 Análise estatística

Para o teste de toxicidade adotou-se o método estatístico Long-rank (Mantel-Cox) com a finalidade de avaliar a significância das diferenças entre as curvas de sobrevivência. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente. Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphpadPrism (v 7.0; Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

## 3 | RESULTADOS

### 3.1 Animais domésticos, isolados clínicos e a identificação molecular

Este estudo analisou isolados clínicos fúngicos de canal auditivo externo de 15 gatos e cães domésticos com otite, sendo 8 gatos domésticos (*Felis catus*) e 7 cães domésticos (*Canis lupus familiaris*). Entre os gatos havia dois machos e 6 fêmeas e entre os cães havia 4 machos, duas fêmeas e um cão com gênero não identificado. Entre os 28 isolados clínicos estudados neste trabalho, 14 foram isolados de gatos e 17 isolados de cães, nos meses outubro e novembro de 2016 (tabela 1). A identificação dos isolados clínicos foi pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, o qual revelou que 100% dos isolados clínicos são *Malassezia pachydermatis* (tabela 2).

ID animal	Espécie	Raça	G	ID isolado clínico	Data de coleta	Sítio coleta
01	<i>Felis catus</i>	Persa	M	LMC 7001.01	Out 2016	OD
				LMC 7001.02	Out 2016	OE
02	<i>Felis catus</i>	SRD	M	LMC 7002.01	Out 2016	OD
				LMC 7002.02	Out 2016	OE
03	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7003.01	Out 2016	OD
				LMC 7003.02	Out 2016	OE
04	<i>Felis catus</i>	SRD	F	LMC 7004.01	Out 2016	OD
				LMC 7004.02	Out 2016	OE
05	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7005.02	Out 2016	OE
				LMC 7005.04	Out 2016	OE
06	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7006.02	Out 2016	OE
07	<i>Felis catus</i>	Exótico	F	LMC 7007.01	Out 2016	OD
				LMC 7007.02	Out 2016	OE
08	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	M	LMC 7008.01	Nov 2016	OD
				LMC 7008.02	Nov 2016	OE
09	<i>Felis catus</i>	Exótico	F	LMC 7009.02	Out 2016	OE
10	<i>Canis lupus familiaris</i>	Maltes	F	LMC 7010.01	Nov 2016	OD
				LMC 7010.02	Nov 2016	OE
11	<i>Canis lupus familiaris</i>	Buldogue	M	LMC 7011.01	Nov 2016	OD
				LMC 7011.02	Nov 2016	OE
12	<i>Canis lupus familiaris</i>	Shih-tzu	M	LMC 7012.01	Nov 2016	OD

				LMC 7012.02	Nov 2016	OE
35	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	-	LMC 7035.01	Nov 2016	OD
				LMC 7035.02	Nov 2016	OE
36	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	M	LMC 7036.01	Nov 2016	OD
				LMC 7036.02	Nov 2016	OE
37	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	F	LMC 7037.01	Nov 2016	OD
				LMC 7037.02	Nov 2016	OE

Tabela 1: Animais e isolados clínicos de *M. pachydermatis* deste trabalho. ID, identificação; *Felis catus*, gato doméstico; *Canis lupus familiaris*, cão doméstico; SRD, sem raça definida; G, gênero do animal; M, macho; F, fêmea; OD, orelha direita; OE, orelha esquerda; -, não informado.

Isolado Clínico	GenBank	Identificação molecular	Max Score	E value	Identidade (%)	ID GenBank
LMC7001.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1153	0,0	99,7	MT248902
LMC7001.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1003	0,0	99,3	MT248903
LMC7002.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1184	0,0	99,7	MT248904
LMC7002.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1247	0,0	99,7	MT248905
LMC7003.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248906
LMC7003.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248907
LMC7004.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1171	0,0	99,4	MT248908
LMC7004.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248909
LMC7005.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1216	0,0	99,7	MT248910
LMC7005.04	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1099	0,0	98,6	MT248911
LMC7006.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	974	0,0	98,9	MT248912
LMC7007.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1216	0,0	99,7	MT248913
LMC7007.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248914
LMC7008.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1221	0,0	99,6	MT248915
LMC7008.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1107	0,0	98,3	MT248916
LMC7009.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1203	0,0	99,7	MT248917
LMC7010.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1166	0,0	99,9	MT248918
LMC7010.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1173	0,0	100	MT248919
LMC7011.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	100	MT248920
LMC7011.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1192	0,0	100	MT248921
LMC7012.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1232	0,0	99	MT248922
LMC7012.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1186	0,0	99,4	MT248923
LMC7035.01	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1079	0,0	99,7	MT248924
LMC7035.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1074	0,0	99,4	MT248925
LMC7036.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1243	0,0	100	MT248926
LMC7036.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1085	0,0	98,7	MT248927
LMC7037.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1238	0,0	99,9	MT248928
LMC7037.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1243	0,0	100	MT248929

Tabela 2: Identificação molecular dos isolados clínicos *M. pachydermatis* pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal.

### 3.2 Susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *M. pachydermatis* aos antifúngicos e óleos essenciais

Os 28 isolados clínicos de *M. pachydermatis* foram testados quanto a sua susceptibilidade aos antifúngicos comerciais da classe dos azóis (cetoconazol, miconazol,

itraconazol e posaconazol). Os intervalos de CIM e MG-CIM para cetoconazol foram entre 0,031 - 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,142  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para cetoconazol, 0,5 - 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 5,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para miconazol, 0,031 - 0,062  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,038  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para itraconazol e 0,015 - 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,051  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para posaconazol (tabela 3). Estes resultados mostram que cetoconazol e miconazol apresentaram altas CIM para os isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

A atividade antifúngica de óleos essenciais foi avaliada contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Foi observado que os intervalos de CIM e MG-CIM foram, respectivamente, 0,004 – 0,016% e 0,008% para Alecrim pimenta, 0,016 – 0,031% e 0,043% para Cravo-da-Índia, 0,016 – 0,125% e 0,031 para Menta, 0,016 – 0,031% e 0,026% para Tomilho Branco, 0,094 – 0,75% e 0,239% para Manjeriçao, 0,094 – 3% e 0,477% para Alecrim e 0,188 – 1,5% e 0,49% para Limão-Tahiti (tabela 4). Assim, observamos que os óleos essenciais de Manjeriçao, Alecrim e Limão-Tahiti apresentaram altas CIM para os isolados clínicos de *M. pachydermatis*, em comparação com as baixas CIM encontradas para os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco.

Isolado Clínico	Cetoconazol	Miconazol	Itraconazol	Posaconazol
LMC7001.02	0,031	16	0,062	0,062
LMC7002.01	2	8	0,031	0,062
LMC7002.02	0,031	16	0,031	0,015
LMC7003.01	2	16	0,031	0,062
LMC7003.02	0,031	8	0,031	0,031
LMC7004.01	0,031	16	0,031	0,031
LMC7004.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7005.02	0,031	16	0,031	0,031
LMC7005.04	0,031	16	0,031	0,062
LMC7006.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7007.01	0,062	16	0,031	0,062
LMC7007.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7008.01	1	16	0,031	0,031
LMC7008.02	4	16	0,031	0,031
LMC7009.02	0,031	2	0,031	0,062
LMC7010.01	0,031	1	0,031	0,015
LMC7010.02	0,031	0,5	0,031	0,062
LMC7011.01	0,5	16	0,031	0,062
LMC7011.02	0,5	16	0,031	0,062
LMC7012.01	1	2	0,031	0,031
LMC7012.02	0,031	1	0,062	0,015
LMC7035.02	0,031	2	0,031	0,031
LMC7036.01	1	2	0,031	0,125
LMC7036.02	0,031	1	0,062	0,031
LMC7037.01	0,5	1	0,250	0,5
LMC7037.02	0,5	1	0,125	0,5
Média Geométrica (MG)	0,142	5,657	0,038	0,051

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM,  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) dos antifúngicos contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

Isolado Clínico	Alecrim Pimenta	Cravo-da-Índia	Menta	Tomilho Branco	Manjeriçã	Alecrim	Limão-tahiti
LMC7001.01	0,004	0,062	0,062	0,031	0,188	0,375	0,375
LMC7001.02	0,004	0,062	0,031	0,031	0,188	0,375	0,375
LMC7002.01	0,004	0,031	0,062	0,031	0,188	1,5	0,375
LMC7002.02	0,008	0,062	0,062	0,031	0,375	0,750	0,188
LMC7003.01	0,016	0,062	0,016	0,031	0,188	0,188	0,188
LMC7003.02	0,016	0,062	0,016	0,031	0,188	0,188	0,375
LMC7004.01	0,016	0,062	0,031	0,031	0,375	0,375	0,375
LMC7004.02	0,008	0,062	0,016	0,031	0,375	0,750	0,375
LMC7005.02	0,004	0,062	0,016	0,031	0,188	0,375	0,750
LMC7005.04	0,004	0,062	0,016	0,031	0,188	0,375	0,375
LMC7006.02	0,008	0,062	0,031	0,031	0,375	0,375	0,375
LMC7007.01	0,008	0,062	0,125	0,031	0,750	3	0,375
LMC7007.02	0,008	0,062	0,062	0,031	0,750	3	0,750
LMC7008.01	0,004	0,031	0,062	0,031	0,375	1,5	0,750
LMC7008.02	0,016	0,062	0,125	0,031	0,375	0,750	0,375
LMC7009.02	0,008	0,031	0,031	0,016	0,094	0,375	1,5
LMC7010.01	0,008	0,062	0,125	0,031	0,750	3	0,750
LMC7010.02	0,008	0,016	0,016	0,016	0,094	0,094	0,375
LMC7011.01	0,008	0,031	0,016	0,016	0,094	0,094	0,375
LMC7011.02	0,008	0,031	0,016	0,016	0,188	0,188	0,375
LMC7012.01	0,008	0,031	0,008	0,016	0,188	0,375	0,750
LMC7012.02	0,008	0,031	0,008	0,016	0,094	0,188	0,750
LMC7035.02	0,008	0,031	0,031	0,031	0,094	0,375	0,375
LMC7036.01	0,016	0,031	0,062	0,031	0,375	0,375	0,375
LMC7037.01	0,008	0,031	0,031	0,031	0,375	0,750	1,5
LMC7037.02	0,008	0,016	0,016	0,016	0,188	0,375	1,5
Média Geométrica (MG)	0,008	0,043	0,031	0,026	0,239	0,477	0,490

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM, %) dos óleos essenciais contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. OF,

### 3.3 Toxicidade dos óleos essenciais em *G. mellonella*

A toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada no modelo invertebrado alternativo *G. mellonella*. As concentrações testadas foram selecionadas de acordo com os valores de CIM encontrados para cada composto. Foi observado que as concentrações testadas dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco causaram alta taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em 10 dias de experimento, indicando baixa toxicidade para estes compostos ( $P > 0,05$ ). Os óleos essenciais de Manjeriçã, Alecrim e Limão-Tahiti causaram alta mortalidade de larvas ( $P < 0,05$ ), principalmente com as maiores concentrações testadas, indicando que estes compostos são tóxicos nestas concentrações. Já o controle do experimento (PBS1x Tween 80) manteve a maioria das larvas vivas até o

final do experimento (figura 1).

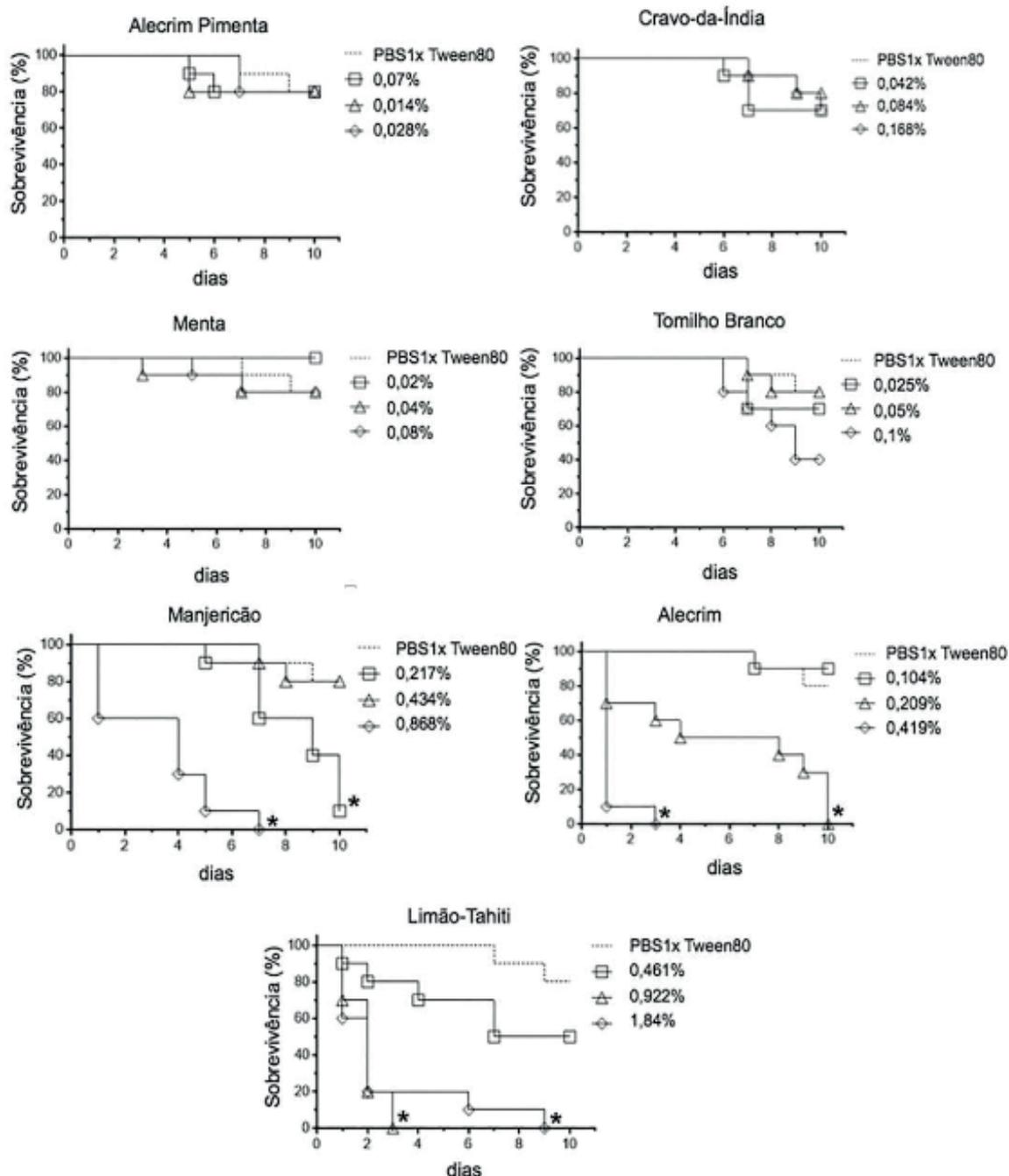


Figura 01: Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais no modelo invertebrado *G. mellonella*. \*,  $P < 0,05$ .

#### 4 | DISCUSSÃO

Este trabalho mostra a identificação molecular e susceptibilidade aos antifúngicos comerciais e óleos essenciais de cepas clínicas de *M. pachydermatis* isoladas do ouvido externo de gatos e cães com otite. *M. pachydermatis* é uma levedura comensal na pele e mucosa de cães e gatos (Paterson et al., 2018). Este fungo pode se tornar um patógeno oportunista, sendo *M. pachydermatis* a levedura mais frequente em otites caninas (1 a 3 Bismark) e causador regular de otite felina (Paterson et al., 2018).

O tratamento das otites causadas por *M. pachydermatis* é baseado em aplicação tópica e sistêmica de antifúngico comercial (cetoconazol, itraconazol, miconazol, posaconazol, clotrimazol, nistatina, terbinafina), combinada com antibióticos para o controle de infecções bacterianas (Nuttall, 2016; Paterson et al., 2018). Existem diversas publicações que mostram a eficácia destes antifúngicos contra *Malassezia* sp. (Peano et al., 2017). Entretanto, poucos estudos que comparam a eficácia deste produto tópico e sua atividade contra a *M. pachydermatis* nos casos de otite canina e felina foram descritos (Negre et al., 2009). Observamos que cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol são eficazes contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Entretanto, alguns isolados clínicos apresentam alta CIM de miconazol ( $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e cetoconazol ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Da mesma forma, existem relatos de isolados de *M. pachydermatis* resistentes a cetoconazol e itraconazol (Nijima et al., 2011, Kano et al., 2018). Assim, com a existência de cepas de *M. pachydermatis* resistentes aos antifúngicos azólicos, a busca de novas alternativas terapêuticas, como os óleos essenciais, pode ser uma alternativa de tratamento para otite de cães e gatos. Os óleos essenciais são conhecidos por sua capacidade de proteção das plantas contra insetos, vetores, herbívoros e microrganismos patogênicos (Sharifi-Rad et al., 2017), revelando assim uma potencial atividade antimicrobiana. Em nosso trabalho, os óleos essenciais Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram atividade contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Existem poucos estudos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra isolados clínicos de *M. pachydermatis* (Bismark et al., 2019). Os trabalhos de atividade antifúngica apresentam variações metodológicas e diferentes óleos essenciais, dificultando a comparação dos resultados. Mesmo assim, é evidente a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, inclusive contra *M. pachydermatis* (Rusenova e Parvanov, 2009; Váczi et al., 2018). Os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram alta atividade antifúngica contra os isolados clínicos do fungo patogênico *M. pachydermatis* e baixa toxicidade à *G. mellonella*. Assim, a utilização destes óleos essenciais é promissora. Contudo, ensaios adicionais são necessários para a aplicação destes óleos essenciais no tratamento de otites caninas e felina causadas por *M. pachydermatis*.

## 5 | SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo n° 2015/05853-7), e a aluna Raquel Santos da Silva recebeu bolsa de iniciação científica do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq.

## 6 | AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento à correção ortográfica da Profa. Dra. Erica Luisa Ziegler.

## REFERÊNCIAS

- ANGILERI, M.; PASQUETTI, M.; DE LUCIA, M.; PEANO, A. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. **Med. Mycol. Case Rep.** v. 23, p. 58–61, 2019. doi: 10.1016/j.mmcr.2018.12.004
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3530-3535, 2004.
- BismARK, D.; DUSOLD, A.; HEUSINGER, A.; MÜLLER, E. Antifungal in vitro Activity of Essential Oils against Clinical Isolates of *Malassezia pachydermatis* from Canine Ears: A Report from a Practice Laboratory. **Complement Med Res.**, v. 27, p. 1-12, novembro, 2019 doi: 10.1159/000504316.
- BOHMOVA, E.; CONKOVA, E.; HARCAROVA, M.; SIHELKA, Z. Interactions between clotrimazole and selected essential oils against *Malassezia pachydermatis* clinical isolates. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 22, p. 173–175, 2019. doi: 10.24425/pjvs.2019.127082
- BOND, R.; MORRIS, D. O.; GUILLOT, J.; BENSIGNOR, E.; ROBSON, D., MASON, K. V.; et al. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia dermatitis* in dogs and cats. clinical consensus guidelines of the world association for veterinary dermatology. **Vet. Dermatol.**, v. 31, p. 75, 2020. doi: 10.1111/vde.12834
- FORSTER, S. L.; REAL, T.; DOUCETTE, K. P.; KING, S. B. A randomized placebo-controlled trial of the efficacy and safety of a terbinafine, florfenicol and betamethasone topical ear formulation in dogs for the treatment of bacterial and/or fungal otitis externa. **BMC Vet. Res.**, v. 14, p. 262, 2018. doi: 10.1186/s12917-018-1589-7
- GUÉHO-KELLERMAN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure in *Malassezia* and the Skin. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Science and Clinical Practice**, Berlin, Springer, p. 17–63, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-03616-3\_2
- JESUS, F. P.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R. A.; MAHL, D. L.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, M. L.; et al. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Vet. Microbiol.**, v. 152, p. 161–164, 2010. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.027
- KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; FAHIMIRAD, S. Efficacy of medicinal essential oils against pathogenic *Malassezia* sp. isolates. **J Mycol Med.**, v. 26, n. 1, p. 28-34, março, 2016. doi: 10.1016/j.mycmed.2015.10.012.
- MANION, C. R.; ANDWIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 74, p. e153–e162, 2017. doi: 10.2146/ajhp151043
- NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; SANNA, V.; PERRUCCI, S.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia dermatitis*. **J Mycol Med.**, v. 24, n. 3, p. 234-240, Setembro, 2014. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.02.005.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. E86, Basiléia, Novembro, 2017.
- NEGRE, A.; BENSIGNOR, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia dermatitis* in dogs. **Vet Dermatol.**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3164.2008.00721.x
- NUTTALL, T. Successful management of otitis externa. **In Pract.**, v. 38, n. 2, p. 17–21, 2016.
- PATERSON, S. *Malassezia* otitis — frequently asked questions. **Companion animal**, v. 23, n. 9, Setembro, 2018.

PAZIANI, M. H.; TONANI, L.; MENEZES, H. D.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L.; VON ZESKA KRESS, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197–203, 2019. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.12.010

PEANO, A. et al., Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. **J. Fungi**, v. 3, p. 37, 2017. doi:10.3390/jof3030037

RINCÓN, S.; CEPERO, M. C.; ESPINEL-INGROFL, A. A modified christensen's urea and clsi broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazol. **J. Clin. Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3429-3431, 2006.

ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; WOEHLÉ, F.; BOISRAMÉ, B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 299–307, 2005.

RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia J Sci.**, v. 1, n. 7, p. 37–43, 2009.

SCHLEMMER, K. B.; JESUS, F. P. K.; TONDOLO, J. S. M.; WEIBLEN, C.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, V. S.; et al. In vitro activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. **J. Mycol. Med.**, v. 29, p. 375–377, 2019. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.08.003

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Otitis externa. In: **Müller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th ed.; WB Saunders Co.: pp. 741–773. Philadelphia, PA, USA, 2013

SIM, J. X. F.; KHAZANDI, M.; CHAN, W. Y.; TROTT, D. J.; DEO, P. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. **Vet. Dermatol.**, v. 30, p. 524–e159, 2019. doi: 10.1111/vde.12794

SHARIFI-RAD, J.; SUREDA, A.; TENORE, G. C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M.; et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. E70, Janeiro, 2017.

VÁCZI, P.; ČONKOVÁ, E.; MARCINČÁKOVÁ, D.; SIHELKÁ, Z. Antifungal Effect of Selected Essential Oils on *Malassezia pachydermatis* Growth. **Folia Vet.**, v. 2, n. 62, p. 67–72, 2018.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. **Rev. Res. Gate.**, v. 38, p. 315-322, 1990.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE CROTON SP SOBRE ATRAÇÃO PARA A OVIPOSIÇÃO DO *Aedes aegypti*

Data de aceite: 18/06/2020

Data de submissão: 05/04/2020

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6039105103572387>

### Daniel Lobo Sousa

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-  
UESB

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/1355455216874534>

### Roseliz Campelo Pachêco

Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/4944464839039038>

### Quirlian Queite Araújo Anjos

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-  
UESB

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/4411202385029113>

### Thaimara Gomes Costa

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-  
UESB

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6757591051699594>

### Débora Cardoso da Silva

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-  
UESB

Itapetinga-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/1112762927520047>

### Simone Andrade Gualberto

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-  
UESB

**RESUMO:** Estudos relacionados ao uso de plantas medicinais vêm despertando interesse por parte dos pesquisadores com intuito de desenvolver inseticidas de origem botânica como forma alternativa para o controle de insetos vetores, como o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) conhecido mundialmente por transmitir a Dengue, Chikungunya e o Zika vírus. Nesse sentido, objetivou-se avaliar a atividade do óleo essencial obtido das folhas de *Croton sp.*, sobre a atração para a oviposição do *A. aegypti*. A planta foi coletada, identificada e, posteriormente, foi feita a extração do óleo essencial para, em seguida, dar início ao bioensaio. A partir da análise dos dados verificou-se que fêmeas do *A. aegypti* demonstraram preferência para a oviposição em água deionizada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dengue; Inseticidas botânicos; Caatinga.

EVALUATION OF THE ESSENTIAL OIL  
ACTIVITY OBTAINED FROM LEAVES OF  
CROTON SP IN THE ATTRACTION FOR  
*Aedes aegypti* OVIPOSITION

**ABSTRACT:** Studies related to the use of medicinal plants have attracted interest from researchers in order to develop botanical origin

of insecticides as an alternative to control insect vectors, such as *Aedes aegypti*, (Linnaeus 1762) known worldwide for transmitting Dengue, Chikungunya and Zika virus. In this sense, it aimed to evaluate the essential oil activity obtained from the leaves of *Croton sp.*, on the attraction for oviposition of *A. aegypti*. Initially, the plant was collected and recorded in the herbarium and, later, essential oil extraction was made to then start the bioassay. From the data analysis it was found that the *A. aegypti* females showed a preference for deionized water.

**KEYWORDS:** Dengue; Botanical insecticides; Caatinga.

## 1 | INTRODUÇÃO

O uso de plantas é relatado desde os primórdios das civilizações antigas como um recurso natural para os seres vivos e, recentemente, estas vêm sendo empregadas como modelos para a síntese de um grande número de fármacos para fins medicinais.

Os óleos essenciais constituem elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas e assim são denominados devido à composição lipofílica que apresentam. São constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta, como os terpenóides, flavonoides e alcaloides e são obtidos da extração de órgãos ou estruturas vegetais, como, raiz, caule, folha, flor e semente, além de estarem relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal e em atrair agentes polinizadores (Costa et al, 2008).

Os constituintes voláteis estão ativos em diversas espécies de plantas, inclusive no gênero estudado, possibilitando uma viabilidade no uso de espécies do gênero *Croton* para a fabricação de inseticidas com atuação no controle de insetos, especialmente os que causam danos à saúde humana, como o *Aedes aegypti*, (Linnaeus, 1762). vetor de grande importância epidemiológica por transmitir a dengue, febre amarela urbana, chikungunya e o zika vírus (Costa et al, 2008; Carvalho, 2015; Carvalho et al, 2016).

Portanto, torna-se essencial a descoberta de produtos alternativos que atuem como inseticidas, repelentes e produtos que evitem a oviposição do *A. aegypti*, visto que a maioria dos produtos utilizados com estes fins são produtos sintéticos, que causam intoxicação no meio ambiente e conseqüentemente aos seres humanos (ZHANG et al., 2016, IUPAC, 2016, CAMPOS et al, 2016).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade do óleo essencial obtido das folhas de *Croton sp* sobre atração para a oviposição das fêmeas do *A. aegypti*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em estufa de circulação de ar regulada de a uma temperatura de 40°C, por 12 horas. Posteriormente, as folhas foram trituradas

manualmente e em seguida foi dado início à extração do óleo essencial por hidrodestilação, utilizando-se o extrator de Clevenger. Para a realização do bioensaio foram utilizados adultos da espécie *A. aegypti* Linhagem Rockefeller, 20 machos e 20 fêmeas por repetição, com quatro repetições por tratamento.

O experimento foi constituído por um grupo controle composto por uma solução de Tween a 10%, um tratamento contendo temephos na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e água deionizada e cinco tratamentos com diferentes concentrações do óleo essencial de *Croton sp* (0,37mg mL<sup>-1</sup>; 0,19 mg mL<sup>-1</sup>; 0,09 mg mL<sup>-1</sup>; 0,05 mg mL<sup>-1</sup>; 0,02 mg mL<sup>-1</sup>). Foram adicionados 30 mL de cada tratamento descrito anteriormente em pequenos recipientes de cor preta e, posteriormente, estes foram dispostos nas gaiolas onde se encontravam os mosquitos.

As observações dos diferentes tratamentos foram realizadas diariamente e, ao final de quatro dias, foram retirados os papéis filtros e realizado a contagem dos ovos. Os dados obtidos com relação às médias de oviposição foram submetidos ao teste de Dunnett e Duncan, ao nível de 5% de probabilidade em ambos os testes.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta avaliação, foi possível verificar que ao comparar o tratamento contendo somente água deionizada com as diferentes concentrações do óleo essencial, dentro dos tratamentos (nas linhas), foi possível verificar que o tratamento com água deionizada foi significativamente mais atrativo para a oviposição que os diferentes tratamentos contendo óleo essencial.

Em relação ao tratamento contendo o inseticida temephos, foi possível averiguar que não houve diferença significativa deste quando comparado ao tratamento contendo água deionizada. Esse resultado pode ter ocorrido pela baixa concentração de Temephos utilizada (Tabela 1).

CONCENTRAÇÕES (mg mL <sup>-1</sup> )	Número de ovos ( $\bar{X}$ )	
	Óleo	Água
0,37	0.00 A *	846.25B**
0,19	8.25 A *	739.75B**
0,09	33.00A*	851.50B**
0,05	0.00A*	617.25 B**
0,02	7.50A*	1139.50 B**
Temephos	707.50 A	753.00 A
Controle	7.50A*	641.00 B**

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações do óleo essencial de *Croton sp.* sobre a oviposição de fêmeas do *Aedes aegypti*, comparado à água deionizada e ao temephos.

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras diferentes e maiúscula, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 0,05% de probabilidade. <sup>2</sup> Para a comparação do Temephos com os demais tratamentos, nas colunas, empregou-se o teste estatístico de Dunnett (\* p<0,05 e \*\* p>0,05).

Ao comparar os tratamentos contendo óleo essencial em diferentes concentrações entre si e comparar o tratamento contendo o controle negativo (solução de Tween) com o tratamento contendo o inseticida temephos, foi possível verificar uma preferência significativa ( $p < 0,05$ ) das fêmeas de *A. aegypti* pelo recipiente contendo o inseticida temephos, onde foi possível verificar uma média de 707,50 de ovos.

Não houve diferença significativa entre o número de ovos presentes nos recipientes com água deionizada dispostos nas gaiolas em que foi disposto o óleo essencial em diferentes concentrações, assim como também não houve diferença significativa na gaiola contendo o tratamento com a solução de Tween a 10%, quando comparados ao tratamento contendo água deionizada presente na gaiola com o temephos (Tabela 1).

Ao analisar a atratividade para oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, constatou-se que o maior potencial de atratividade ocorreu nos tratamentos contendo os recipientes com água deionizada e nos tratamentos contendo o inseticida temephos.

A presença do temephos na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> não impediu que as fêmeas de *A. aegypti* ovipositassem nestes recipientes, confirmando assim, que este inseticida não apresenta poder de atuação como repelente para a oviposição, já que este, segundo Arruda et al (2011) e WHO (2009), apresenta somente a capacidade de atuar como larvicida.

Diversos autores relatam que a espécie *A. aegypti* geralmente prefere ovipositar em recipientes contendo água limpa, com pH neutro ou ligeiramente salobra e temperatura entre 25,7C° a 26,1C°. Todavia, de acordo com Beserra et al (2010), o *A. aegypti* também apresenta preferência para ovipositar em recipientes em água com alta turbidez, uma vez que sua fase de larva é fotofóbica.

## 4 | CONCLUSÕES

As fêmeas do *Aedes aegypti* demonstraram uma preferência para oviposição nos tratamentos água deionizada e temephos, havendo uma rejeição em ovopositar nos tratamentos contendo óleo essencial e Tween. Indicando assim a necessidade da continuidade desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, E. J. D.; ROSSI, A. P. L.; ANDRADE PORTO, K. R. D.; OLIVEIRA, L. C. S. D.; ARAKAKI, A. H., SCHEIDT, G. N. & ROEL, A. R. Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 503-509, 2011.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R.; DE SOUSA, J. T.; DE FREITAS, E. M. & SANTOS, K. D. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 1016-1023, 2010.

CARVALHO, K. S.; CRUZ, R. C. D.; SILVA, S. L. C. & GUALBERTO, S. A. Atividade larvicida dos extratos

aquosos e do hidrolato das folhas de *Croton tetradenius* sobre o *Aedes aegypti*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico

Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 2908, 2015.

CARVALHO, K. S.; SILVA, S. L. C.; SOUZA, I. A.; GUALBERTO, S. A.; CRUZ, R. C. D.; SANTOS, F. R. & CARVALHO, M. G. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology research**, p. 1-8, 2016.

CAMPOS, D., GRAVATO, C., QUINTANEIRO, C., SOARES, A. M., & PESTANA, J. L. Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 80-85, 2016.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B., SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L. & SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Pesticide properties data base (PPDB)**. 2016. Disponível em: Acesso em: 20 Jan. 2020.

WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, 2009.

ZHANG, H., GEORGESCU, P., & HASSAN, A. S. Mathematical insights and integrated strategies for the control of *Aedes aegypti* mosquito. **Applied Mathematics and Computation**, v. 273, p. 1059-1089, 2016.

## O ENSINO DE BIOLOGIA SOB A ÓTICA DISCENTE: UM RECORTE AMOSTRAL NA ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL EM BARREIRAS - BAHIA

Data de aceite: 18/06/2020

### Camila de Carvalho Moreira

Universidade do Estado da Bahia, Departamento  
de Ciências Humanas – Campus IX, Barreiras –  
Bahia

Link para o currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3809007810500199>

### Fábio de Oliveira

Universidade do Estado da Bahia, Departamento  
de Ciências Humanas – Campus IX, Barreiras –  
Bahia

Link para o currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0024799567828072>

**RESUMO:** A aprendizagem em Biologia deve ser orientada através de uma didática capaz de proporcionar o desenvolvimento cognitivo dos alunos no momento da elaboração e da construção do conhecimento em sala de aula. Considerando que os objetivos do ensino de Biologia são de aprender conceitos, dar fundamentação ao debate crítico à luz das teorias científicas e avaliar as implicações sociais da ciência e da tecnologia na sociedade surgiu o seguinte questionamento: Como é o ensino de Biologia praticado na Escola Técnica Estadual em Barreiras, região Oeste da Bahia, a partir do olhar discente? Diante dessa problemática o presente estudo buscou averiguar a partir da percepção dos estudantes

do Centro Territorial de Educação Profissional da Bacia do Rio Grande, a disciplina de Biologia ofertada nesta instituição. A pesquisa envolveu 108 discentes do curso Técnico em Agropecuária, das turmas únicas A e B do 1º e 2º ano que estavam vivenciando a disciplina Biologia no transcorrer do primeiro semestre de 2019. A coleta de dados ocorreu por meio da aplicação de questionário em que os resultados da investigação foram avaliados através de uma abordagem qualitativa e da metodologia de análise do conteúdo. A partir dos resultados alcançados observou-se que os alunos possuem empatia com os componentes curriculares da disciplina de Biologia, no entanto, sentem falta de uma metodologia diferenciada por parte dos docentes responsáveis pelo ensino de Biologia. Há uma predominância da forma teórica, verbalizada e livresca, não havendo a inserção de atividades prático-experimentais, o que dificulta a aprendizagem discente. Conclui-se um quadro insatisfatório com relação ao ensino de Biologia manifestado pelos estudantes durante o período da pesquisa, mesmo reconhecendo que excepcionalmente certos professores, de maneira isolada e com recursos próprios, se mobilizam para realizar algumas aulas experimentais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aprendizagem; Didática; Sala de Aula; Percepção dos Estudantes; Disciplina de Biologia.

## BIOLOGY TEACHING FROM A STUDENT PERSPECTIVE: A SAMPLE CUT AT THE STATE TECHNICAL SCHOOL IN BARREIRAS - BAHIA

**ABSTRACT:** Biology learning should be guided through didactics capable of providing students' cognitive development when preparing and building knowledge in the classroom. Considering that the objectives of teaching Biology are to learn concepts, to give grounds to the critical debate in the light of scientific theories and to evaluate the social implications of science and technology in society, the following question arose: How is the teaching of Biology practiced in the Technical School State in Barreiras, Western Bahia, from the student's perspective? Faced with this problem, the present study sought to ascertain from the perception of students at the Territorial Center for Professional Education of the Rio Grande Basin, the discipline of Biology offered at this institution. The research involved 108 students from the Technical course in Agriculture, from single classes A and B of the 1st and 2nd year who were experiencing the discipline Biology during the first semester of 2019. Data collection occurred through the application of a questionnaire in which students' Research results were assessed using a qualitative approach and content analysis methodology. From the results achieved, it was observed that students have empathy with the curricular components of the discipline of Biology, however, they miss a different methodology on the part of the teachers responsible for teaching Biology. There is a predominance of the theoretical, verbalized and bookish form, with no insertion of practical-experimental activities, which makes student learning difficult. It concludes an unsatisfactory picture regarding the teaching of Biology manifested by the students during the research period, even recognizing that exceptionally certain teachers, in an isolated way and with their own resources, are mobilized to carry out some experimental classes.

**KEYWORDS:** Learning; Didactics; Classroom; Students perception; Biology Discipline.

### 1 | INTRODUÇÃO

São notórias as condições enfrentadas no âmbito educacional no Brasil, e isso não é diferente no ensino de Biologia, a problemática existente é quanto à aprendizagem dos alunos. O desinteresse dos alunos não está associado apenas a fatores externos à escola, mas o processo educacional tem sua parcela de culpa, especialistas dizem que muitos fatores podem contribuir para o aluno perder o interesse em uma disciplina como em Biologia.

A falta de interação do aprendiz com o objeto do conhecimento, neste caso a disciplina de Biologia, ainda parece ser um dos problemas dentro das escolas, e pode se refletir também nos conteúdos, onde o desafio principal é estabelecer nos alunos uma maior fixação e entendimento dos conteúdos.

É imperativo que as escolas construam um currículo baseado no domínio da competência e não no acúmulo de informações enfatizando que o ensinar deve ter vínculo com os diversos contextos de vida do aluno, facilitando o seu aprendizado, contribuindo para uma educação que formará indivíduos sensíveis e solidários, cidadãos conscientes dos processos e regularidades de mundo e da vida, capazes assim de realizar ações práticas, de

fazer julgamentos e de tomar decisões.

Diante desse cenário, esta pesquisa propôs a seguinte indagação: Como é o ensino de Biologia exercitado no Centro Territorial de Educação Profissional da Bacia do Rio Grande (CETEP - Bacia do Rio Grande), em Barreiras, Oeste da Bahia?

A partir desse contexto o presente estudo buscou averiguar a partir da percepção dos estudantes do curso Técnico em Agropecuária, a disciplina de Biologia ofertada nesta escola técnica estadual durante o primeiro semestre de 2019.

## **2 | PANORAMA DA FORMAÇÃO DE PROFESSORES DE BIOLOGIA**

A formação de professores vem sendo motivo de discussões intensas nos últimos anos em nosso país. Assim como o ensino de Ciências e de Biologia que vêm tendo uma crescente importância, sendo objetivo de diversos movimentos que buscam melhorias na qualidade do ensino (KRASILCHIK, 2000).

De acordo com especialistas a formação de professores é um dos principais indicadores para a qualidade do ensino e é uma questão fundamental a ser considerada (CARVALHO (1992); PEREIRA (2000) MALUCELLI (2001, 2005); KRASILCHIK (1987, 2000, 2008)).

As pesquisas têm apontado para uma descaracterização crescente nos cursos de licenciaturas, onde estes ocupam um lugar de menor prestígio em relação aos demais cursos. Pereira (2000), Malucelli (2001) e Guimarães (2004) ressaltam que isso não ocorre somente nas instâncias administrativas do ensino, mas também por parte dos professores e alunos do Ensino Superior, onde há uma tendência grande em menosprezar questões ligadas a formação para o magistério.

Uma síntese apresentada no estudo de Pereira (2000) apontou que os principais dilemas presentes nas licenciaturas brasileiras são: a separação entre disciplinas de conteúdo e disciplinas pedagógicas, a dicotomia bacharelado e licenciatura (decorrente da desvalorização do ensino na universidade, inclusive pelos docentes da área de Educação) e a desarticulação entre formação acadêmica e realidade prática de escolas e professores.

Para Malucelli (2001) os cursos de Biologia estão organizados de forma que a disciplina de prática de ensino é a única disciplina que propicia o elo entre as disciplinas de conteúdo específico e aquelas de conteúdo pedagógico.

### **2.1 O perfil dos professores de Biologia**

O professor de Biologia tem sido exposto historicamente a uma série de desafios que o obrigam a acompanhar as descobertas científicas e tecnológicas, e a grande provocação é a construção coletiva do conhecimento de forma sistematizada e acessível, o que leva tempo, estudo e dedicação. Muitos também possuem dificuldades para conviver com as novas tecnologias e linguagens do mundo atual, podendo fazer com que a formação do professor seja considerada arcaica poucos anos depois de sua formação (MOURA, 2013).

Hammarstrom Dobler et al. (2017) acreditam que os profissionais que trabalham com

a disciplina de Biologia devem vivenciar um período significativo na sua formação pessoal, visto que este período é composto por uma mescla de sentimentos, pensamentos e posições.

Gianotto e Diniz (2010) destacam que o professor de Biologia ou de qualquer outra disciplina deve fazer é simplesmente revisar seus padrões de formação, pois a maioria dos cursos de licenciatura tem seus currículos apoiados na concepção de professor, como um profissional que deverá aplicar conhecimentos adquiridos em situações específicas e, portanto, não forma o professor capaz de fazer o aluno a pensar.

Os professores como qualquer outro profissional da área da Biologia, devem estar atentos a evolução biológica, isso porque é imprescindível para a adequação e compreensão a maior parte de seus conceitos e das teorias encontradas na área de Ciências Biológicas, por isso não se deve desprezar a evolução, haja a vista que as ideias evolutivas têm papel fundamental na construção do pensamento biológico (MOURA, 2013).

Na visão de Pimentel et al. (2017) o ensino da Biologia e de Ciências está atrelado a uma metodologia que conduz tanto a teoria quanto a prática, entre conhecimento científico e o mundo ao nosso redor. Essas relações são de extrema importância, uma vez que a disciplina de Ciências e de Biologia é subtendida como uma ciência experimental, de comprovação científica, articulada a pressupostos teóricos e com isso advém a ideia de que a realização de experimentos é difundida como uma grande estratégia didática para seu ensino e aprendizagem.

Krasilchik (2008) enfatiza o papel das aulas práticas no contexto do ensino e aprendizagem na educação básica, no entanto adverte que essas atividades experimentais esbarram em diversas dificuldades como a falta de apoio pedagógico, ausência de materiais e modelos didáticos e de local apropriado. Conclui-se que a formação docente não é adequada para a realização de práticas, visto que as realizadas na graduação são preparadas por outras pessoas.

A acelerada produção de conhecimento no campo da Biologia tem desafiado os docentes, dos distintos níveis de ensino, a mediar processos que conduzam os estudantes a se apropriarem, criticamente, desses conhecimentos. Nesse sentido, a formação dos professores ocupa lugar de destaque, uma vez que o ato de ensinar necessita estar subsidiado pelos saberes da docência, os quais são plurais e heterogêneos (BINATTO et al., 2017).

## **2.2 A visão do aluno em relação a seu interesse aos assuntos da área de Ciências e de Biologia**

Carmo, Selles e Esteves (2015), relatam em suas pesquisas, que os alunos principalmente com carga horária noturna das disciplinas de Ciências ou Biologia, afirmam não gostar das disciplinas, isso porque, segundo os estudantes, as mesmas seriam de difícil entendimento, com termos complicados e palavras desconhecidas. Muitos alunos alegam ainda que, a falta de aulas práticas é um fator preponderante para seu desinteresse e de áreas como Fisiologia e Genética as mais complicadas dentro de um cabedal vasto.

Na visão de Rocha e Silveira (2018) o período que o aluno tem mais dificuldade e uma

tímida relação com os professores é na faixa do 6º ao 9º ano do Ensino Fundamental II, devido a uma grande falta de diálogo entre eles, o professor determina regras, e em muitos casos não são compreendidas pelos alunos, gerando indisciplinas e conflitos.

Silva et al. (2017) ressaltam que as mudanças ocorridas nas tendências pedagógicas são importantes para o interesse dos alunos, onde essas transformações tem a tentativa de romper o saber memorizado e valorizar o desenvolvimento pleno do educando, partindo do pressuposto de que as perspectivas intrínsecas elevando o saber externo, embora as reformas curriculares estejam tentando implantar uma tendência pedagógica, o sistema de ensino ainda está vinculado a formas tradicionalistas.

Os processos de ensino e aprendizagem têm se modificado nos últimos anos com a emergência de novas práticas de circulação livre de informações, entendendo que essas modificações possam ser um diferencial e uma motivação para os estudantes indicarem e construir maior interesse ao conteúdo que é desenvolvido em sala de aula. Um fator que pode ajudar é a aplicação da tecnologia (SILVA, 2018).

Para as aulas de Ciências e de Biologia as aulas práticas são realmente a melhor escolha para se conseguir atenção dos alunos do ensino Fundamental ou Médio, isso porque a nomenclatura, as técnicas científicas são algo novo para os estudantes. A experimentação pela via das aulas práticas, tem por objetivo despertar e manter o interesse dos alunos, envolver os estudantes na investigação científica, e desenvolver habilidades e de resolver problemas (SILVA et al., 2017).

### **2.3 Estratégias dos professores de Biologia para aplicação de aulas na contemporaneidade**

Para Binatto et al. (2017), no mundo atual, há cada vez mais a preocupação de como os alunos aprendem e como se pode facilitar esse processo, e é bom que se entenda que os professores e futuros professores devem estar munidos de estratégias e no desenvolvimento de técnicas que evidenciem as particularidades de cada turma, no sentido que complementem o trabalho do docente enquanto orientador e orquestrador de um saber implícito inerente a todo ser humano.

Os professores buscam cada vez mais pela qualificação profissional, através de formação continuada ou de outros cursos. Nessa direção, é possível pensar que a formação inicial dos professores é apenas uma primeira fase do processo de desenvolvimento profissional da carreira docente e que esta enfrenta problemas diversos, que vão desde o grau de empenho de cada profissional no enfrentamento das dificuldades individuais até as características e limitações das diferentes instituições de ensino superior (CARMO, SELLES E ESTEVES, 2015).

É de suma importância a qualificação dos educadores para o avanço de uma reforma educacional que possa atender as necessidades educativas de todos alunos, infelizmente são poucos os professores que tem preparação adequada, fundamentada na visão pró-ativa do sujeito, se qualificando em busca de algo novo, numa aprendizagem constante

(PEREIRA, 2017).

Quando os professores percebem os espaços das escolas como sendo ambientes multiculturais, eles podem adaptar suas propostas educativas às realidades dos sujeitos que frequentam esses lugares, podendo compartilhar saberes e promover a coexistência pacífica entre as diferentes culturas, de modo que esses professores de Biologia participem de estudos e qualificações adequadas para se firmarem nesse meio bastante concorrido e pouco qualificado da educação (LEITE; ZANON, 2018).

Atualmente a simples aquisição de informações não pode ser mais encarada como suficiente para que os indivíduos se posicionem de maneira consciente e embasada na sociedade. Assim parece razoável que as metodologias utilizadas nos diferentes níveis de escolaridade, incluindo o superior, busquem mais do que ensino baseado na memorização (URSI, 2017).

Carvalho e Guimarães (2016) defendem a tecnologia como interface de aprendizagem para o ensino de Ciências e de Biologia, sendo que as Tecnologias da Informação e Comunicação (TICs), são uma necessidade cada vez imediata, ganhando cada vez mais destaque na área educacional, sendo um elo de ligação entre o conhecimento e o aluno, rejeitando, dessa forma, o ensino baseado na transmissão de conhecimentos.

Silva et al. (2017) reconhecem que as aulas práticas são uma das metodologias para as aulas de Ciências e de Biologia, melhorando assim o conteúdo e seu processo de ensino-aprendizagem do conteúdo-teórico. Para se aplicar uma metodologia diferenciada, é necessário atentar-se para a realidade do aluno, reconhecendo suas potencialidades, seus valores e suas lutas, baseando-se na troca de conhecimentos, e das experiências cotidianas, construindo subsídios que o ajudem a tornar protagonista de sua própria história (GÓIS et al., 2018).

### 3 | METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Centro Territorial de Educação da Bacia do Rio Grande (CETEP - Bacia do Rio Grande), sediada na cidade de Barreiras, Oeste do Estado da Bahia. A escola técnica estadual foi criada em 2009, a fim de atender as demandas da região buscando contribuir de forma efetiva para o estudo e desenvolvimento do Território. Hoje o CETEP - Bacia do Rio Grande oferece os cursos de Técnico em Agropecuária, Técnico em Comércio, Técnico em Logística, Técnico em Informática e Técnico em Enfermagem.

A pesquisa envolveu 108 discentes do curso Técnico em Agropecuária, das turmas únicas A e B do 1º e 2º ano que estavam vivenciando a disciplina Biologia no transcorrer do primeiro semestre de 2019. O fio condutor dessa investigação buscou se fundamentar nos preceitos éticos adotando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) como instrumento de anuência para adesão do partícipe na pesquisa.

A coleta de dados ocorreu por meio da aplicação de questionário composto por 05 questões visando buscar elementos que fundamentem a resposta ao questionamento dessa

pesquisa. Entende-se que o questionário é um instrumento de coleta de dados muito utilizado tanto em pesquisas quantitativas quanto qualitativas (LÜDKE; ANDRÉ, 2013).

Os resultados da investigação foram avaliados através de uma abordagem qualitativa em que se empregou a análise do conteúdo como técnica de estudo. Para Bardin (1977) análise de conteúdo é um conjunto de técnicas de análise das comunicações, que utiliza procedimentos sistemáticos e objetivos de descrição do conteúdo das mensagens.

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao serem questionados se possuíam empatia pela disciplina de Biologia. Os alunos do curso Técnico em Agropecuária das turmas do 1º e 2º ano foram enfáticos em afirmar que sim, mais pelos componentes curriculares do que pela metodologia aplicada pelo professor. Binatto et al. (2017) acreditam que a situação do atual ensino brasileiro exige cada vez mais uma renovação dos padrões de ensino, tornando-se necessária a inclusão de ideias inovadoras ao ensino atual, fugindo assim dos modos ultrapassados do ensino tradicional tão difundido.

Na concepção de Góis et al. (2018) as aulas de Biologia quando bem trabalhadas por metodologias inovadoras podem significar um ganho no processo de ensino e aprendizagem, principalmente se forem utilizadas na forma de experimentação como ocorre em aulas práticas. Diferente do método tradicional onde os conteúdos são repassados aos alunos de forma expositiva, enquanto que no método inovador, ocorre a realização de aulas práticas e os alunos participam do processo de ensino.

A segunda questão buscou entender se o estudo da Biologia é importante para o dia a dia dos estudantes. Em ambas as turmas os discentes, foram categóricos em afirmar que a disciplina de Biologia é importante para suas vidas enquanto cidadãos. A disciplina de Biologia deve abordar o cotidiano, demonstrando um mundo acarretado por mudanças contínuas, oriunda dos processos de desenvolvimento da ciência e fornecedora de benefícios à sociedade, uma vez que o campo da Biologia tem destaque entre as ciências de ponta, e marca profundamente os avanços científicos desde o século passado (SILVA, 2018).

Gianotto e Diniz (2010) defendem que a preparação dos professores para ensinar a Biologia, requer um engajamento de ideias, um enriquecimento de práticas e o estudo constante para a preparação de aulas onde os alunos possam se sentir mais conscientes e críticos no processo de ensino-aprendizagem.

Quando perguntados sobre os métodos utilizados em sala de aula pelos professores. Observou-se que o trabalho em grupo alcança os maiores resultados e preferência dos estudantes atingindo unanimidade nas turmas pesquisadas. Binatto et al. (2017) entendem que com o passar do tempo o aluno perde o interesse pelas aulas de Ciências e de Biologia se o ensino seguir a linha tradicional do quadro e giz, assim a aula acaba virando rotina, não chamando a atenção dos alunos para os conteúdos abordados. É preciso tornar o ensino mais atrativo, que motive o estudante a construir seu próprio conhecimento, por isso a importância

da utilização de diferentes recursos didáticos no ensino de Ciências e de Biologia.

Ursi (2017) discute que a falta de interesse pelos alunos na contemporaneidade está ligado a diversos fatores, como a falta de estrutura e investimento, mas o fator principal seja o modelo pedagógico adotados nos dias atuais, onde a má qualidade das aulas está totalmente ligada a falta de metodologias inovadoras pelos docentes, que na sua grande maioria foram mal preparados na formação inicial.

Uma solução para enfrentar o desinteresse por parte dos alunos diante o ensino de Biologia é a necessidade de se decidir o que ensinar e como ensinar, com base no interesse dos alunos, na experiência dos professores, e no contexto local. O objetivo do ensino de Ciências e de Biológica é formar alunos que consideram a ciência interessante e importante, com aplicação direta em sua próprias vidas, e aptos à conversas sobre ciência que ocorrem na sociedade (KRASILCHICK, 2008).

Sobre a opinião do que deve ser melhorado no ensino da Biologia, destaca-se que os alunos se interessam por atividades práticas em suas aulas. As mudanças ocorridas nas tendências pedagógicas ao longo dos anos possibilitaram a construção de uma nova ideia, de romper o saber memorizado e desenvolver o entendimento pleno do estudante, elevando o saber externo, na tentativa de uma educação que contenha uma metodologia de qualidade no desenvolvimento da criticidade do aluno (OLIVEIRA; COSTA, 2016).

Murigi et al. (2017) afirmam que os professores devem estar preparados para um processo metodológico diferenciado, pautado em práticas de ensino- aprendizagem que aproximem o aluno à realidade, sem apostar em métodos mecanizados, sem inspiração e desgastantes aos olhos do alunado.

A importância de aulas práticas é comumente difundida, pois contribui para a motivação do estudante no intuito de despertar sua curiosidade e criatividade, preparando-o melhor para a percepção da ciência no seu dia a dia. Outro fator existente são os espaços diferenciados como os planetários, zoológicos, aquários públicos ou privados, museus e demais locais (OLIVEIRA; COSTA, 2016).

A utilização de atividades experimentais como mecanismo instrucional, requer do professor uma relação com o seu saber profissional não se limitando a saberes simples, mas sim, na construção de atividades empíricas em prol da da criticidade e da contestação dos saberes prévios (PIMENTEL, 2017).

Em relação à avaliação do professor de Biologia, as turmas indicaram uma ação pedagógica razoável do professor. Essa avaliação se deu em decorrência da extensiva rotina de aulas teóricas, em que as atividades práticas se faziam muito raramente presentes, e quando ocorriam eram mais motivadas pela ação individual do professor do que pelo aparato e apoio da coordenação pedagógica disponível na escola.

Covos et al. (2018) enfatizam que o perfil dos alunos nos dias atuais vem mudando de modo que, cabe aos profissionais docentes criarem maneiras interessantes para os alunos que muitas das vezes se mostram cansados de metodologias pouco empolgantes e envolventes no seu processo de ensino-aprendizagem.

O ensino passa a ser concebido como uma atividade reflexiva, e os professores sendo

profissionais em permanente aprendizagem, possibilitam pela prática reflexiva, à interpretação das ações que programam na sala de aula, e justifica as decisões que tomam a partir do desenvolvimento de atitudes e capacidades de reflexão e sobre a ação que desenvolvem (URSI, 2017).

As mudanças no ensino de Biologia devem se basear em formas polidimensionais, traduzidas em aulas expositivas e caracterizadas por aulas práticas e leves, agindo ativamente na construção do conhecimento, a partir de conhecimentos que já possuem sobre os fenômenos, por meio de oportunidades oferecidas pelos professores (HAMMARSTROM DOBLER et al., 2017).

O lúdico pode ser uma opção no trabalho da disciplina de Biologia, pois são potentes ferramentas a serem utilizadas no intuito de garantirem aulas mais competentes para comunicação do conhecimento e para o desenvolvimento de um processo de ensino-aprendizagem visto como mais eficiente, além disso, jogos interativos, didáticos são formas de ludicidade que podem acarretar em aulas mais interessantes e participativas (COVOS et al., 2018).

## 5 | CONCLUSÃO

Constatou-se que os alunos do curso Técnico em Agropecuária das turmas de 1º e 2º anos pesquisados durante o primeiro semestre de 2019 demonstraram empatia com a disciplina de Biologia, percebendo-a como instrumento de cidadania. Do mesmo modo, os discentes valorizam atividades em grupo como mais atrativo e motivador e elevam as atividades práticas como uma metodologia a ser adotada tornado o ambiente de ensino mais reflexivo e pro-ativo.

Conclui-se um quadro insatisfatório com relação ao ensino de Biologia manifestado pelos estudantes durante a pesquisa, mesmo reconhecendo que excepcionalmente certos professores, de maneira isolada e com recursos próprios, se mobilizam para realizar algumas aulas experimentais.

## REFERÊNCIAS

BARDIN, L. **Análise de conteúdo**. Lisboa: Edições 70, 1977.

BINATTO, P.F. et al. Análise das reflexões de futuros professores de Biologia em discussões fundamentais pelo enfoque CTS. **Revista Brasileira de Pesquisa e Educação em Ciências**, Belo Horizonte, v.17, n. 3, p.931-951, set./dez. 2017.

CARMO, E.M.; SELLES, S.E.; ESTEVES, M.M. Concepções de professores de Biologia sobre a profissão docente. **Revista Educação, Sociedade e Cultura**, Rio de Janeiro, n.44, p.87-106. 2015.

CARVALHO, A.M P. Reforma nas Licenciaturas: Necessidades de uma mudança de paradigmas mais do que de mudança curricular. **Em Aberto**, Brasília, v. 12, n. 54, p. 51-62, abr./jun.1992.

CARVALHO, L. de J.; GUIMARAES, C.R.P. Tecnologia: um recurso facilitador do ensino de Ciências e Biologia. In: Encontro Internacional de Formação de Professores, 9., 2016, Aracaju. **Anais...**

COVOS, J.S.et al. O novo perfil de alunos no ensino superior, e a utilização de jogos lúdicos para facilitação do ensino-aprendizagem. **Revista Saúde em Foco**, Sorocaba, n.1, 2018.

GIANOTTO, D.E.P.;DINIZ, R.E. da S. Formação inicial de professores de Biologia: a metodologia colaborativa mediada pelo computador e a aprendizagem para a docência. **Revista Ciência e Educação**, Maringá, v. 16, n. 3, p. 631-648, 2010.

GÓIS, R.R.P.Q.R. et al. As tecnologias utilizadas no ensino de Biologia aplicadas a Educação no campo. In: Congresso Internacional de Educação e Tecnologias. Horizonte, 2018. **Anais...**

GUIMARÃES, V.S. **Formação de Professores: Saberes, identidade e profissão**. Campinas: Papyrus, 2004.

HAMMARSTROM DOBLER, G. et al. O ensino de Biologia: da formação profissional aos nuances escolares. **Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.5, n.1, p.45-57. 2017.

KRASILCHIK, M. **O Professor e o currículo de Ciências**. São Paulo: EPU EDUSP, 1987.

\_\_\_\_\_. Reformas e realidade: O caso do ensino de Ciências. **São Paulo em Perspectiva**. São Paulo, v. 14, n.1, 2000.

\_\_\_\_\_. **Prática de ensino de Biologia**. São Paulo: ed. USP, 2008.

LEITE, F.A.; ZANON, L.B. Estilos de pensamento de professoras da área de Ciências da natureza em processo de investigação-ação. **Revista Insignare Scientiae**, Porto Alegre, v.1, n.1, jan./abr. 2018.

LÜDKE, M.; ANDRE, M.E.D.A. **Pesquisa em educação: abordagens qualitativas**. São Paulo: E.P.U., 2013.

MALUCELLI, V.M.B. Análise crítica da formação dos profissionais da educação: Revisando a Licenciatura em Biologia. **Diálogo Educacional**. Paraná, v. 2, n. 4, p 139-152, Jul. /dez. 2001.

\_\_\_\_\_. O professor universitário como pesquisador em ação. **Estudos de Biologia**. Paraná, v. 27. n. 61, p. 37-42, out./dez.2005.

MOURA, J. et al. Biologia/Genética: O ensino de Biologia, com enfoque a genética, das públicas no Brasil- breve relato e reflexão. **Revista Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 167-174, jul./dez., 2013.

MURIGI, L.C.et al. O caderno do professor do Estado de São Paulo e o discurso de Autoajuda nas metodologias de ensino da Língua Portuguesa. **Revista Eletrônica de Letras**, São Paulo, v.10, n.10, jan-dez, 2017.

OLIVEIRA, M.A.R.; COSTA, F.S. Atividades práticas e espaços diferenciados para o ensino de Ciências e Biologia. **Revista Maiêutica**, Indaial, v.4, n.1, p.69-78, 2016.

PEREIRA, J.E.D. **Formação de Professores: Pesquisa representação e poder**. Belo Horizonte: Autêntica, 2000.

PEREIRA, J.E.J. **Por uma escola para todos: Uma análise sobre Educação Inclusiva e uma escola de Juazeirinho-PB**. 2017. TCC ( Graduação em Pedagogia) – Universidade Federal da Paraíba, Taperoá, 2017.

PIMENTEL, P.M.S. et al. Teoria e prática no âmbito do ensino médio: análise de casos no Piauí e Ceará para o ensino de Biologia. **RENCIMA**, Teresina, v.8, n.3, p.158-173, 2017.

ROCHA, S.M.; SILVEIRA,Z.M .Ensino de Ciências no 4º ano do Ensino Fundamental: Reprodutivo ou problematizador. **Revista Saberes pedagógicos**, Criciúma, nº1, jan./jun. 2018.

SILVA G.F. et al. Percepção da escola sobre a importância das aulas práticas no processo de Ensino-aprendizagem de Biologia: Um estudo de caso nas escolas de Ensino médio na cidade de Bom Jesus – Piauí. **Revista Diálogos e Contrapontos**, Teresina. v.1 n.2, p.31-58, ago./dez. 2017.

SILVA, R.F. A concepção dos alunos do ensino Médio sobre a importância das aulas práticas de Biologia. **Revista Diversitas Journal**, Santana do Ipanema/AL, v.3, n.3, p.564-568, set./dez. 2018.

URSI, S. Promoção da autonomia do estudante: experiência vivenciada na disciplina estratégias e instrumentos educacionais para o Ensino de Ciências e Biologia. **Revista de Graduação da USP**, São Paulo, v.2, n.2, jul. 2017.

## GLOSSÁRIO ONLINE DE BOTÂNICA COMO RECURSO DIDÁTICO PARA O ENSINO MÉDIO

*Data de submissão: 04/05/2020*

*Data de aceite: 18/06/2020*

### **Rebeca Melo Barboza**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas/CCS.

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/6589682945032205>

### **Bruno Edson-Chaves**

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu (FECLI).

Iguatu – Ceará

Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.

São Paulo – São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/3869403766919153>

### **Eliseu Marlônio Pereira de Lucena**

Universidade Estadual do Ceará, Curso de Ciências Biológicas/CCS e Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais/CCT.

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/2639402429072222>

**RESUMO:** O presente trabalho objetivou elaborar um glossário online de botânica e verificar sua importância no processo de ensino e aprendizagem de botânica no Ensino Médio. Para tanto, foram elencados 373 termos e algumas imagens correspondentes e publicados na web. Este foi avaliado por 17 professores da

rede estadual de ensino público de Fortaleza, assim como por meio do SAM e SMOG. Para os professores, o material foi considerado como um bom recurso didático, atrativo e de linguagem acessível aos discentes do Ensino Médio. Pelo SAM e SMOG a ferramenta foi classificada como excelente e satisfatória, respectivamente. Portanto, conclui-se que o glossário online de botânica produzido pode facilitar a busca e a pesquisa do conteúdo de botânica, enriquecendo o ensino e aprendizado de Botânica no Ensino Médio.

**PALAVRAS-CHAVE:** Educação básica. Ensino de botânica. Metodologia de ensino. Material didático. Ferramenta online.

### ONLINE GLOSSARY OF BOTANY AS A HIGH SCHOOL TEACHING RESOURCE

**ABSTRACT:** The present work aimed to elaborate an online glossary of botany and to verify its importance in the teaching and learning process of botany in high school. To this end, 373 terms and some corresponding images were listed and published on the web. This was evaluated by 17 teachers from the state public school system of Fortaleza, as well as through SAM and SMOG. For teachers, the material was considered as a good didactic resource, attractive and language accessible to high school students. By SAM and SMOG the tool

was rated excellent and satisfactory, respectively. Therefore, it's concluded that the online botany glossary produced can facilitate the search and research of botany content, enriching the teaching and learning of botany in high school.

**KEYWORDS:** Basic education. Botany teaching. Teaching methodology. Teaching material. Online tool.

## 1 | INTRODUÇÃO

A internet é um importante meio de comunicação, informação e expressão; devendo, os educadores, considerá-los como uma forma de expressão entre eles e os alunos (ANDRADE, 2011). Tal processo de comunicação é vantajoso para o aluno, proporcionando melhor comunicação, maior interatividade entre os participantes (BICUDO, 1999) e aguçando a curiosidade em relação ao que está sendo ensinado (SOUZA, 2010). Atuando também na motivação dos discentes, uma vez que se mostra como um recurso inovador e oferecem muitas fontes de pesquisa (MORAN et al., 2007).

Tais aspectos demonstram que os recursos tecnológicos, como informática e redes de telecomunicações, possuem um grande potencial educativo (MACHADO, 2000), de modo que sua utilização contribui para um processo de ensino-aprendizagem diferente e inovador (GARCIA, 2013). Contudo, Nunes (2008) afirma que para sejam alcançados os resultados que garantam a qualidade do ensino é preciso saber como aplicar tais metodologias.

Embora o uso deste recurso não seja uma ferramenta de aprendizagem comum na sala de aula (BOZZA, 2016), pode ser utilizada em diversas áreas do conhecimento, como a Botânica; área em que há uma preocupação na busca de práticas pedagógicas contextualizados com as realidades sociais, culturais, políticas, econômicas, ambientais locais e globais (FIGUEIREDO et al., 2012).

A abordagem do conteúdo de botânica no ensino básico apresenta diversos problemas, um deles é a falta de interesse dos alunos por esse conteúdo (MENEZES et al., 2009), devido, dentre outros aspectos, à didática utilizada, ausência de aulas práticas, falta de vínculo com a realidade e a linguagem técnica da área (MELO et al., 2012). Contudo, a curiosidade dos alunos pode ser despertada ao relacionar o que aprenderam na escola com a sua realidade (SANTIN; ROZA, 2010). Neste sentido, a tecnologia pode ser uma importante aliada para auxiliar a dinamizar e melhorar os métodos de ensino (LIMA et al., 1999), sendo a internet um meio facilitador e de motivação dos discentes (MORAN et al., 2007).

Uma vez que materiais online como glossários adaptados a alunos do ensino médio são escassos (ALBUQUERQUE et al., 2013). Assim, de forma a aproximar a botânica com a realidade do aluno, objetivou-se elaborar e avaliar um glossário online de botânica, visando contribuir com a melhoria do ensino e da aprendizagem da botânica no ensino médio.

## 2 | METODOLOGIA

O presente trabalho enquadra-se como uma pesquisa documental de caráter quanti-qualitativo do tipo descritiva (GIL, 1994).

### *Levantamento dos termos científicos de botânica e criação da web site*

O glossário foi elaborado a partir dos termos em destaque (em negrito) que apareciam na secção de botânica de sete livros didáticos de biologia aprovados pelo Programa Nacional do Livro Didático (PNLD) 2015 para os alunos do ensino médio da rede pública (BRASIL, 2015) (Tabela 1). Após a escolha dos 373 termos, estes foram enumerados, digitalizados, seguida do levantamento das definições de cada verbete, com base nos livros didáticos selecionados. Posteriormente, os termos com suas respectivas definições foram organizados em ordem alfabética.

<b>Livro</b>	<b>Volume</b>	<b>Autor (s)</b>	<b>Editora</b>
Biologia	2	Mendonça (2013)	AJS
Biologia	2	Silva-Júnior et al. (2013)	Saraiva
Ser protagonista: biologia	2	Takeuchi e Osorio (2013)	Moderna
Conexões com a biologia	2	Bröckelmann (2013)	Moderna
Biologia hoje	2	Linhares e Gewandsnajder (2013)	Ática
BIO	3	Lopes e Rosso (2013)	Saraiva
Biologia em contexto	3	Amabis e Martho (2013)	Moderna

**Tabela 1.** Livros didáticos do PNLD 2015 selecionados para a elaboração do glossário online de botânica.

Após esta etapa, foram selecionadas imagens referentes a cada um dos termos; essas imagens foram adquiridas de sites, os quais foram devidamente citados.

Os termos selecionados compuseram o glossário, o qual foi disponibilizado no site <http://glossario-de-botanica.webnode.com/> (BARBOZA; LUCENA, 2016), permitindo aos usuários que realizem pesquisas rápidas e fáceis buscando arquivos do próprio site. O site também foi criado na versão móvel.

### *Análise do glossário online de botânica por professores da educação básica*

O glossário online de botânica foi avaliado por 17 professores de Biologia de 12 escolas da Rede Estadual Pública de Ensino Médio de Fortaleza em todas as diferentes Secretarias Executivas Regionais (SER I, II, III, IV, V e VI).

A pesquisa segue os pressupostos éticos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), cujo número do processo é 53289916.7.0000.5534. Neste sentido, inicialmente foi feita a apresentação do glossário para os professores de Biologia. Após a explanação, leitura e observação do site os mesmos preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar da pesquisa, seguido do preenchimento dos questionários.

O questionário proposto aos professores foi composto de 10 perguntas relacionadas ao uso do glossário. As perguntas eram objetivas e subjetivas com o intuito de analisar os seguintes parâmetros: (i) acessibilidade da linguagem utilizada no material, (ii) se o glossário é uma ferramenta auxiliadora na transmissão de conhecimentos sobre botânica, (iii) atratividade do material, (iv) contribuição do glossário na aprendizagem de botânica, (v) importância do material para os alunos do ensino médio, (vi) facilidade de compreensão das imagens pelos discentes, (vii) utilização do material analisado durante as suas aulas e se eles recomendariam o glossário de botânica para os seus alunos. De acordo com Gray (2012), os questionários permitem uma abordagem analítica explorando as relações entre as variáveis.

### *Análise do glossário online de botânica por meio do SAM e SMOG*

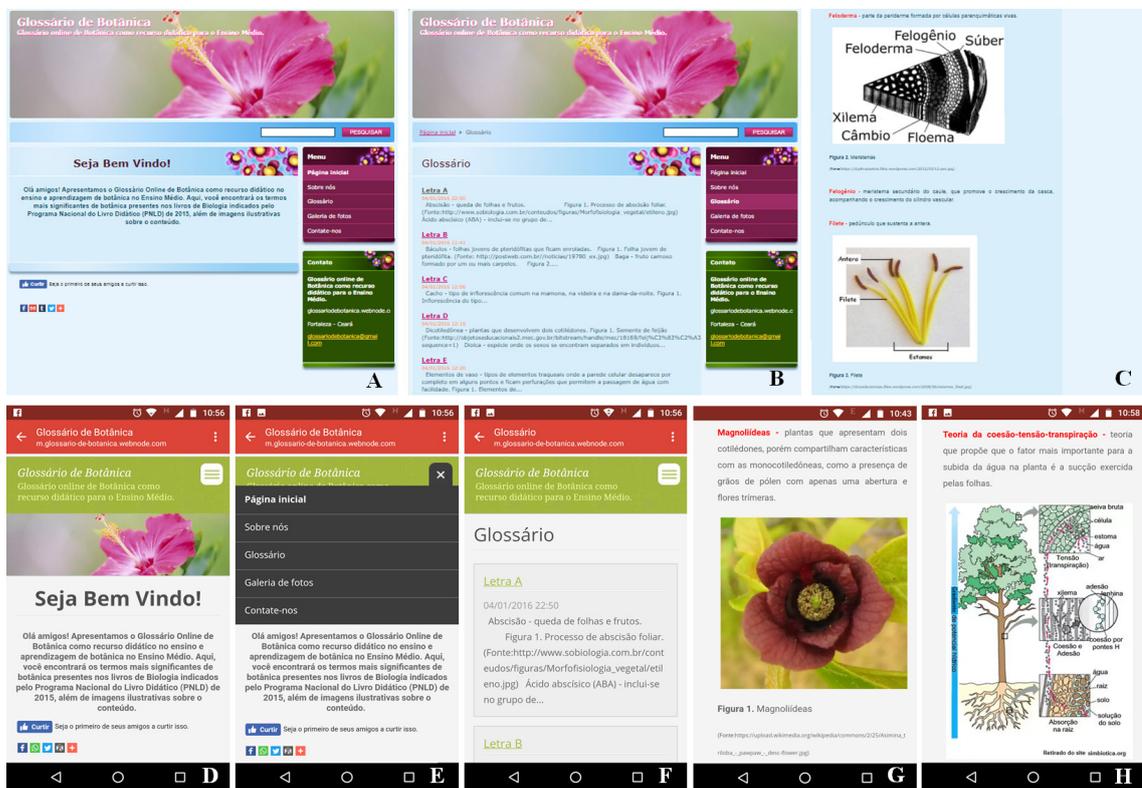
O glossário online de botânica foi analisado através de dois sistemas avaliativos de validação, o *Suitability Assessment of Materials* (SAM) e o *Simple Measure of Gobbledygook* (SMOG).

O SAM é uma ferramenta que avalia materiais didáticos, aferindo sua capacidade de ser adequado ou não adequado. O método é considerado eficiente, uma vez que identifica as deficiências dos materiais analisados, possibilitando sua correção e adequação (DOAK et al., 1996). Por outro lado, o SMOG avalia o nível de leitura dos materiais didáticos, estimando, quantos anos de escolaridade são necessários para compreender o material avaliado (MCLAUGHLIN, 1969).

Para utilização do SMOG é necessário a escolha 30 frases do texto, sendo 10 no início, 10 no meio e 10 no final do material. A escolha das frases/verbetes foi feita através de sorteio no site <http://www.sorteador.com.br>. As frases iniciais foram retiradas dos verbetes 1 a 124, as frases do meio dos verbetes 125 a 249 e as frases finais dos verbetes 250 a 373. Uma vez que o SMOG é uma técnica feita para língua inglesa, Amaral (2016) sugere que além do método tradicional (contando palavras trissilábicas e polissilábicas), utilize-se o método adaptado, contando-se apenas as polissilábicas, isso é importante uma vez que o português apresenta palavras mais extensas.

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A utilização de páginas da web (Figuras 1A-C) através do “Webnode” permite a construção de sites de forma simples e com diversos *layouts* básicos para personalização, podendo ser destinada a grupos de trabalho e a indivíduos que desejam criar sites pessoais. Acrescenta-se ainda a versão móvel (Figuras 1D-H), para celulares e tablets, funcionando como um subsídio a mais para um acesso rápido e fácil.



**Figura 1.** Exemplificação da versão do site para computadores (superior) e disponíveis móveis (inferior) do site. A- Página inicial do site, mostrando o menu e os links interativos para computadores; B – Página inicial do Glossário; C – Exemplo dos verbetes; D e E – Página inicial do site em versão móvel, mostrando o menu e os links interativos; F - Página inicial do Glossário; G e H - Exemplo dos verbetes.

Tais fatos tornam o instrumento mais atrativo ao público-alvo que hoje se apresenta conectado às mais diversas ferramentas tecnológicas. Brasil (2016) informa que a internet é utilizada diariamente por mais da metade da população, especialmente no ambiente domiciliar seja através do telefone celular ou por um computador pessoal e o tempo médio de uso diário é superior às 4h30min.

Na página principal do site há ícones que dão acesso direto a redes sociais (Figuras 1A, 1D e 1E) para a difusão da informação, onde o usuário poderá compartilhar com os demais o conteúdo o qual está acessando, facilitando no repasse das informações principalmente entre o público-alvo (alunos do ensino médio) que estão presentes nas mais diversas redes sociais.

Os recursos tecnológicos oferecem um processo educacional com mais qualidade, além de possibilitar uma inclusão digital e maior dinamização do ensino e da aprendizagem. Salienta-se ainda que o uso da tecnologia apresenta diversas vantagens quando utilizada de forma adequada na educação (ANDRADE, 2011).

Os 373 verbetes presentes no glossário apresentam aspectos da anatomia vegetal (Figura 1C), morfologia externa (Figura 1C), taxonomia (Figura 1G) e fisiologia vegetal (Figura 1H). Segundo Caldas (2008), a biologia muitas vezes é vista como uma disciplina que gera enormes dificuldades para o aluno devido a gama de vocábulos de estruturas que abrangem o funcionamento de todos os seres vivos. Embora haja uma série de Glossários disponíveis, seja em livros específicos para tais fins ou em apêndices de livros-textos de botânica

(SCHULZ, 1969; ESAÚ, 1974; GONÇALVES; LORENZI, 2007; PEREIRA; PUTZKE, 2010; CUTLER et al., 2011; NABORS, 2012; EVERT; EICHHORN, 2014) muitos estão disponíveis apenas na versão impressa e em assuntos específicos, além de serem mais indicados a estudantes de ensino superior.

Comparado aos glossários supracitados, o glossário online de botânica apresenta um número de termos consideravelmente alto, 373 vocábulos, salientando ainda que ele é indicado para estudantes do ensino médio. Almeida (2000) ainda acrescenta que o uso dos dicionários tradicionais está se tornando cada vez mais defasado, uma vez que a internet fornece informações instantâneas se mostra como uma ferramenta muito mais prática e atrativa para os jovens que dicionário impresso.

No tocante à organização e disposição dos termos na plataforma, o glossário está organizado de acordo com os assuntos de botânica trabalhados no ensino médio. À medida que os termos são selecionados na aba “Glossário”, seus conceitos e imagens aparecem de forma fácil e simples.

O material produzido disponibiliza figuras em 207 termos, o que significa que 55,5% dos vocábulos são representados por uma imagem que é inserida logo abaixo do verbete apresentado, apoiando o texto e facilitando a compreensão do material por parte do leitor. As ilustrações são representadas de diferentes formas, como através de desenhos (Figura 1C), fotografias (Figuras 1C e 1G) e esquemas (Figura 1H). Na aba “Galeria de fotos” apresenta as imagens da capa dos livros selecionados para o desenvolvimento do glossário.

Brasil (2005), afirma que 75% da percepção humana é visual, seguida pela percepção auditiva (20%) e as outras capacidades de perceber o mundo somam somente 5%. As imagens fazem parte do cotidiano do ensino de biologia, especialmente nos aspectos relacionados aos seres vivos (REICHMANN; SHIMIN, 2007). Assim, materiais didáticos que apresentam imagens tornam-se mais atrativos, uma vez que as ilustrações complementam o seu poder comunicativo, pois esclarece e amplia a mensagem contida no texto (JOTTA, 2005).

Para uma maior praticidade do glossário, existe um campo de busca (Figuras 1A e 1B) no canto superior direito da página que localiza os termos no site, o que permite que o usuário do site encontre de forma mais rápida e fácil o verbete desejado.

### *Avaliação SAM*

De acordo com o parâmetro avaliativo “SAM” (Tabela 2) obteve-se pontuação final de 27 escores que representado em porcentagem significativa de 79,41%. Dos parâmetros avaliados merecem destaque o conteúdo, aspectos gráficos, layout e tipografia e estímulo ao aprendizado que tiveram mais de 50% dos critérios aplicáveis indicados como excelente.

O resultado demonstra que o glossário online produzido é um excelente material, possibilitando sua utilização como uma ferramenta didática que pode auxiliar o processo de ensino e aprendizagem desse conteúdo no ensino médio. Ressalta-se ainda que os dados foram superiores ao encontrados nas análises feitas por Almeida et al. (2016) e Miranda et al. (2017) para seus respectivos materiais didáticos.

Parâmetro	Critérios	Pontuação	
Conteúdo	Objetivo é evidente	2-	Excelente
	Os conteúdos sobre comportamento	2-	Excelente
	Competência limitada	2-	Excelente
	Resumo ou revisão incluída	0-	Não se aplica
	Nível de leitura	1-	Adequado
Demanda de alfabetização	Estilo de escrita	1-	Adequado
	Vocabulário	1-	Adequado
	Contexto	1-	Adequado
	Marcadores auxiliares de aprendizagem	1-	Adequado
	São usadas legendas	1-	Adequado
Gráficos	Tipos de ilustrações	2-	Excelente
	Relevância das ilustrações	2-	Excelente
	Listas, tabelas, gráficos entre outros	0-	Não se aplica
	São usadas legendas	2-	Excelente
Layout e tipografia	Layout	1-	Adequado
	Tipografia	2-	Excelente
	Utilização de Subtítulos	2-	Excelente
Estímulo ao aprendizado	Interações	0-	Não se aplica
	Padrões de comportamento desejados	0-	Não se aplica
	Motivação	2-	Excelente
Adequação cultural	Correspondência cultural	2-	Excelente
	Imagens culturais	0-	Não se aplica

**Tabela 2.** Pontuações dos fatores aferidos pela análise do SAM. Na pontuação temos: 0 (não se aplica), 1 (adequado) ou 2 (excelente). Após todos os critérios terem sido avaliados somam-se os pontos e compara-se com a tabela existente em Doak *et al.* (1996) para verificar o nível do material produzido.

### Avaliação SMOG

Após a seleção e análise das 30 frases através do método SMOG (Tabela 3) verificou-se 100 palavras, ou seja, o leitor precisaria ter 13 anos de estudo, o que corresponde ao aluno que esteja cursando o 3<sup>a</sup> ano do ensino médio ou 1-3<sup>o</sup> semestre do ensino superior. Pelo método alternativo, foi contabilizado 39 palavras, assim o leitor precisa ter 10 anos de estudo, o que equivale ao aluno que concluiu ou estejam cursando o 9<sup>o</sup> ano do ensino fundamental ou 1<sup>o</sup> ou 2<sup>o</sup> ano do ensino médio. A análise de distribuição dos anos escolares em função dos anos de estudos tomou como base os dados propostos no trabalho de Lyra e Amaral (2012). Portanto, apenas através do método alternativo, a análise do glossário online de botânica mostra-se adequada em relação ao nível de ensino apresentado.

Nf	Nv	Frases selecionadas	C1	C2
1	14	Consiste na retirada da camada externa do xilema, ao longo de um anel completo ao redor do caule.	6	1
2	29	Folhas jovens de Pteridófitas que ficam enroladas.	2	2
3	35	É a um só tempo caule e folhas subterrâneas.	1	1
4	47	Caule aéreo rastejante em que há enraizamento em vários pontos.	3	2
5	55	Tipo de célula presente no gametófito masculino imaturo.	5	3

6	61	Células alongadas que formam o estômato.	3	2
7	87	Substância impermeabilizante.	2	2
8	94	Fruto carnoso que possui uma só semente, que fica unida ao endocarpo, formando um caroço.	7	1
9	108	São células muito duras do esclerênquima que ajudam na sustentação e proteção dos embriões de algumas sementes.	7	2
10	116	Esporófito diploide.	2	1
11	129	Fase diploide do ciclo de vida produtora de esporos e proveniente de um zigoto.	5	2
12	135	Pedúnculo que sustenta a antera.	3	1
13	152	Hormônios que migram das folhas até a gema, pelo floema, induzindo a floração.	4	1
14	174	Célula haploide reprodutora.	3	1
15	194	São caules finos, flexíveis e verdes.	1	0
16	217	Fruto seco deiscente que se divide em segmentos na maturação.	4	1
17	224	Meiose ocorre na formação de esporos.	4	0
18	239	São plantas pequenas e delicadas, que vivem em ambientes úmidos e sombreados, como barrancos e troncos de árvores no interior das matas.	8	4
19	243	Região do caule de onde partem as folhas e as gemas axilares.	2	1
20	256	Tecido que ocupa espaços entre outros tecidos e formam boa parte da medula e do córtex dos caules e das raízes.	6	0
21	263	Estrutura que prende à flor ao caule.	1	1
22	270	Conjunto de tépalas.	2	0
23	287	Regiões das traqueídes que não têm lignina.	3	1
24	296	Forma-se do receptáculo de uma flor com muitos ovários pequenos.	4	1
25	304	Polinização feita por morcegos.	2	2
26	326	Tegumento que reveste internamente a nucela.	4	2
27	335	Grupos de esporângios.	1	1
28	353	Caules lenhosos, fortes e bem ramificados.	2	1
29	361	Vasos condutores de seiva bruta.	1	1
30	372	Disseminação de sementes feita por animais.	2	1
TOTAL (30 frases selecionadas)			100	39
Raiz quadrada do valor total + 3 (McLaughlin, 1979)			13	10

**Tabela 3.** Verbetes e suas respectivas explicações analisadas pelo SMOG. De forma a abranger o glossário em sua totalidade as frases escolhidas foram divididas em três partes, dos verbetes 1-124, 125-249 e 250-373. Nf. Número da frase; Nv. Número do verbo. C1. Contagem de palavras trissilábicas ou polissilábicas. C2. Contagem de palavras polissilábicas.

Estudos de SMOG é muito comum em cartilhas didáticas, assim, utilizando o método tradicional Miranda et al. (2017) verificaram 11 anos de estudo, enquanto Almeida et al. (2016) e Rolim (2016) acharam 14 anos de estudos. Pelo método alternativo, Rolim (2016) e Silva (2018) obtiveram 12 anos de estudos e sete das 11 cartilhas do IBAMA analisadas por Amaral (2016) estavam na faixa de 11 anos de estudo ou superior. Assim, observa-se que pelo método tradicional o glossário didático está semelhante a outros recursos didáticos; contudo, pelo método alternativo tal instrumento mostra-se mais acessível.

### *Avaliação dos professores de biologia*

A escolha de entrevistar os docentes (e não os discentes) sobre a contribuição do glossário online de Botânica baseia-se no fato de que é o professor que mais entende sobre os métodos que devem ser usados em sala de aula, uma vez que este conhece as dificuldades dos alunos. Neste interim, Rangel (2008) afirma que a metodologia de ensino e aprendizagem é escolhida de acordo com as características cognitivas e escolares do aluno.

Ao ser questionado sobre se a linguagem utilizada era acessível ao público-alvo (alunos do ensino médio), 25% consideraram o material com linguagem “Excelente”, 56,25% “Ótima”, 12,5% “Bom” e 6,25% “Regular”. Confirmando dados obtidos pelo SMOG, e atendendo um dos objetivos do material que é desmistificar os termos botânicos em uma linguagem acessível. Dentre os pontos destacados pelos professores ressalta-se que o glossário é sucinto, e de fácil compreensão, mesmo apresentando termos técnicos.

Nesse sentido, Leitão et al. (2005) afirma que a linguagem de um material didático deve ser clara, objetiva e coloquial, adequada às características do público-alvo, e deve considerar principalmente o nível de escolaridade, idade e interesse. Isso permitirá ao aluno uma leitura leve, agradável e de fácil compreensão.

Todos os entrevistados ainda afirmaram que o glossário online é um recurso facilitador e auxiliador na transmissão de conhecimento sobre botânica. De acordo com Borges (2000) a utilização de materiais didáticos enriquece as aulas, contribuindo na formação dos professores.

Segundo Almeida (2003), há uma deficiência em relação às formas de ensino, onde se percebe uma dificuldade do aluno no tocante à motivação deste em aprender e de repassar as informações de forma organizada e se apropriando de conceitos construídos. Dessa forma, é necessário inovar nos métodos utilizados, de modo que a informação seja repassada de forma simples e com qualidade para os jovens. Neste aspecto, a internet mostra-se como uma das melhores formas para se aprender, uma vez que grande parte dos jovens utiliza esse meio para subsidiar seu conhecimento.

O glossário também foi considerado atrativo por todos os entrevistados. 39,8% consideraram o glossário atrativo por ser online; 33,3% consideraram as imagens como principal fator e 27,1% o nível de leitura. Vale destacar que o glossário foi criado para funcionar como uma ferramenta didática atrativa aos alunos do ensino médio, bem como, um auxílio no desenvolvimento das aulas dos professores. Os elementos presentes no glossário como imagens, leitura acessível e formato online, favorecem o interesse pela consulta e leitura do material, tornando-se, desta forma, um instrumento didático atrativo ao público-alvo ao qual se destina.

Segundo Albuquerque et al. (2013), a tecnologia no tocante a Biologia facilita muito a compreensão dos processos biológicos, uma vez que permite a sua demonstração por meio de animações, figuras, vídeos e gifs, os quais auxiliam na retenção do conteúdo dessa disciplina.

Almeida (2000) também comenta que um jovem busca muito mais pesquisar na internet do que consultar um dicionário para obter a informação desejada, processo que se torna

muito mais prático, uma vez que os recursos tecnológicos disponibilizam uma gama de informações que podem ser acessadas de forma rápida.

Ainda neste contexto, Miranda et al. (2017) salienta que, juntos, palavras e imagens ensinam com uma dinâmica própria e complementar, demonstrando para os alunos um novo nível de comunicação e ampliando as possibilidades de compreensão dos conteúdos.

Ainda de acordo com todos os avaliadores/professores, o glossário pode contribuir para a aprendizagem de botânica no ensino médio, mostrando-se com elevada importância para os discentes desta faixa escolar. Neste contexto, destacam-se as seguintes falas:

Atualmente, temos contato com diversas tecnologias que auxiliam no aprendizado (ex.: computador, tablete, celular). Portanto, o glossário online pode ajudar o aluno em qualquer ambiente, desde em casa até na escola. A botânica é um conteúdo considerado complicado, por alguns, e por isso essa ferramenta, que pode ser acessada em qualquer canto e que pode auxiliar (Professor 2).

Muitas aulas são interativas, mesmo que ainda não seja a realidade vivenciada nas escolas públicas. Mas, a interatividade favorece uma interdisciplinaridade o que traz benefícios na aprendizagem da Botânica através de um glossário online (Professor 9).

Muito importante porque os alunos, muitas vezes, ficam entediados de procurar definições nos livros didáticos. O glossário certamente deixará as pesquisas mais dinâmicas (Professor 11).

Importante para juntar a interação que eles gostam, com o aprendizado de termos que eles encontram nos livros didáticos e outros meios de pesquisa (Professor 17).

Por ser uma ferramenta online, o glossário pode contribuir para a aprendizagem de botânica. Almeida (2007) destaca que a utilização de recursos tecnológicos durante o processo de ensino e aprendizagem possibilita novos meios de ensinar e aprender, distinguindo-se dos módulos tradicionais. E as verdadeiras contribuições das tecnologias na educação surgem a partir do momento que são usadas como mediadoras para a construção do conhecimento.

A importância de tal recurso concorda com Sousa (2005), o qual afirma que é incontestável a importância de dicionários como instrumento didático, uma vez que funciona como um recurso auxiliar no desenvolvimento de competências no processo de aprendizagem.

Os professores foram questionados se as imagens do glossário são de fácil compreensão para os alunos do ensino médio, neste aspecto, 88,2% dos entrevistados responderam “Sim” e 11,8% responderam “Não”. Dentre as justificativas positivas, destacam-se:

As imagens foram bem selecionadas e são bem ilustrativas para o ensino (Professor 1).

O glossário está bem atrativo com as imagens claras, ajudando os alunos a correlacionarem com os conceitos (Professor 5).

As imagens são chamativas, e tem a capacidade de prender a atenção dos alunos (Professor 13).

Por outro lado, dentre as justificativas negativas, podem ser citadas:

A maioria sim, apesar de pensar que algumas imagens visualizadas por microscópio tornar-se de difícil compreensão! (Professor 2).

Algumas imagens são muito complexas (Professor 10).

Nas salas de aula de Ciências, a exploração das imagens junto aos alunos é um importante recurso a serviço do professor, este auxilia na capacidade de observação e possibilita melhor a representação dos diversos aspectos da vida. Contudo, é necessário utilizar as ilustrações, explicando as diversas interpretações que podem ser retiradas a partir da análise delas (SOUTO; SILVA, 2008).

Contudo, de acordo com Tomio et al. (2013) observa-se uma dificuldade que os estudantes apresentam em interpretar as diversas representações visuais de Biologia, desta forma, faz-se necessário uma alfabetização visual com uma melhor exploração desses recursos no ensino dessa disciplina em sala de aula.

Todos os professores entrevistados recomendariam o glossário online de botânica aos seus alunos e 88,2% utilizariam este recurso didático em suas aulas. Segundo Miranda (1995), o glossário funciona como uma ferramenta que auxilia o professor, uma vez que permite sistematizar conceitos assim como facilita a transmissão de conhecimentos em área específica.

De forma mais específica, os conteúdos de biologia no ensino médio apresentam uma gama maior de informações científicas quando comparados aos apresentados no ensino fundamental. Dessa forma, muitas vezes o discente não compreende essas novas terminologias, o que poderá acarretar num déficit de aprendizagem dessa disciplina (ALBUQUERQUE et al., 2013).

## **4 | CONCLUSÃO**

Com base no exposto, o glossário online de botânica vem como uma ferramenta didática auxiliadora, de fácil acesso, que pode permitir ao discente a compreensão de termos e conceitos do conteúdo de botânica no ensino médio, que por vezes é considerado de difícil entendimento.

## **5 | AGRADECIMENTOS**

Aos professores de Biologia das Escolas Públicas de ensino médio de Fortaleza-CE pela avaliação do glossário online de botânica.

## **6 | AUTORIZAÇÕES/RECONHECIMENTO**

Todos os autores se responsabilizam pelo conteúdo da obra, bem como, autorizam a submissão da mesma, a devida editora.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. C. S., COELHO, J. F. R., RODRIGUES, N. R.; COSTA, R. S. Criação de um dicionário virtual para incremento do aprendizado da biologia no ensino propedêutico. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFRN, 9., 2013, Natal. **Anais...** Natal: Instituto Federal do Rio Grande do Norte. p. 1-9.
- ALMEIDA, F. B. B.; MENDES, R. M. S.; LUCENA, E. M. P.; EDSON-CHAVES, B. Manual teórico-prático de Criptógamas como recurso auxiliar nas aulas práticas no ensino superior. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n.4, p. 243-249, 2016.
- ALMEIDA, M. E. B. Educação a distância na internet: abordagens e contribuições dos ambientes digitais de aprendizagem. **Educação e Pesquisa**, v. 29, n. 2, p. 327-340, 2003.
- ALMEIDA, M. E. B. T. M. P. **O computador na escola**: contextualizando a formação de professores. 265 f. Tese (Doutorado em Educação) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ALMEIDA, M. E. B. Tecnologias digitais na educação: o futuro é hoje. In: ENCONTRO DE EDUCAÇÃO E TECNOLOGIAS DE INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO, 5., 2007, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2007.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia em contexto**. São Paulo: Editora Moderna, 2013.
- ANDRADE, A. P. R. **O uso das tecnologias na educação: computador e internet**, CE. 22 f. 2011. Monografia (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) – Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas a distância, Consorcio Sententrional de Educação a distância, Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.
- BARBOZA, R. M.; LUCENA, E. M. P. **Glossário de botânica**. Fortaleza: UECE, 2016. Disponível em: <<https://glossario-de-botanica.webnode.com/sobre-nos/>>. Acesso em: 04 mai. 2020.
- BORGES, G. L. A. **Formação de professores de biologia, material didático e conhecimento escolar**, SP. 436 f. 2000. Tese (Doutorado em Educação) – Faculdade de Educação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- BOZZA, T. C. L. **O uso da tecnologia nos tempos atuais**: análise de programas de intervenção escolar na prevenção e redução da agressão virtual. 261 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Educação) - Programa de Pós-Graduação em Educação, Faculdade de Educação da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- BRASIL, A. C. **A revolução das imagens: uma nova proposta para o telejornalismo na era digital**. Rio de Janeiro: Editora Ciência Moderna, 2005.
- BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Média e Tecnológica. **Orientações curriculares para o ensino médio**: ciências da natureza, matemática e suas tecnologias. Brasília: MEC/SEF, 2006.
- BRASIL. Secretaria de Comunicação Social da Presidência da República. **Pesquisa brasileira de mídia 2015**: hábitos de consumo de mídia pela população brasileira. Brasília, 2015.
- CALDAS, C. Descobrimos os significados de estruturas vegetais. **Ciências e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 58-59, 2008.
- COSTA, S. S. O uso das tecnologias da informação e comunicação no âmbito pedagógico e administrativo. In: SIMPÓSIO REGIONAL DE EDUCAÇÃO/COMUNICAÇÃO, 1., 2010, Aracaju. **Anais...** Aracaju: GECES. p. 1-11.
- DOAK, C. C., DOAK, L. G.; ROOT, J. H. **Teaching patients with low literacy skills**. 2. ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1996.

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 1994.

GRAY, D. E. **Pesquisa no mundo real**. 2. ed. Porto Alegre: Penso, 2012.

JOTTA, L. A. C. V. **Embriologia animal**: uma análise dos livros didáticos de biologia do ensino médio. 244 f. 2015. Dissertação (Mestrado em Educação) – Faculdade de educação, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

LEITÃO, C., FIGUEIREDO, G., SANTOS, H., LEAL, M. L., TEIXEIRA, M., NUNES, S., ROCHA, S.; FONSECA, V. **Elaboração de material didático impresso para programas de formação a distância**: orientações aos autores. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2005.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F. **Biologia hoje**. 2. ed. São Paulo: Editora Ática, v. 2, 2013.

LISKA, G. J. R. 2015. O dicionário online de língua como importante recurso didático. In: UNIVERSIDADE, EAD E SOFTWARE LIVRE, 9., 2015, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UEADSL.

MACHADO, A. V. **Métodos e meios de ensino: categorias básicas da tecnologia educacional**. Ouro Preto: Escola Técnica Federal de Ouro Preto, 2000. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/revista/arquivo/rev16/machado.htm>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

MCLAUGHLIN, G. H. SMOG grading: a new readability formula. **Journal of Reading**, v. 12, n. 8, p. 639-649, 1969.

MENDONÇA, V. L. **Biologia**: os seres vivos. 2. ed. São Paulo: Editora AJS, 2013. v. 2.

MENEZES, L. C., SOUZA, V. C., NICOMEDES, M. P., SILVA, N. A., QUIRINO, M. R., OLIVEIRA, A. G., ANDRADE, R. R.; SANTOS, C. Iniciativas para o aprendizado de botânica no ensino médio. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 11., 2009, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba.

MIRANDA, L. G. M. Aplicação de base metodológica para pesquisa em socioterminologia na elaboração de um glossário demonstrativo em fitopatologia. **Ciência da Informação**, v. 24, n. 3, p. 1-6, 1995.

MIRANDA, R. R.; MENDES, R. M. S.; BONILLA, O. H.; PANTOJA, L. D. M.; EDSON-CHAVES, B. Desvendando a vegetação do Parque Botânico Estadual do Ceará através de uma cartilha educativa. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 2, p. 68-77, 2017.

MORAN, J. M., MASSETO, M. T.; BEHRENS, M. A. **Novas tecnologias e mediação pedagógica**. 13. ed. Campinas: Editora Papirus, 2007.

RANGEL, E. O.; BAGNO, M. **Dicionários em sala de aula**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006.

RANGEL, M. **Métodos de Ensino para a aprendizagem e dinamização das aulas**. 2. ed. Campinas: Editora Papirus, 2008.

REICHMANN, D. R. X. T.; SCHIMIN, E. S. Imagens: contribuição para o ensino-aprendizagem em biologia. In: PARANÁ. Secretaria de Estado da Educação. Superintendência de Educação. **O professor PDE e os desafios da escola pública paranaense**. Curitiba: SEED/PR, 2007. v. 2, p. 1-25.

RIGOLON, R. G., SANTOS, P. A. G. F., FEIO, R. N.; SANTOS, J. A. D. Ensino de nomenclatura zoológica: a utilização de um *folder* com termos gregos e latinos. In: V ENCONTRO REGIONAL SUL DE ENSINO DE BIOLOGIA, 5. / SIMPÓSIO LATINO AMERICANO E CARIBENHO DE EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 4., 2011, Londrina. **Anais...** Londrina: SBenBio. p. 1-9.

SANTIN, D.; ROZA, N. L. **Botânica no ensino médio**: uma análise metodológica com ênfase nas aulas práticas. 39 f. 2010. Monografia (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2010.

SANTOS, F. S. A. Botânica no Ensino Médio: será que é preciso apenas memorizar nomes de plantas? In: SILVA, C. C. (Org.). **Estudos de história e filosofia das ciências**: subsídios para aplicação no ensino. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2006. p. 223-243.

SILVA-JÚNIOR, C., SASSON, S.; CALDINI-JÚNIOR, N. **Biologia**. 11. ed. v. 2. São Paulo: Editora Saraiva, 2013.

SOUSA, A. M. O uso do dicionário em sala de aula. In: JORNADA NACIONAL DE LINGUÍSTICA E FILOLOGIA DA LÍNGUA PORTUGUESA, 3., 2005, Acre. **Anais...** Acre: Universidade Federal do Acre – UFAC.

SOUTO, A.; SILVA E. P. Q. Ciência, criatividade e imagem. In: PAVÃO, A. C.; FREITAS, D. (Orgs.). **Quanta ciência há no ensino de ciências**. São Carlos: Editora UFSCar, 2008. p. 309-315.

TAKEUCHI, M. R.; OSORIO, T. C. **Ser protagonista**: biologia. 2. ed. v. 2. São Paulo: Edições SM, 2013.

TOMIO, D., GRIMES, C., RONCHI, D. L., PIAZZA, F., REINICKE, K.; PECINI, V. As imagens no ensino de ciências: o que dizem os estudantes sobre elas? **Caderno Pedagógico**, v. 10, n. 1, p. 25-40, 2013.

## ECOPEDAGOGIA: EDUCAÇÃO PARA O MEIO AMBIENTE

*Data de submissão: 06/03/2020*

*Data de aceite: 18/06/2020*

### **Magda Regina Santiago**

Pesquisadora Científica do Instituto Biológico de  
São Paulo  
São Paulo – SP

Link para o Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8986574815260371>

### **Márcio Marastoni**

Bacharel e Licenciado em Letras, Psicanalista  
e Diretor Acadêmico do Instituto Oráculo de  
Psicanálise

São Pedro – SP

Link para o Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5980169579278516>

### **Pero Torquato Moreira**

Professor de Ciências na Prefeitura de Barueri  
Barueri – SP

**RESUMO:** Inafastável é a perseguição por debates que fortifiquem políticas educacionais que transitem pela temática da Ecopedagogia, seja na direção do pulular conscientizador do discurso da sustentabilidade ambiental, seja na trilha de se propor atividades práticas que situem faticamente a educação promotora, no final, da educação direcionada para o meio ambiente. O objetivo geral deste artigo é aprofundar e multiplicar o espírito exurgente da

denominada Ecopedagogia, especificamente alinhavando sinalizações do que no dia a dia se pode, a partir do ensino, fazer nascer de atividades ecológicas. O método empregado é o da pesquisa qualitativa, esta baseada na revisitação bibliográfica de autores que recentemente se dedicaram ao assunto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Meio Ambiente, Sustentabilidade, Ecopedagogia.

### **ECOPEDAGOGY: EDUCATION FOR THE ENVIRONMENT**

**ABSTRACT:** Unstoppable is the persecution for debates that strengthen educational policies that go through the theme of Ecopedagogy, either in the direction of the popular awareness of the discourse of environmental sustainability, or on the path of proposing practical activities that positively situate the education that promotes, in the end, education for the environment. The general objective of this article, therefore, is to deepen and multiply the emerging spirit of the so-called Ecopedagogy, specifically by aligning signs of what can be born from ecological activities in everyday life. The method used is that of qualitative research, based on the bibliographic revisiting of authors who recently dedicated themselves to the subject.

**KEYWORDS:** Environment, Sustainability, Ecopedagogy.

## 1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável é adotado como política pública por todos ou praticamente todos os países do mundo, com encaminhamentos que, em razão dos interesses e peculiaridades próprias, divergem-se em parte um dos outros. O mesmo pode ser afirmado em razão da sustentabilidade mais proximamente conexas às questões ambientais, algo a interessar, com intensidades diversas, às respectivas sociedades e respectivos ministérios da educação (HOWES et al., 2017).

No Brasil, a Lei de Diretrizes e Bases Educacionais e outras leis e dispositivos a ligarem meio ambiente e educação caminham de fato para políticas de ensino e aprendizagem que façam inserir nas escolas, como ocorre com as planificações programáticas de ciências diversas, conteúdos que eduquem os futuros cidadãos para a preservação de caráter ambiental e demais olhares ambientalmente edificantes (SILVA, 2017).

Em sentido mais clássico, por assim dizer, a abordagem educacional voltada para o meio ambiente visa restabelecer equilíbrios dinâmicos entre o meio ambiente, o mundo social, a Ciência, a economia e a cultura. A partir dessa definição, baseada na interação entre esses diferentes campos, a educação para o desenvolvimento sustentável é uma educação transversal que integra os desafios do desenvolvimento sustentável nos novos programas de ensino da escola primária e nos currículos de escolas atinentes ao ensino médio, tecnológico e profissional, além de proposituras constantes no seio das universidades (SOUSA, 2018).

De qualquer modo, a necessidade premente e constante de se tratar do meio ambiente sob o critério da sustentabilidade entrelaça-se explicitamente com o caráter basilar da educação atual, incluindo educação para o desenvolvimento e solidariedade internacional, educação em saúde, educação artística e cultural, e, finalmente, com o que se cunhou por denominar de ecopedagogia (BAHR; SWEENEY, 2019).

Sob este contexto, sabendo-se da educação como parte essencial da estratégia nacional (e internacional) de transição ecológica da realidade atual para o desenvolvimento ambientalmente sustentável, é que caminha este texto, concentrando-se no objetivo geral de mais ainda ratificar a finalidade e o alcance que a ecopedagogia se propõe, bem como, especificamente, apontar interações fáticas entre educação e sustentabilidade ambiental.

Metodologicamente cuida-se da exploração, descrição e análise de cunho qualitativo de material bibliograficamente pesquisado, valendo-se os autores de textos recentes como fonte, desde que escritos originalmente no idioma pátrio (português) e inglês (em virtude do alcance dessa língua pelo mundo no ambiente acadêmico-científico).

## 2 | A SUSTENTABILIDADE

### 2.1 Principais Aspectos

Para Sarkis e Zhu (2017, p. 65)

O Desenvolvimento Sustentável é a forma de desenvolvimento que não agride o meio

ambiente de maneira a não prejudicar o desenvolvimento vindouro, ou seja, é uma forma de desenvolver sem criar problemas que possam atrapalhar ou impedir o desenvolvimento humano e da própria natureza no futuro próximo e remoto.

Prosseguem desta vez Di Vaio e Varriale (2017, p. 24) ensinando que:

O desenvolvimento atual, não obstante trazer melhorias à população, trouxe inúmero desequilíbrio ambiental, como o aquecimento global, o efeito estufa, o degelo das calotas polares, poluição, extinção de espécies da fauna e flora dentre tantos outros. A partir de tais problemas pensou-se em maneiras de produzir o desenvolvimento sem que o ambiente seja degradado, incluindo o meio ambiente urbano a abrigar as pessoas propriamente.

A partir das constatações dos anos de 1980, as diversas organizações (empresariais ou não) passaram a se preocupar com alguns aspectos relativos à sustentabilidade, quais sejam:

Atender às necessidades fisiológicas da população, com a alimentação saudável, o acesso à água potável etc.;

Preservar o meio ambiente para as gerações futuras;

Conscientizar a população para que se trabalhe em conjunto e de modo sustentável;

Preservar os recursos naturais, incluindo o restauro de logradouros destruídos;

Criar um sistema social eficiente que não permita o mal aproveitamento dos recursos naturais;

Criar programas de conhecimento e conscientização da real situação socioambiental e de formas para otimizar o manejo ou as diversas relações havidas com o meio ambiente;

Propiciar o desenvolvimento conjunto de todas as entidades de modo perene, sustentável.

O desenvolvimento sustentável não precisa ser visto como uma revolução, ou seja, uma medida brusca que demanda rápida adaptação, mas uma medida evolutiva que progride de forma mais lenta, porém mais sólida, a fim de integrar a evolução humana ao meio ambiente e tendo por meta obter o desenvolvimento sem degradação.

Existem três linhas indispensáveis para inserir a aplicação do desenvolvimento sustentável e de suas respectivas ações sustentáveis: Desenvolvimento Econômico, Desenvolvimento Social e Proteção Ambiental. Esses devem ser dependentes um do outro, conquanto caminhem de forma homogênea e concomitante (SARKIS; ZHU, 2017).

A percepção mais comum da ideia de desenvolvimento sustentável e de suas ações nesta direção remete ao conceito ecológico do termo sustentabilidade que o define como a capacidade de um sistema ecológico (ecossistema) de atender às necessidades das populações que nele vivem, inclusive sob o aspecto legal. Sob este raciocínio lógico, mantém-se o senso comum de que o desenvolvimento sustentável se traduz em promover aumento ou a manutenção das atividades econômicas de modo a preservar o meio ambiente, incluindo a natureza (mais imediatamente pensada), mas também os seres humanos, tão carentes de bem-estar, este por sua vez formado pela alimentação, acesso à educação, água potável, tratamento de seus dejetos, ar limpo, ocupação laborativa, o não desperdício e a reciclagem (a atingir qualquer prática comercial ou não comercial) etc.

Nesta direção, como sinalizam Wilkie, Graunke e Cornejo (2015), a economia da cultura e da prática sustentável se justifica como uma perspectiva de empreendimento do desenvolvimento perene (duradouro) em que atividade produtiva, em relação a outras

possibilidades, abrange essencialmente um conjunto de tecnologias limpas e inofensivas à natureza, mas que também se vincula, cada vez mais, com o reconhecimento e tratamento digno da espécie humana que precisa receber formação sobre o que vem a ser a ecologia adequadamente respeitada e preservada.

No entanto, o desejo idealizado em questão é bem mais amplo, e segue ligado a dois princípios fundamentais como sustentam Donato e Souza (2016). O primeiro é o de garantir aos membros das futuras gerações um nível de desenvolvimento *per capita* igual ou superior aquele recepcionado pelos membros da geração atual. O segundo, de que os sucessos relativos de determinados programas sejam viáveis se confrontados com a tese de sua projeção para uma escala socioambiental que perdure ao longo do tempo (DONATO; SOUZA, 2016).

Ou seja, a lógica do desenvolvimento sustentável é fundada na ética, na solidariedade, na preservação, na cultura da repartição dos dividendos, sempre passando pela informação qualificada. Fazendo uma simples analogia, é não adiar para os próximos moradores, para os vizinhos ou para os habitantes de outro bairro, a obrigação de administrar com mais dificuldade o entulho e os gastos que são gerados ao reformar um jardim ou ampliar a rede de saneamento local, vez estar saturada, exemplificadamente.

Ainda por exemplos bem simples, já pensando sob o ponto de vista das ações positivas dadas a partir do mundo empresarial e de quem atua com tecnologia, é não supervalorizar a vida do cliente em detrimento do próprio funcionário, é ajudar a comunidade local a viver de modo mais saudável, é não depositar lixo em lugares inapropriados e outras tantas políticas sustentáveis. O fundamento do desenvolvimento sustentável é óbvio e, assim, primário, sempre pensando no respeito ao próximo e, no caso das organizações, vincular tais ações naturalmente a cada uma de suas marcas: é algo desejável (KIRSCHKE; NEWIG, 2017).

Para que isso seja possível no plano da sociedade, existem condições básicas que precisam ser identificadas ou inventadas, quais sejam: capacidade inata a ser potencializada, existência dos recursos naturais necessários para dar subsídio ao desenvolvimento; capacidade na seara da tecnologia para efetivar seu uso de forma sustentável, preservando a condição original do ecossistema; capacidade de sustentação referente ao potencial da comunidade em agir em prol da própria coletividade, assumindo a condição *sine qua non* de que ela seja simultaneamente provedora e cliente do processo; adoção por parte das empresas de políticas não egoísticas, culminando por dividir com seu cliente interno e externo as possibilidades de partilhar a riqueza oriunda da consciência preservacionista (KIRSCHKE; NEWIG, 2017).

Mais do que isto, e em especial em função deste texto, a visão socialmente correta de que a sustentabilidade impõe aos governos na atualidade exige destas a prática de tal ideal, fomentando ações comunitárias, auxílios educacionais, criação de cooperativas e uma infinidade de ações que podem, a partir da força que os organismos sociais já possuem, multiplicar positivamente a sustentabilidade do ponto de vista humano, antropológico — é o caso de se ensinar crianças e jovens sobre o valor e a praticidade de se cultivar hortas comunitárias, de viabilizar a compostagem etc. (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

Com o conhecimento científico disponibilizado, ainda mais cultivado pelo grande conjunto de novidade que é todo o rol abarcado pela tecnologia da comunicação, é muito difícil entender a verdadeira natureza do desejo moderno do homem por desenvolvimento econômico a todo e qualquer custo e sem dispendere recursos para ajudar o próximo a percorrer seu caminho de modo mais leve e, repete-se, sustentável.

Nenhuma espécie viva, com efeito, à exceção do homem, empreende esforços de desenvolvimento na direção do crescimento material. Este crescimento, sob as formas em que é compreendido, deságua sempre em algum tipo de agressão contra o ser humano e o meio ambiente (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

Mesmo o conceito de desenvolvimento sustentável pode ser contraditório (contradição de palavras ou ainda de semântica). Qualquer melhoria econômica, sob a moldura que o homem quer empreender, significa acumulação de capital e o esgotamento de alguma categoria de recursos geralmente não renováveis, como o é o combustível fóssil ou mesmo como se dá, em extensão analítica, em face do próprio homem a não ter mais tanto espaço adequado de moradia, água tratada, oportunidade de emprego em face da automação dos processos e serviços etc.

A expansão de áreas urbanas unicamente, junto com o erigir de estradas, consome a cada ano, em todo o mundo, só para elucidar, em torno de 1,06 milhões de quilômetros quadrados de terra cultivável, constituindo-se estas, em geral, as mais preciosas. De outro modo, a automação fez com que 3,3% da população economicamente ativa mundial perdesse seus postos de trabalho ao longo dos vinte anos compreendidos pelas décadas de 1980 a 1990 em todo o planeta (KIRSCHKE; NEWIG, 2017).

Desta maneira, o desenvolvimento, tal como percebido pelo planeta, não pode ser literalmente sustentável, carecendo de atitudes positivas e efetivas por parte de administradores públicos e privados, sem a adoção de práticas sustentáveis reais e do ensino desta filosofia e prática, principalmente por parte das escolas. Elas precisam conhecer sua capacidade e missão de promover o pensamento voltado para o bem-estar individual e coletivo, isto valendo não só para a questão dos recursos naturais propriamente, mas permeando também a elevação da qualidade da vida na terra — é a Ecopedagogia a se sobressair como uma das importantes e urgentes ciências educacionais do presente (SOUSA, 2018).

Durante o século XXI a sociedade global enfrenta a difícil, porém inspiradora tarefa, de compor uma nova relação com o mundo natural, assim considerado. Se se desejar dar sustento a vida com qualidade, dever-se-á antes buscar o equilíbrio entre as ações humanas e as ações tipicamente protetivas afeitas ao meio ambiente e à sociedade em que se vive.

Para Siqueira e Assad (2015), o desafio sustentável que enfrenta a humanidade consiste em encontrar, em um difícil contexto teórico-prático, as respostas que tenham capacidade efetiva para preservar a biosfera e produzir uma relação sociedade-natureza equilibrada, ou seja, harmonizar homem e meio ambiente, considerando evidentemente o meio ambiente (em todos os lugares e condições atuais existentes) como algo de crucial observância, melhora e importância.

O mundo atual, apesar do reconhecimento da relevância da concepção de

desenvolvimento sustentável, percorre trilhas que desafiam qualquer noção de sustentabilidade.

Ressalta-se que um dos argumentos mais fortes a favor de dar prioridade à proteção do meio ambiente e das diversas comunidades e ao desenvolvimento sustentável é a necessidade ética de garantir que as futuras gerações tenham as mesmas oportunidades que as gerações que as precederam, mas para isso é preciso dizer da realidade, recontar das descobertas nesta seara, ensinar. Outro argumento pode ser debatido favoravelmente à posição de evidência da prática ecopedagógica: a questão de a comunidade humana ter que assumir o controle de sua própria evolução cultural no presente e não se colocar à margem dela, observando a natureza a impor mudanças à medida que os sistemas ambientais entram em colapso (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

As questões fundamentais que precisam ser consideradas em qualquer discussão relacionada ao desenvolvimento sustentável e à prática sustentável a ser ensinada nas escolas (e mesmo fora delas, claro) são sempre o bem-estar humano, o meio ambiente e o futuro.

Desse modo, temas como poluição, biodiversidade, exploração de recursos naturais, efeitos climáticos, empregabilidade, entre outros, devem ser relacionados — tanto para análise quanto para a implementação de soluções ao desemprego, pobreza, riqueza, novas tecnologias e seus usos, valores culturais, organizações políticas e sociais, palco do ensino público e particular (DONATO; SOUZA, 2016). Se não se ensina, a velocidade do autoaprendizado é lenta e por vezes, sequer alcançada.

### 3 | A ECOPELAGOGIA

Pontua-se que crianças e jovens constituem a linha principal do que se convencionou chamar de Ecopedagogia, disciplina a abrigar o ensino e o modo de se ensinar (Pedagogia) e a Ecologia, unidas na direção de despertar, notadamente no público sob idade escolar — mas alcançando os adultos — a consciência e o agir favoravelmente à sustentabilidade ambiental (NARANJO-GIL, 2016).

Sua ação visa integrar, nos programas de ensino, conceitos que interessam os jovens, analisando problemas e medidas locais para ampliá-los e remediar as investidas contra a natureza, enquanto desenvolve suas habilidades em sustentabilidade ambiental.

Os programas ecopedagógicos precisam incentivar os jovens a ir além das fronteiras institucionais e a entender o contexto do desenvolvimento sustentável. A exemplo, se um projeto de gerenciamento de resíduos é realizado por uma turma no *campus* da escola, os alunos não apenas lidam com os aspectos ambientais do gerenciamento de resíduos, mas também com questões como meios de subsistência, saúde, empreendedorismo, coleta e disposição de resíduos, conhecimento e prática, esta tendente a ser multiplicada em suas moradias, propriedades (SIQUEIRA; ASSAD, 2018).

Inicialmente, poder-se-ia distinguir, por um lado, a educação ambiental, oferecendo

uma abordagem naturalista da criança em seu ambiente local, mas, essencialmente, em razão de um meio ambiente distante, constante dos livros (essa é a pedagogia praticada em meados do século XX pelas instituições educacionais). Por outro lado, caminhou-se adiante para a educação para a preservação e o desenvolvimento sustentável do meio ambiente, esta praticada antes por associações de solidariedade internacional e que se concentrou, anteriormente a tudo, em conscientizar pessoas por todo o mundo acerca dos desafios que a ajuda dos salvadores dos animais das décadas de 1970 e 1980 precisavam — berço primeiro do apelo ambiental do presente (SARKIS; ZHU, 2017).

Esses dois modelos de educação evoluíram paralelamente no mundo associativo e dissociativo da educação global.

A proliferação das mudanças climáticas tornou ainda mais urgente questionar os modelos de desenvolvimento e seu impacto no meio ambiente. A abordagem educacional hodierna, finalmente, tende a fazer as pessoas pensarem em construir uma sociedade mais unida, treinando cidadãos para entender questões globais, estabelecendo o elo entre aspectos sociais, ambientais, econômicos e de governança — ainda que parta de realidades muito locais, o que se dá muito eventualmente.

Diante dos desafios globais, a ambição da Ecopedagogia e de todo o rol de corolários inscritos no desenvolvimento ambientalmente sustentável é ensinar e convidar os cidadãos (ainda que jovens) a uma reflexão sobre a evolução da sociedade que respeite sistematicamente os seres humanos e a natureza (SARKIS; ZHU, 2017).

Educar para o meio ambiente, segundo Sousa (2018), por outras palavras, é recriar o vínculo entre as pessoas e seus ambientes naturais, sociais e culturais. Isso pode ser conseguido fornecendo conhecimento científico, pontos de referência culturais e sensoriais, descobrindo um lugar, uma troca, as riquezas nos diversos habitats existentes; é produzir uma horta, colher a sombra de uma árvore sem lá depositar vestígios da intervenção humana de caráter maléfico.

### 3.1 O Fazer Ecopedagógico

A educação ambiental moderna enfatiza o incentivo direcionado para a vontade de agir e a competência do ser humano para administrar com extremo respeito os recursos naturais a partir de interesses individuais e patentemente sociais, econômicos e ecológicos. Os objetivos da educação ambiental, portanto, coincidem amplamente com os da educação para o desenvolvimento sustentável.

Experiências pelo mundo têm sinalizado para a Ecopedagogia como fator de conhecimento e prática ecologicamente sustentável, como o caso de se propor a viabilização de instalações voltadas para a compostagem de material orgânico, este que, a partir de unidades trabalhadas dentro dos espaços escolares, acabam ganhando a comunidade local.

Bonoli, Zanni e Awere (2019) reportam que, na Palestina, uma dezena de escolas se estruturou, recentemente, na direção de organizar a decomposição de material orgânico produzido dentro das próprias unidades escolares, reutilizando-o.

Explica-se que o processo natural da reciclagem se constitui na decomposição de material orgânico que é facilitado pelo que se denomina de compostagem, nada mais se traduzindo como uma concentração e aceleração desse processo. Depositando-se esse tipo de material em único lugar, os microrganismos lá atuam, alimentando-se de restos de frutas, legumes, verduras e folhagens diversas, quebrando as células que os compõem. O resultado é adubo de qualidade a ser aproveitado no cultivo de plantas diversas (HOWES et al., 2017).

Nessas escolas da Palestina, as crianças se responsabilizam por recolher o material orgânico oriundo da limpeza das muitas hortas comunitárias existentes no interior das unidades, passando diariamente também pelas cozinhas e cantinas escolares a recolher sobras e partes desses produtos não utilizados. A varredura dos canteiros da escola e o resultado da poda da jardinagem do local, feitas por funcionários, são também objeto de recolha por parte dos alunos, destinando tudo para as composteiras (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

O adubo se forma quando os materiais são reunidos em um grande recipiente de plástico ou de madeira resistente, lá sobrepostos, umedecidos e arejados. Fungos, bactérias e invertebrados são capazes de assumir o processo de decomposição, com a compostagem acontecendo. No final, o produto é o húmus, matéria orgânica marrom e escura que se acumula no depósito de material orgânico. Além disto, as composteiras desse caso concreto, constituindo-se em grandes baldes de plástico com capacidade de até 150 litros cada, possuem pequenas torneiras em sua parte inferior, dali podendo-se extrair o chorume (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

O chorume se apresenta como líquido também escuro e igualmente contenedor de propriedades fertilizantes, utilizando-o em face das mencionadas hortas e também se destinando para uma ou outra planta ornamental pertencente a esses locais.

Espaço nos aterros sanitários da região são economizados, as culturas otimizadas e valorizadas ambientalmente com os nutrientes, e as crianças em idade escolar ainda aprendem como a natureza se vale da reciclagem (SARKIS; ZHU, 2017).

As escolas passam a produzir menos lixo, dinheiro é economizado no transporte dos resíduos, sacos plásticos deixam de ser adquiridos para esse encaminhamento.

Os nutrientes são reciclados de volta ao solo. A erosão é evitada quando o composto é adicionado. A conscientização é criada em torno dos esforços de reciclagem e redução de resíduos, e o orgulho da escola e a conscientização dos envolvidos são gerados através da contribuição positiva feita para o meio ambiente (SARKIS; ZHU, 2017).

Os materiais orgânicos representam mais de 60% do fluxo de resíduos desse tipo de instalação e incluem aparas de folhas e pátios, estrume (ainda que de poucos animais), alimentos não consumidos e estragados; basicamente, tudo o que estava vivo e agora está morto e precisa ser gerenciado ou descartado (BONOLI; ZANNI; AWERE, 2019).

Pois que todos os resíduos orgânicos tem a capacidade de alimentar o solo que por sua vez irá nutrir novos alimentos, por assim dizer (SARKIS; ZHU, 2017).

E, de fato, o processo de compostagem tem várias oportunidades educacionais que podem enriquecer a experiência de aprendizado como um todo. Uma caixa de compostagem

ativa mostra ser um habitat a fornecer infinidade de atividades práticas para alunos de todas as habilidades e competências atuais. Esse processo fascinante pode ser explorado em lições que abrangem uma gama de estágios-chave e áreas de estudo. Existem muitos assuntos em que o composto e sua importância podem ser usados para integrar a prática e o conhecimento em Ecopedagogia.

Cuida-se, neste exemplo, da aquisição de habilidade essencial (para a natureza e para o próprio aprendente) e transferível. Aprende-se, sob esta questão educacional, sobre formar equipes, sobre comunicação e organização necessárias para fazer erigir um sistema de coleta bem-sucedido nas escolas. Essas habilidades são desenvolvidas ainda mais se os alunos se envolverem com o treinamento de membros da comunidade sobre como se promove a compostagem e sua importância.

Wilkie, Graunke e Cornejo (2015), ao se debruçarem sobre as experiências ocorridas em três escolas na Flórida (Estados Unidos), também relatam o mérito da Ecopedagogia em ensinar e fazer acontecer processos de compostagem e de horta comunitária. O processo de compostagem pode ser estudado em vários níveis; com intensa participação de funcionários, professores e alunos — bem como de pais do corpo discente, ainda que em menor monta, algo explicado pela questão da localização essencialmente urbana de tais unidades educacionais.

A investigação acerca do processo de compostagem e da produção dada a partir de pequenas hortas foi amplamente debatida nas escolas, passando pelas disciplinas da Ecopedagogia, Biologia, Física e outras que, ao final, sempre permeavam discussões sobre questões de produção e sustentabilidade, situando a natureza e seu papel vital (WILKIE; GRAUNKE; CORNEJO, 2015).

A questão do volume, peso e proporções das duas iniciativas foi abordada nas três escolas também pelos professores de Matemática, conquanto, nos níveis médios de ensino, professores de Física chegaram a propor e a efetivar o cálculo da produção e do fluxo de materiais consumidos, por exemplo, do chorume, incluindo até taxas de evaporação das águas do composto (WILKIE; GRAUNKE; CORNEJO, 2015).

Interessante também expor que a Ecopedagogia na Flórida posta em curso, envolveu aulas de *design* e construção. Uma vez entendido o processo de compostagem, os alunos podem projetar e construir suas próprias caixas de compostagem, valendo-se de madeira apropriada. Isto não só dá aos alunos a oportunidade de demonstrar práticas e desenvolver habilidades, mas também reforça o aprendizado sobre o processo em si.

As hortas dessas escolas norte-americanas, reporta-se em tempo, também tem, agora conforme expõem Madeiros e Flores (2019), contado da validade e alcance que a Ecopedagogia consegue propor e colocar faticamente às mentes e mãos do alunado. O programa vivenciado também no Sudeste dos Estados Unidos inclui no total 25 unidades escolares especialmente selecionadas (abrigoando as três há pouco mencionadas). O objetivo levado a contento foi o de produzir 6 tipos de verduras e 6 tipos de legumes nessas localidades.

A participação e o envolvimento foi exemplar, com a própria escola e famílias dos alunos fazendo uso regular destes alimentos, conquanto produzidos em muito baixa escala.

A comunidade local, bairros afastados de cidades medianas, registra-se, iniciou, exatamente a partir dessa iniciativa, a feitura de hortas individualmente cultivadas em suas casas, algo que melhor integra, enfim, o ciclo de aprendizagem e experimentação desse tipo de atividade tão própria da Ecopedagogia (MEDEIROS; FLORES, 2019).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como visto, as práticas sustentáveis abrigam muitos conceitos, basicamente alcançados pela durabilidade dos recursos naturais, com respeito a todas as fontes oriundas da natureza, com a adoção de práticas e políticas (por todos devendo serem assumidas), no sentido de tornar tais riquezas perenes e empregadas mais adequadamente.

Trata-se de implementar cultura preservacionista, esta pautada pelo respeito à integridade e à recuperação daquilo que é vital ao ser humano; e, mais ainda, da atitude de não degradar, não poluir, cuidando-se de prover ambientes saudáveis a todos.

Os benefícios oriundos desta visão e deste posicionamento são a saúde do planeta e das espécies que aqui existem, destacando-se o próprio homem, único ser inteligente neste imenso ecossistema que é a Terra, que precisa da luz solar translúcida, de água pura, de alimento saudável e sem poluentes, de ar o mais puro possível etc.

A saúde do Homem, mantendo-se a qualidade de vida deste e de outras espécies, traduz-se como grande benefício oriundo e todo entendimento voltado para o desenvolvimento sustentável, algo mais recentemente promovido pelo que se alcunhou denominar de Ecopedagogia. Esta, como verificado, provê entendimento e ação, teoria e prática, compreensão e participação ativa a fazer do meio ambiente o constante aliado que precisa ser.

#### REFERÊNCIAS

- BAHR, Witold; SWEENEY, Edward. *Environmental Sustainability in the Follow-Up and Evaluation Stage of Logistics Services Purchasing: Perspectives from UK Shippers and 3PLs*. V. 11, 2460. **Sustainability**, 2019.
- BONOLI, Alessandra; ZANNI, Sara; AWERE, Eric. *Organic waste composting and sustainability in lowincome communities in Palestine: lessons from a pilot project in the village of Al Jalameh, Jenin*. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, V. 8:253–262, 2019.
- DI VAIO, Assunta; VARRIALE, Luisa. *Management Innovation for Environmental Sustainability in Seaports: Managerial Accounting Instruments and Training for Competitive Green Ports beyond the Regulations*. V. 10, 783. **Sustainability**, 2018.
- DONATO, Cláudio José; SOUZA, Graziella Praça Orosco de. *Ecopedagogia: Uma Via Para O Desenvolvimento Sustentável*. **Colloquium Humanarum**, V. 13, n. Especial, jul–dez, p. 255-261, 2016.
- HOWES, Michael; WORTLEY, Liana; POTTS, Ruth; DEDEKORKUT-HOWES, Aysin; SERRAO-NEUMANN, Silvia; DAVIDSON, Julie; SMITH, Timothy; NUNN, Patrick. *Environmental Sustainability: A Case of Policy Implementation Failure?*, V. 9, 165, **Sustainability**, 2017.

KIRSCHKE, Sabrina; NEWIG, Jens. *Addressing Complexity in Environmental Management and Governance*. V. 9, 983, **Sustainability**, 2017.

MADEIROS, Adrian Joel; FLORES, Leandro Gustamendes. *Florida Environmental Sustainability Experience*. **International Journal of Production Research**, V. 77, p. 2-5, 103-114, 2019.

NARANJO-GIL, David. *The Role of Management Control Systems and Top Teams in Implementing Environmental Sustainability Policies*. V. 8, 359. **Human Research**, 2016.

SARKIS, Joseph; ZHU, Qingyun. *Environmental sustainability and production: taking the road less travelled*. **International Journal of Production Research**, V. 56, p. 1-2, 743-759, 2017.

SILVA, Lidiana Cardoso da. ***Trilha Ecopedagógica como Ferramenta Educacional no Ensino de Educação Ambiental***. Tese de Doutorado. Lagoa Santa: Universidade Estadual da Paraíba, 2017.

SIQUEIRA, Thais Menina Oliveira de; ASSAD, Maria Leonor Ribeiro Casimiro. *Compostagem de Resíduos Sólidos Urbanos no Estado de São Paulo (Brasil)*. **Ambiente & Sociedade**. São Paulo v. XVIII, n. 4. p. 243-264, out.-dez. 2015.

SOUSA, Maria Aparecida de Oliveira. *Ecopedagogia: **Pedagogia Para A Vida***. Dissertação de Mestrado. São Leopoldo: Faculdade EST, 2018.

WILKIE, Ann C.; GRAUNKE, Ryan E.; CORNEJO, Camilo. *Food Waste Auditing At Three Florida Schools*. V. 7, 1370-1387, **Sustainability**, 2015.

## ASPECTOS DA SENESCÊNCIA CELULAR EM INDIVÍDUOS IDOSOS SAUDÁVEIS

Data de submissão: 28/02/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### Thalyta Nery Carvalho Pinto

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)  
São Paulo - SP  
<http://lattes.cnpq.br/4353077754697333>

### Juliana Ruiz Fernandes

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)  
São Paulo - SP  
<http://lattes.cnpq.br/2791523265471167>

### Gil Benard

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)  
São Paulo - SP  
<http://lattes.cnpq.br/5404614017593355>

**RESUMO: Introdução:** Atualmente há 26 milhões de idosos no Brasil e segundo projeções os idosos serão 29% da população em 2050, quando esse grupo somará 66 milhões de indivíduos. O aumento do número de idosos pode ter um grande impacto no sistema de saúde e previdência social. Este aumento da expectativa de vida traz consigo uma diminuição da função do sistema imunológico chamado de imunossenescência. A imunossenescência é caracterizada pelo declínio funcional do

sistema imunológico quando comparados com indivíduos jovens. Este processo gera maior susceptibilidade a infecções e diminuição da resposta vacinal. A imunossenescência ocorre em diversos compartimentos do sistema imunológico, afetando desde células, receptores, vias de sinalização, proteínas e também estruturas, como por exemplo o telômero. **Objetivos:** Analisar as diferenças entre os gêneros no processo de imunossenescência em indivíduos idosos saudáveis. **Materiais e Métodos:** Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de densidade Ficoll Paque. As subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8 foram purificadas e realizada a técnica de Flow-FISH, com o emprego do Telomere PNA Kit/FITC. Foi realizada imunofenotipagem para populações de memória e *naive*. Após cultura de 3 dias as células foram lisadas, e foi realizado ensaio de PCR Real Time para avaliação da enzima telomerase. Além disso foram avaliadas através de citometria de fluxo as subpopulações de linfócitos *naive*, memória central, memória efetora, e memória terminalmente diferenciada. **Resultados:** Não foi possível verificar diferenças significativas nos linfócitos TCD4+, nem em TCD8+ nas suas subpopulações, nem quanto ao comprimento de telômero, nem na atividade da enzima telomerase. Demonstrando apenas uma tendência a maiores resultados no

gênero feminino. **Conclusão:** O PCR Real Time foi sensível o suficiente para diferenciar células não estimuladas de estimuladas. Além disso, verificamos que as maiores alterações do envelhecimento são nos linfócitos TCD8+. Com uma tendência a maiores resultados no gênero feminino.

**PALAVRAS-CHAVE:** senescência, envelhecimento, RT-PCR, telomerase, telômero

## CELLULAR SENESENCE ASPECTS IN HEALTHY ELDERLY

**ABSTRACT: Introduction:** There are 26 million of elderly on Brazil, and projections affirm that in 2050, 29% of the population will be elderly, summing 66 million individuals. The increase of elderly can impact on healthy system and social service. This increase in life expectancy brings a decrease in immune system called immunosenescence. The immunosenescence is characterized by function decrease in immune system when compared to young individuals. This process impairs in high susceptibility to infection, decrease in vaccine response. Besides that, immunosenescence occurs in all compartments of immune system, with alteration in cells, receptors, signaling pathways, proteins, and structures. **Aims:** Analyze differences on immunosenescence process between healthy individual of both genders. **Material and Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by density gradient Ficoll Paque and subpopulations of TCD4 and TCD8 lymphocytes were magnetic separated. On lymphocytes populations Flow-Fish was used with Telomere PNA Kit/FITC. Cells were cultivated for 3 days, under no stimuli or stimulated with PHA. After stimuli the cells were lysated and the PCR Real time for enzymatic activity of telomerase were standardized. Besides that, were evaluated by flow cytometry memory subpopulations: naive, central memory, effector memory and terminally differentiated memory. **Results:** There were no differences on TCD4 and TCD8 subpopulations, not either in telomere length, not even in telomerase activity. We could only see a tendency in higher results on women. **Conclusion:** The Real Time PCR reaction were sensitive enough to differentiate stimulated cells from non stimulates. Besides that, we verify that most alterations are on TCD8 lymphocytes, suffering more with aging process. Women have a tendency of higher maintenance of cellular characteristics.

**KEYWORDS:** senescence, aging, RT-PCR, telomere, telomerase.

## 1 | INTRODUÇÃO

### Imunossenescência

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) uma população é considerada envelhecida quando possui idade superior a 65 anos. Atualmente há 26 milhões de idosos no Brasil, e segundo projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os idosos serão 29% da população em 2050, quando esse grupo somará 66 milhões de indivíduos (1).

Entretanto uma população idosa traz consigo problemas que desafiam o sistema de saúde e previdência social, tendo em vista que a função imune altera-se com o

envelhecimento, predispondo a uma série de eventos adversos. Porém envelhecer não significa necessariamente adoecer, e os avanços no campo da saúde e da tecnologia têm permitido uma melhor qualidade de vida nessa fase (1).

Outrossim a Imunossenescência é um campo da Imunologia definido para estudar o envelhecimento imunológico associado ao progressivo declínio da função imune, aumentando assim, a suscetibilidade dos indivíduos para infecções, doenças autoimunes e câncer (2).

O processo de envelhecimento é definido como um declínio progressivo da homeostase que ocorre após a completa fase reprodutiva da vida. O envelhecimento é programado e determinado por genes selecionados resultantes da interação estocástica entre lesões e reparos, de acordo com a energia dispensada pelo indivíduo para manter a integridade de órgãos e proteger contra injúrias oxidativas de DNA (3, 4). As mudanças quantitativas e qualitativas do sistema imune no envelhecimento vêm sendo implicadas no aumento da suscetibilidade a diversas doenças como, cardiovasculares, autoimunes, e câncer, assim como a diminuição da resposta vacinal e à agentes infecciosos (5).

Além disso, estudos acerca da resposta imune inata mostram que seus componentes celulares como neutrófilos, monócitos, células dendríticas e NK, estão numericamente, preservados em idosos saudáveis, entretanto a atividade funcional dessas células aparece comprometida em diferentes situações. Já a resposta imune adaptativa tem seus níveis sistêmicos comprometidos em órgãos linfoides e não linfoides, demonstrando assim uma maior falência de sua atividade, relacionada principalmente à redução de células T (6, 7). O aumento do número de idosos pode ter um grande impacto no sistema de saúde já que este aumento da expectativa de vida traz consigo doenças como demência, artrite reumatóide, câncer, problemas cardíacos e sarcopenia.

Por outro lado, sabe-se que há diferenças entre o sistema imune masculino e feminino, como por exemplo, a menor porcentagem de linfócitos T em homens. Também é descrito o diferente funcionamento do sistema imune entre os gêneros como a maior produção de resposta humoral e celular no gênero feminino, fazendo com que ocorra uma melhor resolução de infecções e maior prevalência de autoimunidade (8, 9). Essas diferenças podem ser efeito de hormônios como o estrógeno, que pode ativar a enzima telomerase e estimular a imortalização celular (10). Hormônios andrógenos e estrógenos são capazes de reduzir o número de linfócitos T maduros e potencializar a involução tímica (11), assim como hormônios andrógenos também favorecem o desenvolvimento de respostas Th1, e ativam linfócitos T CD8+, enquanto estrógenos favorecem a via Th2 e a produção de anticorpos (12). Entretanto pouco se sabe sobre as diferenças entre os gêneros no processo de imunossenescência.

O sistema imune possui diferentes tipos celulares para proteção do organismo, onde cerca de 70% são linfócitos. Estes linfócitos interagem com outros tipos celulares para auxiliar na montagem de uma resposta imune. Para que isso ocorra os linfócitos precisam que seus receptores CD27 e CD28 interajam com os receptores de superfície das células apresentadoras de antígenos para se tornarem ativos e permitirem a proliferação extensiva e secreção de citocinas (13-15).

As células de memória, tanto CD4 e CD8, possuem uma dinâmica representada por

três fases, onde a primeira é caracterizada por um pool de células naive, que com o decorrer do tempo se transformam em células de memória em resposta a antígenos específicos alcançando cerca de 35% do pool total de células após a primeira década de vida. A segunda fase é denominada homeostase de memória que se inicia na terceira década de vida com as células T de memória circulantes alcançando um platô e se mantendo durante a vida adulta. Na terceira fase, após um longo período de estabilidade a frequência e a funcionalidade das células de memória se alteram sendo este fenômeno denominado imunossenescência. Esta fase é marcada pelo aumento de susceptibilidade a infecções ocasionada por uma desregulação imune com um declínio fisiológico. As células de memória circulantes possuem dois fenótipos predominantes: as células de memória central, amplamente confinadas nos tecidos linfoides secundários caracterizadas como CD45RA-CCR7+CD62L+, e as células de memória efetora que trafegam por múltiplos compartimentos periféricos e são caracterizadas pela ausência de expressão de CD45RA, CCR7 e CD62L (16).

Deste modo, alguns marcadores de superfície de células T auxiliam a diferenciar funcionalmente estas células com o envelhecimento. Células naive expressam CD45RA e CCR7 em suas membranas permitindo que estas células migrem para os linfonodos (17). Linfócitos de memória central (MC) são produtoras de IL-2 e IFN gama, mas não produzem citocinas efetoras como TNF- alfa, IL-4, ou moléculas efetoras como perforinas e granzimas. São fenotipicamente definidas como CD45RA-CD45RO+CD27+CD28+CCR7+. Já as células de memória efetora (ME) são capazes de produzir citocinas e moléculas efetoras como IL-4; IL-5, TNF-a, perforinas e granzimas, e podem ser definidas como CD45RA-CD45RO+CD27-CD28-CCR7-. Outra população celular que pode ser definida são as efetoras terminais apresentando fenótipo CD45RA+CD45RO-CD27-CD28-CCR7-: estas células apresentam limitada capacidade replicativa mas produzem diversas citocinas quando ativadas (18).

Outro aspecto importante da senescência celular é a manutenção celular, já que há um limite de proliferação celular após um definido número de divisões celulares. Os telômeros são complexos de proteína do DNA que revestem o final dos cromossomos com função de manter a estabilidade durante o processo de divisão celular. São repetições não codificantes de TTAGGG que protegem o cromossomo contra degradação, fusão ou recombinação atípica (19). Quando há divisão celular, os telômeros não são totalmente replicados devido à limitação da DNA polimerase em completar a replicação dos finais de moléculas lineares, o que leva ao encurtamento destas estruturas (20). Portanto é necessária uma enzima, a telomerase, para adicionar repetições de TTAGGG aos telômeros restantes. Esta enzima é habitualmente inativa na maioria das células somáticas, mas é altamente detectada em células tumorais (21).

Em células normais, a atividade da telomerase é regulada durante o desenvolvimento sendo extinguida durante a diferenciação embriológica nas células somáticas. Porém, em alguns tecidos como células germinativas, linfócitos ativados, e algumas populações de células tronco esta atividade é mantida. A desregulação do funcionamento da telomerase está relacionada com algumas doenças que resultam em encurtamento acelerado dos telômeros e deficiências proliferativas. Deste modo, a expressão e atividade da telomerase

pode conferir potencial replicativo ilimitado, comum em células cancerosas e não necessário em células jovens, assim como, sua inibição leva a encurtamento do telômero e apoptose (22).

Este encurtamento pode ser correlacionado com doenças degenerativas, que tendem a ser mais comuns em homens, sendo uma das possíveis causas das diferenças de longevidade entre os gêneros. De acordo com Leri et al. mulheres possuem maior atividade da enzima telomerase do que homens, o que pode ser então responsável por maiores telômeros em mulheres (23).

Dessa forma é evidente que é necessário um estudo acerca de avaliar a função imunológica desses indivíduos idosos. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças entre os gêneros quanto a aspectos da senescência celular em indivíduos idosos saudáveis.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram provenientes de indivíduos idosos saudáveis funcionários ou participantes do grupo de voluntários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão foram: idade entre 60 e 80 anos homens e mulheres, não fumantes, ou que cessaram o hábito há mais de 15 anos, com IMC < 30 (Tabela 1).

Gênero	Idade	Localização	IMC (média)
Masculino (n =11)	65,0 (60-71 anos)	São Paulo	22.7
Feminino (n =11)	65,3 (60-71 anos)	São Paulo	25.8

Tabela 1. Dados demográficos dos voluntários

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número 1.956.268.

Foram coletados 4 tubos de sangue heparinizado, e na sequência obtidas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizando gradiente de densidade Ficoll Paque Plus (*GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom*). Parte das PBMC foram armazenadas em solução de congelamento contendo Soro Fetal Bovino (SFB)/ 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em nitrogênio líquido, para utilização em experimentos posteriores.

A partir das células obtidas foi realizada marcação extracelular, foram separadas  $1 \times 10^6$  células por tubo. Foram adicionados com os seguintes anticorpos monoclonais: CD3, CD4, CD8, CCR7 e CD45RA (*BD Biosciences*), com o intuito de verificar populações de memórias e naive. A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, em citômetro LSRFortessa com os dados analisados através do software FlowJo 10.0

As PBMCs restantes foram purificadas para linfócitos TCD4+ e TCD8+ por meio de seleção magnética negativa (CD4+ ou CD8+ T *Cell Isolation Kit II human*) (*MiltenyiBiotec*,

*Alemanha*), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza destas células foi avaliada empregando-se citometria de fluxo com três cores (CD3/CD4/CD8, *Serotec, Oxford, United Kingdom*) sendo considerada um grau mínimo de pureza 90%.

Para medir o comprimento dos telômeros utilizamos a metodologia de Flow-FISH. A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada com o emprego do Telomere PNA Kit/FITC (*Dako, CO, Reino Unido*) da mesma forma que em estudos prévios de nosso grupo (24). Para cada amostra utilizamos  $1 \times 10^6$  linfócitos (CD4 ou CD8) juntamente com  $1 \times 10^6$  de células de linhagem tumoral 1301 (utilizadas com controle interno por serem tetraploides e possuírem longos telômero com tamanho conhecido). As células foram centrifugadas e o controle negativo ressuspenso em solução de formamida, enquanto as células marcadas foram ressuspenso em solução de formamida juntamente com a probe telomérica. As amostras foram então aquecidas à  $82^\circ\text{C}$  por 10min para denaturação e em seguida hibridização em temperatura ambiente overnight. Após este período as células foram lavadas e aquecidas a  $40^\circ\text{C}$ , ressuspenso em solução de *DNA staining*, contendo iodeto de propídio e Rnase e incubadas à  $4^\circ\text{C}$  por três horas para posterior leitura em citômetro de fluxo. Análise foi realizada no software FlowJo 10.0. A determinação do comprimento do telômero foi feita de acordo com instruções do fabricante, com posterior conversão da unidade de medida em kilopares de bases.

A atividade da enzima telomerase foi realizada usando o “*TRAP Assay*”, que consiste em verificar a habilidade da enzima em adicionar repetições teloméricas em *primers* de oligonucleotídeos específicos (25). PBMC's ( $2 \times 10^6$ ) foram mantidas em cultura por 72 horas em duas condições: sem estímulo (basal) e estimuladas PHA (fitohemaglutinina) (*SIGMA, Alemanha*), sendo então lisadas em 50ul de CHAPS buffer (*CellSignalling, Estados Unidos*), contendo inibidor de Rnase e protease (*Thermo-Fischer Scientific, Invitrogen, EUA*). As células foram congeladas e descongeladas duas vezes em freezer  $-80^\circ\text{C}$  e centrifugadas por 10min à 14000 rpm. A quantidade de proteínas foi dosada pelo método Protein A280-BSA em *NanoDrop*<sup>TM</sup>. Para avaliação da atividade da enzima telomerase foi utilizado 5ul do lisado celular, contendo  $<100\text{ng/ml}$  de DNA. Adicionado em placa, juntamente com 12,5ul de Luna® Universal qPCR Master Mix (*New England Biolabs, EUA*), e 10uM dos *primers* (TS e ACX). Além das amostras testadas foram adicionados os controles negativos e positivos (tampão de lise CHAPS buffer e linhagem celular 293 immortal cell line human kidney cells, respectivamente). As placas foram então lidas em aparelho Applied Biosystems® 7500.

### 3 | RESULTADO

Um dos aspectos avaliados foi a composição de linfócitos TCD4+ e TCD8+ quanto às subpopulações de células *naïve* (CD45RA+CCR7+), memória central (CD45RA-CCR7+), memória efetora (CD45RA-CCR7-) e terminalmente diferenciadas ( $T_{EMRA}$ ) (CD45RA+CCR7-).

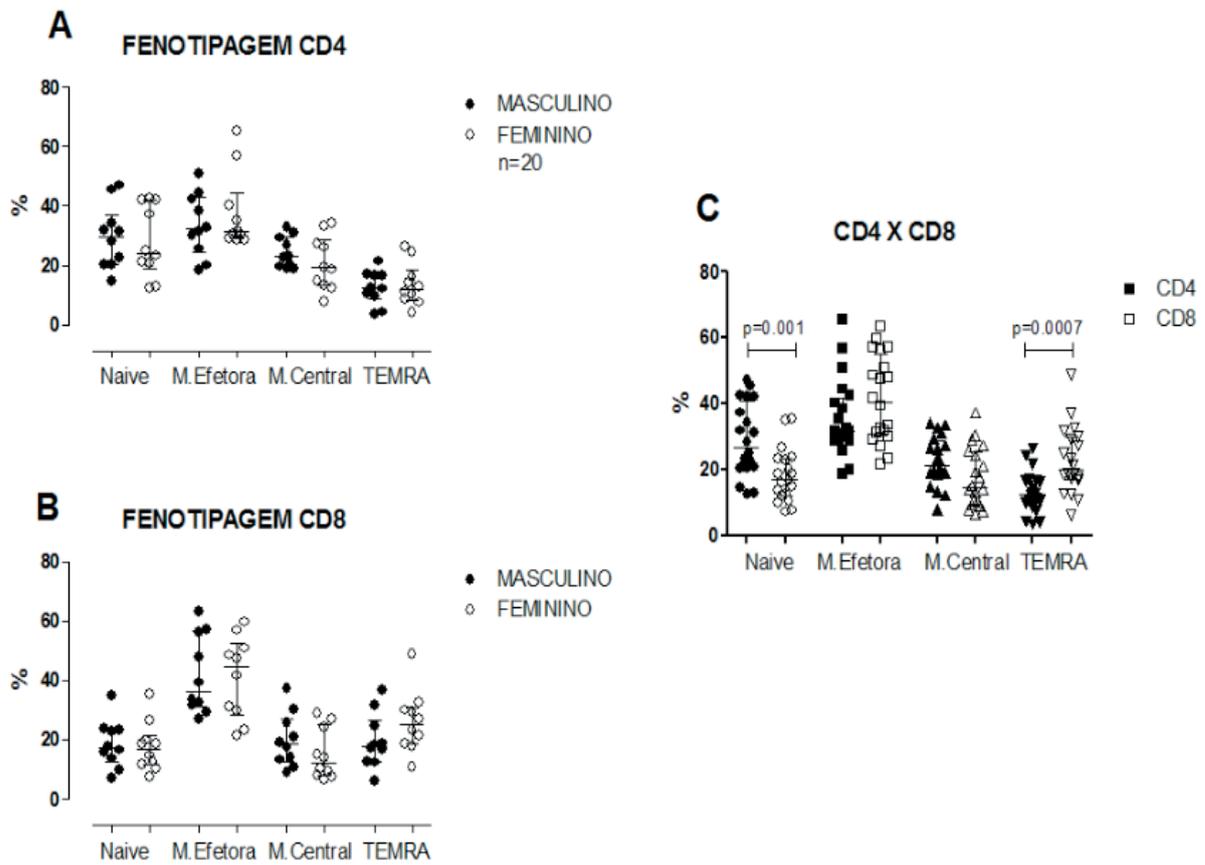


Figura 1: Frequência das populações de memória e *naive* nas subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8 em ambos os gêneros, realizada por citometria de fluxo.

Como podemos ver na Figura 1 não há diferenças significativas nos linfócitos TCD4+, nem em TCD8+. Porém os resultados no gênero feminino parecem ser menos homogêneos do que no gênero masculino, isso pode ser devido ao período pós-menopausa onde há variabilidade hormonal que pode afetar o sistema imunológico. Outro achado do grupo foi a diminuição de células *naive* e aumento das células TEMRA em linfócitos CD8, mostrando uma maior ativação desta população durante a resposta imune.

Após análise de dados verificamos que não há diferença estatística no comprimento de telômero entre homens e mulheres saudáveis. Porém, mesmo não alcançando significância há uma tendência a maiores comprimentos de telômero em mulheres na população de TCD8 (Figura 2).

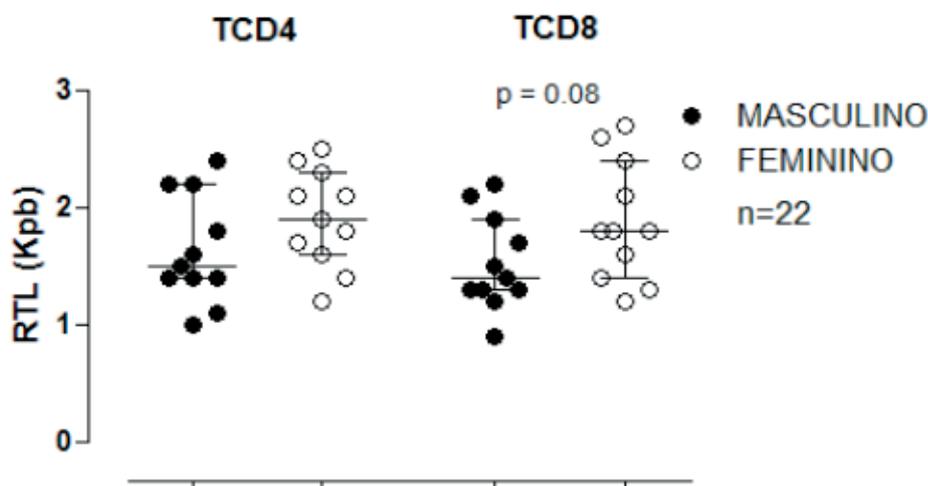


Figura 2: Comprimento relativo do telômero nas populações de linfócitos TCD4 e TCD8 em kilopares de base.

A atividade da enzima telomerase se mostrou diferente entre a condição não estimulada e estimulada, demonstrando que o ensaio é sensível o suficiente para avaliar diferenças no funcionamento desta enzima. Porém, comparando entre os gêneros não houve diferença estatística (Figura 3).

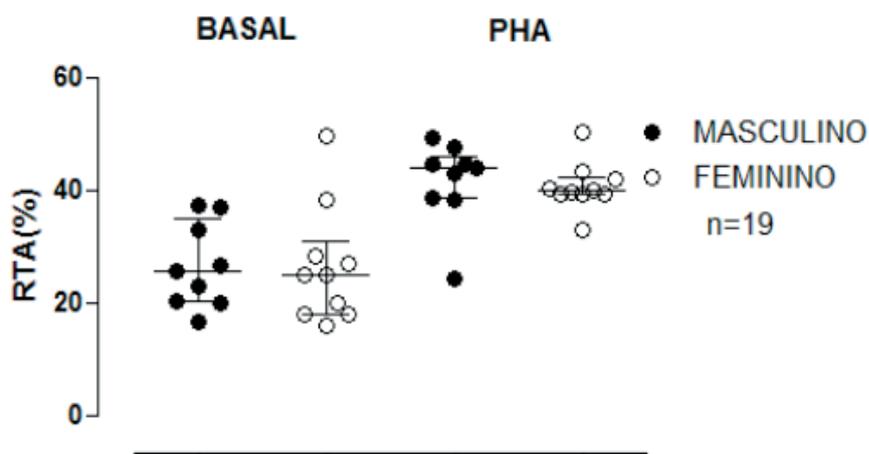


Figura 3: Atividade relativa de telomerase entre os gêneros nas condições basal e estimulada obtida por PCR Real-Time

#### 4 | DISCUSSÃO

Em nosso trabalho não verificamos diferenças estatisticamente significativas no tamanho do telômero de linfócitos TCD4 entre os gêneros. Entretanto observamos, tendência a maiores comprimentos de telômero na população de linfócitos TCD8 em mulheres ( $p = 0,08$ ). Da mesma maneira não encontramos diferença da atividade da enzima telomerase entre homens e mulheres, nem na condição não estimulada como na condição estimulada com PHA.

Hirokawa et al.(26) descreveram que o declínio dos parâmetros imunológicos acontece

mais lentamente em mulheres quando comparadas aos homens, o que explica a maior expectativa de vida no gênero feminino.

Ao nascer não há diferenças no comprimento dos telômeros entre os gêneros. Porém, com o envelhecimento há uma tendência de um maior encurtamento destas estruturas em homens (27), o que corrobora com nossos achados. Mesmo que não ocorra diferença nesta dinâmica de encurtamento entre os gêneros, é bem estabelecida a diminuição destas estruturas em relação ao aumento da idade (28).

O telômero encurta em média 50-100 bp por ano, sendo assim, o tamanho do telômero reflete a história proliferativa celular, funcionando como um relógio mitótico em direção a senescência. O comprimento do telômero e a sua razão de encurtamento variam entre os cromossomos, tecido, indivíduos e idade (29). O telômero na fase embrionária possui um comprimento similar nas células dos tecidos, mas após o nascimento ocorre uma diferenciação e um encurtamento progressivo nas células somáticas proliferativas (30). Sendo assim, indivíduos idosos possuem um telômero mais curto do que os jovens. A perda do telômero pode ser devido à alta ativação da replicação celular ou o acúmulo de dano oxidativo (31).

Na literatura há numerosos estudos sobre o comportamento dos telômeros na população de PBMC como um todo. Apesar dos diferentes tipos celulares estudados, resultados similares foram encontrados em PBMC por Njajou et al. (32) que avaliaram indivíduos saudáveis de ambos os gêneros entre 70-79 anos, por Harris et al. (33) que avaliou 190 idosos de ambos os gêneros; assim como, Martin-Ruiz et al. (34) que avaliou 598 idosos de ambos os gêneros em uma idade média de 89 anos e em nenhum dos estudos observou-se diferença de comprimento relativo do telômero entre sexos. Porém Martin-Ruiz et al. (34) observou que o comprimento do telômero apresentava-se instável, aumentando ou diminuindo ao longo de alguns anos. Em nosso estudo observamos também uma grande amplitude de variação em relação ao comprimento do telômero, onde alguns pacientes possuíam um comprimento ou bem menor ou bem maior que a média dos pacientes

Para ter e manter um maior tamanho corporal é discutida a necessidade das células em entrarem em mais ciclos replicativos, o que levaria a maior perda de telômero. Entre as espécies de mamíferos aqueles com maior composição corporal possuem menor expressão da enzima telomerase (35). Maier et al. (36) demonstraram que em um estudo de cultura celular homens mais altos apresentaram menor capacidade replicativa quando comparados a homens baixos. A ativação da enzima telomerase está diretamente relacionado ao crescimento, porém nos poucos estudos realizados, o gênero feminino parece demonstrar maior atividade dessa enzima (23).

As bases nitrogenadas prevalentes nos telômeros são particularmente sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio (37), e conseqüentemente este tipo de processo pode gerar considerável atrito telomérico. Hormônios sexuais podem interagir com espécies reativas de oxigênio, tanto na produção como no manejo destas moléculas. O estrógeno além de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio também possui uma grande capacidade antioxidante. Ao contrário a testosterona não tem potencial antioxidante e está relacionada a diminuição da imunocompetência (38, 39). Apesar da menopausa, mulheres

continuam a demonstrar menor atrito telomérico mesmo após este período (40), o que pode corroborar os dados de nossa coorte, já que todas as mulheres se encontravam em período pós menopausa, e não realizavam reposições hormonais.

Não encontramos diferenças entre as subpopulações de linfócitos nem em TCD4, nem em TCD8. Porém Al-Attar et al. (41) encontraram maior frequência de células TCD4 memória central em homens idosos (por idade), quando comparados à mulheres idosas (por idade), o que pode inferir uma melhor resposta de memória, apesar de usar outros marcadores para separar as células (CD62L ao invés de CCR7). É possível que não tenhamos encontrado o mesmo resultado devido à coorte de nosso estudo ser composta de idosos mais novos (61-70). Contudo, Bisset et al. (42), já havia descrito maior porcentagem de células de memória (CD45RO+) em mulheres, o que pode sugerir mais células de memória total nesta população, o que não se confirma quando esta subpopulação é separadas em três subpopulações (memória central, memória efetora e TEMRA). Porém, algo que já é descrito na literatura (14) é o maior efeito do processo de senescência nos linfócitos TCD8, fazendo com que estas células expressem em maior quantidade o fenótipo terminalmente diferenciadas.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A senescência celular ocorre em diversos compartimentos do sistema imunológico. Verificamos neste estudo que os linfócitos TCD8+ sofrem mais com o envelhecimento, por terem uma maior ativação e exposição durante a vida, apresentando mais células TEMRA e menos células naive do que em linfócitos TCD4+, porém sem diferenças entre os gêneros.

Quanto ao comprimento do telômero foi possível verificar que não há diferença significativa entre os gêneros, mas sim uma tendência em maiores comprimentos de telômero em mulheres na população de linfócitos TCD8+.

O ensaio de atividade da telomerase foi sensível o suficiente para conseguir diferenciar células estimuladas e não estimuladas, contudo não verificamos diferença neste parâmetro quando comparados idosos de ambos os sexos.

Os resultados obtidos podem sugerir que o sexo feminino possui maiores alterações celulares com uma possível ativação celular que leva a formação de células de memória, com manutenção das estruturas e funções das células o que possibilitaria a maior expectativa de vida encontrada nas mulheres.

## 6 | AGRADECIMENTOS

TNCP agradece ao Cnpq pelo auxílio financeiro e aos voluntários do projeto pela colaboração.

## REFERÊNCIAS

1. Miranda GMD, Mendes AdCG, Silva ALAd. **Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences.** Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia. 2016;19:507-19.
2. Agondi RC, Rizzo LV, Kalil J, Barros M. **Imunossenescência.** Rev bras alergias imunopatol. 2012;35(5):169-76.
3. Adnot S. **[Cell senescence and pathophysiology of chronic lung diseases: role in chronic obstructive pulmonary disease].** Bull Acad Natl Med. 2014 2014 Apr-May;198(4-5):659-71. PubMed PMID: 26753399. fre.
4. Aoshiba K, Nagai A. **Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease.** Proc Am Thorac Soc. 2009 Dec;6(7):596-601. PubMed PMID: 19934355. eng.
5. Valiathan R, Ashman M, Asthana D. **Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly.** Scand J Immunol. 2016 Apr;83(4):255-66. PubMed PMID: 26808160. eng.
6. Weng NP. **Ageing of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt?** Immunity. 2006 May;24(5):495-9. PubMed PMID: 16713964. PMCID: PMC2266981. eng.
7. Uyemura K, Castle SC, Makinodan T. **The frail elderly: role of dendritic cells in the susceptibility of infection.** Mech Ageing Dev. 2002 Apr;123(8):955-62. PubMed PMID: 12044944. eng.
8. Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. **In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans.** J Clin Endocrinol Metab. 2000 Apr;85(4):1648-57. PubMed PMID: 10770211. eng.
9. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM. **Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans.** Am J Reprod Immunol. 2004 Jul;52(1):19-26. PubMed PMID: 15214938. eng.
10. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, et al. **Estrogen activates telomerase.** Cancer Res. 1999 Dec;59(23):5917-21. PubMed PMID: 10606235. eng.
11. Olsen NJ, Kovacs WJ. **Evidence that androgens modulate human thymic T cell output.** J Investig Med. 2011 Jan;59(1):32-5. PubMed PMID: 21218609. PMCID: PMC3077079. eng.
12. González DA, Díaz BB, Rodríguez Pérez MeC, Hernández AG, Chico BN, de León AC. **Sex hormones and autoimmunity.** Immunol Lett. 2010 Sep;133(1):6-13. PubMed PMID: 20637236. Epub 2010/07/14. eng.
13. MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. **Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment.** Immunology. 2010 May;130(1):10-5. PubMed PMID: 20331469. PMCID: PMC2855788. Epub 2010/03/16. eng.
14. Obar JJ, Lefrançois L. **Memory CD8+ T cell differentiation.** Ann N Y Acad Sci. 2010 Jan;1183:251-66. PubMed PMID: 20146720. PMCID: PMC2836783. eng.
15. Bouso P. **T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies.** Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):675-84. PubMed PMID: 19172690. eng.
16. Haynes L, Swain SL. **Why aging T cells fail: implications for vaccination.** Immunity. 2006 Jun;24(6):663-6. PubMed PMID: 16782020. eng.
17. Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. **CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance.**

Nat Rev Immunol. 2008 May;8(5):362-71. PubMed PMID: 18379575. eng.

18. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. **The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets.** Eur J Immunol. 2013 Nov;43(11):2797-809. PubMed PMID: 24258910. Epub 2013/10/30. eng.
19. von Zglinicki T. **Oxidative stress shortens telomeres.** Trends Biochem Sci. 2002 Jul;27(7):339-44. PubMed PMID: 12114022. eng.
20. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. **Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov;89(21):10114-8. PubMed PMID: 1438199. PMCID: PMC50288. eng.
21. Dahse R, Fiedler W, Ernst G. **Telomeres and telomerase: biological and clinical importance.** Clin Chem. 1997 May;43(5):708-14. PubMed PMID: 9166220. eng.
22. Cong YS, Wright WE, Shay JW. **Human telomerase and its regulation.** Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Sep;66(3):407-25, table of contents. PubMed PMID: 12208997. PMCID: PMC120798. eng.
23. Leri A, Malhotra A, Liew CC, Kajstura J, Anversa P. **Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent.** J Mol Cell Cardiol. 2000 Mar;32(3):385-90. PubMed PMID: 10731438. eng.
24. Silva LC, de Araújo AL, Fernandes JR, Matias MeS, Silva PR, Duarte AJ, et al. **Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations.** Age (Dordr). 2016 Feb;38(1):24. PubMed PMID: 26863877. PMCID: PMC5005879. Epub 2016/02/10. eng.
25. Kulić A, Plavetić ND, Gamulin S, Jakić-Razumović J, Vrbanec D, Sirotković-Skerlev M. **Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype.** Med Oncol. 2016 Mar;33(3):23. PubMed PMID: 26833480. Epub 2016/01/30. eng.
26. Hirokawa K, Utsuyama M, Hayashi Y, Kitagawa M, Makinodan T, Fulop T. **Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population.** Immun Ageing. 2013 May;10(1):19. PubMed PMID: 23675689. PMCID: PMC3663722. Epub 2013/05/15. eng.
27. Barrett EL, Richardson DS. **Sex differences in telomeres and lifespan.** Aging Cell. 2011 Dec;10(6):913-21. PubMed PMID: 21902801. Epub 2011/09/28. eng.
28. Engelhardt M, Finke J. **Does telomere shortening count?** Blood. 2001 Aug;98(3):888-90. PubMed PMID: 11468140. eng.
29. Monaghan P, Haussmann MF. **Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan?** Trends Ecol Evol. 2006 Jan;21(1):47-53. PubMed PMID: 16701469. Epub 2005/11/23. eng.
30. Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M. **Telomerase in T lymphocytes: use it and lose it?** J Immunol. 2007 Jun;178(11):6689-94. PubMed PMID: 17513711. eng.
31. Njajou OT, Hsueh WC, Blackburn EH, Newman AB, Wu SH, Li R, et al. **Association between telomere length, specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population-based cohort study.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009 Aug;64(8):860-4. PubMed PMID: 19435951. PMCID: PMC2981462. Epub 2009/05/12. eng.
32. Harris SE, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Starr JM, Deary IJ. **Telomere length and aging biomarkers in 70-year-olds: the Lothian Birth Cohort 1936.** Neurobiol Aging. 2012 Jul;33(7):1486.e3-8. PubMed PMID: 21194798. Epub 2010/12/30. eng.

33. Martin-Ruiz CM, Gussekloo J, van Heemst D, von Zglinicki T, Westendorp RG. **Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study.** *Aging Cell.* 2005 Dec;4(6):287-90. PubMed PMID: 16300480. eng.
34. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. **Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination.** *Aging Cell.* 2011 Oct;10(5):761-8. PubMed PMID: 21518243. PMCID: PMC3387546. Epub 2011/06/01. eng.
35. Maier AB, van Heemst D, Westendorp RG. **Relation between body height and replicative capacity of human fibroblasts in nonagenarians.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008 Jan;63(1):43-5. PubMed PMID: 18245759. eng.
36. Oikawa S, Kawanishi S. **Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening.** *FEBS Lett.* 1999 Jun;453(3):365-8. PubMed PMID: 10405177. eng.
37. Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. **Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds.** *FEBS Lett.* 2005 May;579(12):2541-5. PubMed PMID: 15862287. Epub 2005/04/14. eng.
39. Liu L, Trimarchi JR, Smith PJ, Keefe DL. **Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability.** *Aging Cell.* 2002 Oct;1(1):40-6. PubMed PMID: 12882352. eng.
40. Mayer S, Bruderlein S, Perner S, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, et al. **Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans.** *Cytogenet Genome Res.* 2006;112(3-4):194-201. PubMed PMID: 16484772. Epub 2006/02/18. eng.
41. Al-Attar A, Presnell SR, Peterson CA, Thomas DT, Lutz CT. **The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men.** *Mech Ageing Dev.* 2016 06;156:25-33. PubMed PMID: 27059724. Epub 2016/04/06. eng.
42. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. **Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland.** *Eur J Haematol.* 2004 Mar;72(3):203-12. PubMed PMID: 14962239. eng.

## ANÁLISE *IN SILICO* DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS P53 E CREBBP E SUA RELAÇÃO COM LINFOMAS

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

Ciências Biológicas

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/6968057310324859>

### **Katheryne Lohany Barros Barbosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/5289830186684127>

### **Kleber Santiago Freitas**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3813868830071259>

### **Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/1104307184099700>

### **Olívia Basso Rocha**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/0176020525650551>

### **Livia do Carmo Silva**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/7092484043564604>

### **Gabriela Danelli Rosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3632033730008798>

### **Jackeliny Garcia Costa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de

**RESUMO:** CREBBP é uma proteína responsável por regular a expressão de genes através de vias de transdução de sinais, interferindo no crescimento e diferenciação celular, na estabilização de proteínas durante a transcrição, regulação de proteínas por acetilação e participação no remodelamento da cromatina. p53 é uma proteína associada a resposta ao estresse celular e apoptose frente a dano no DNA. Mutação no gene da CREBBP prejudica sua interação com p53 resultando em um efeito expressivo na desordem do sistema hematopoiético. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar a interação entre a p53 e a CREBBP quando inserida uma mutação pontual em um *hotspot*, simulando um polimorfismo clínico ligado ao desenvolvimento de leucemias. Ferramentas de bioinformática foram usadas para prever a interação proteína-proteína através do Cluspro. A análise da interface de interação e dos aminoácidos envolvidos nessa interação foi estabelecido

através do programa PyMol. Os *hotspots* foram identificados através do servidor KFC. Ao comparar as regiões de *hotspot* com banco de dados de polimorfismos (dbSNP-NCBI) verificamos que resíduo de interleucina na posição 1084 é um polimorfismo clínico que pode sofrer mutação em *frameshift* (inserção um código de parada antes da porção terminal da proteína) sendo substituída por uma serina. O ensaio de mutagênese foi realizado pelo PyMol, alterando o resíduo *hotspot* de interleucina na posição 1084 pelo resíduo polimórfico de serina na mesma posição. Foi observado expressiva mudança estrutural e perda de parte da interface de interação entre as proteínas após a mutagênese. Em conclusão, a mutação foi capaz de desestruturar a conformação do complexo e a superfície de contato entre as proteínas, o que pode aumentar a susceptibilidade de desenvolvimento de leucemias.

**PALAVRAS-CHAVE:** *hotspots*, leucemia, mutação, p53, CREBBP.

### IN SILICO ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN P53 AND CREBBP PROTEIN AND THEIR RELATION WITH LYMPHOMAS

**ABSTRACT:** CREBBP is a protein responsible for regulating gene expression through signal transduction pathways, interfering with cell growth, differentiation, protein stabilization during transcription, regulation of proteins by acetylation and participation in chromatin remodeling. P53 is a protein associated with the response to cellular stress and apoptosis in the face of DNA damage. Mutation in the CREBBP gene impairs its interaction with p53 resulting in a significant effect on the disorder of the hematopoietic system. Thus, the objective of the present work is to study the interaction between p53 and CREBBP when a mutation is inserted in a hotspot, simulating a clinical polymorphism linked to the development of leukemia. Bioinformatics tools were used to predict protein-protein interaction through Cluspro. The analysis of the interaction interface and the amino acids involved in this interaction was established through the PyMol program. The hotspots were identified through the KFC server. When comparing the hotspot regions with a database of polymorphisms (dbSNP-NCBI), we verify that interleukin residue at position 1084 is a clinical polymorphism that can undergo frameshift mutation (insertion of a stop code before the terminal portion of the protein) being replaced for a serine. The mutagenesis assay was performed by PyMol, changing the hotspot residue of interleukin at position 1084 by the polymorphic residue of serine in the same position. Significant structural change and loss of part of the interaction interface between proteins was observed after mutagenesis. In conclusion, the mutation was able to disrupt the complex conformation and the contact surface between proteins, which can increase the susceptibility of leukemia development.

**KEYWORDS:** hotspots, leukemia, mutation, p53, CREBBP.

## 1 | INTRODUÇÃO

Linfoma não-Hodgkin são neoplasias hematológicas que se originam nos linfonodos, cuja patogênese está associada a lesões genéticas que afetam oncogenes e genes

supressores de tumores [1]. Entre as mutações e deleções recorrentes em linfomas não-Hodgkin destaca a inativação do gene que codifica para a acetiltransferase [3].

CREBBP é uma proteína nuclear necessária para a transcrição ativada de um grande número de genes celulares e está envolvido em vários processos, incluindo sinalização dependente de AMPc, acetilação de histonas, ativação ou inativação mediada por acetilação de proteínas não-histonas, controle do ciclo celular, ubiquitinação, reparo de danos ao DNA e apresentação de antígenos [5,6].

É conhecida a importância da proteína p53 nas neoplasias, a qual é induzida por danos no DNA, levando a parada do ciclo celular com consequente ativação de mecanismos de reparo e indução à apoptose [7]. Embora nas hemopatias malignas as alterações na proteína p53 sejam observadas com menor frequência em comparação com tumores sólidos, estudos sugerem que mutações no gene P53 são um segundo evento na progressão de certas hemopatias neoplásicas [8].

Investigações científicas tem demonstrado o papel relevante de interações proteicas na transformação celular durante o processo de carcinogênese, sendo fundamental para a sua compreensão e proposição de estratégias terapêuticas [9]. Estudos demonstram um papel crítico dos coativadores da proteína de ligação ao p300 / CREBBP nas respostas da p53 ao dano ao DNA. A associação de p300/ CREBBP a se ligam a p53 durante a resposta a danos no DNA e são necessários para a sua transativação completa, bem como os efeitos da p53 na parada do crescimento e apoptose [10].

Diante da importância da interação entre os complexos p53/ CREBBP para a manutenção da resposta de reparo e apoptose em hemopatias malignas, propomos avaliar, através de ferramentas de bioinformática, a interação entre a p53 e a CREBBP quando inserida uma mutação pontual em um *hotspot*, simulando um polimorfismo clínico ligado ao desenvolvimento de leucemias.

## 2 | METODOLOGIA

Ferramentas de bioinformática foram usadas para prever a interação proteína-proteína através do Cluspro. Esse servidor permite a visualização e análise da interface de interação e dos aminoácidos envolvidos nessa interação. A visualização e análise das estruturas também foram estabelecidas através do programa PyMol. As áreas que mais contribuem para o contato entre estas duas proteínas são chamadas de *hotspots*, e foram identificadas através do servidor KFC2, que é capaz de analisar estruturas químicas e físicas de um resíduo e prever as possíveis interações e ligações entre proteínas reconhecendo características estruturais de resíduos usando modelos experimentais anteriores [2]. Tais regiões são alvos para estudo de mutações, uma vez que hotspots polimórficos podem alterar a conformação do complexo proteico e aumentar a predisposição a doenças [11].

O servidor KFC2 foi utilizado para gerar uma tabela de melhores *hotspots*, que foi usada para selecionarmos o alvo para análise [2]. Comparamos as regiões de *hotspots* com

banco de dados do NCBI, na lista de polimorfismos SNP: *gene view*, para a escolha do alvo (dbSNP-NCBI). E foi escolhido o resíduo de interleucina na posição 1084 que é um polimorfismo clínico que pode sofrer mutação em *frameshift* - inserção um código de parada antes da porção terminal do gene- e sua substituição por uma serina. Na região do resíduo 1084 foi desenhado um peptídeo modulador da interação entre a p53 e a CREBBP [4].

O ensaio de mutagênese foi realizado pelo PyMol, alterando o resíduo *hotspot* de interleucina na posição 1084 pelo resíduo polimórfico de serina na mesma posição.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Interface de interação e visualização dos hotspots

O servidor Cluspro2 foi utilizado para visualização da região de docagem entre as duas proteínas, liberando um arquivo em PDB possibilitando a modelagem e visualização desta interface de contato, pelo programa Pymol, a modelagem permite a visualização da estrutura 3D da proteína possibilitando a diferenciação das duas proteínas e o destaque da superfície de interação entre elas que está marcado de branco (figura 1). Este programa também possibilitou a visualização das estruturas químicas em diferentes arranjos para melhor modelagem das estruturas de docagem o que permitiu a marcação das áreas em *hotspots* (figura 2).

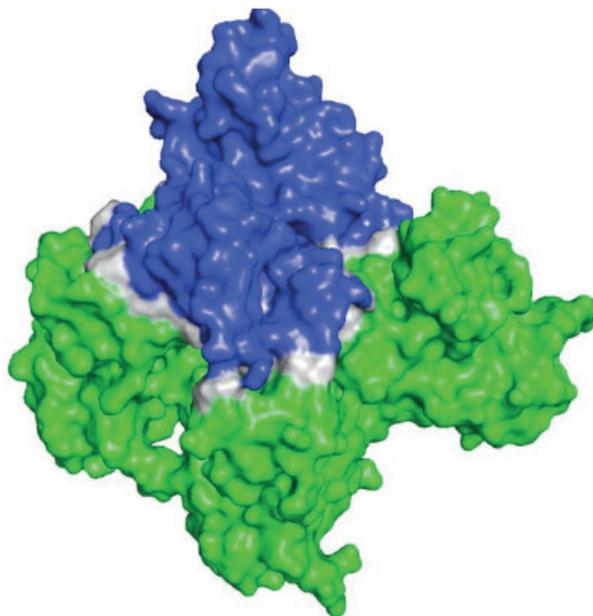


Figura 1: Imagem da superfície das proteínas P53 (azul) e CREBBP (verde) destacando a interface de interação entre elas (branco).

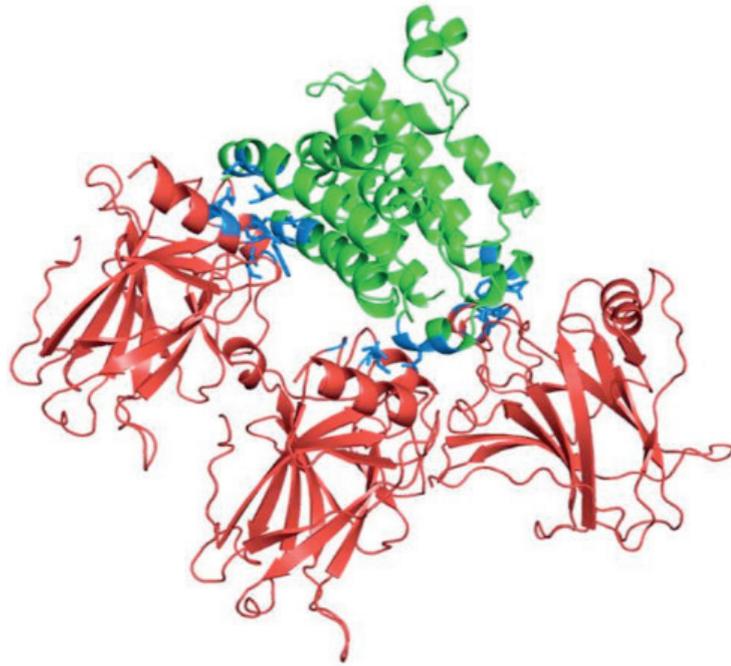


Figura 2: Estrutura proteica em forma de cartoon das proteínas P53 (azul) e CREBBP (verde). Áreas de hotspots em azul.

### 3.2 Docagem do resíduo com a proteína alvo

Ao escolher o *resíduo de interleucina na posição 1084* para docagem (figura 3), foi submetido no Cluspro o resíduo escolhido da p53 e a proteína CREBBP. Com isso se pode ter o resultado do local de interação entre o resíduo e a proteína e o arcabouço de ligação (figura 4).



Figura 3: Resíduo de interleucina na posição 1084, peptídeo escolhido para análise.

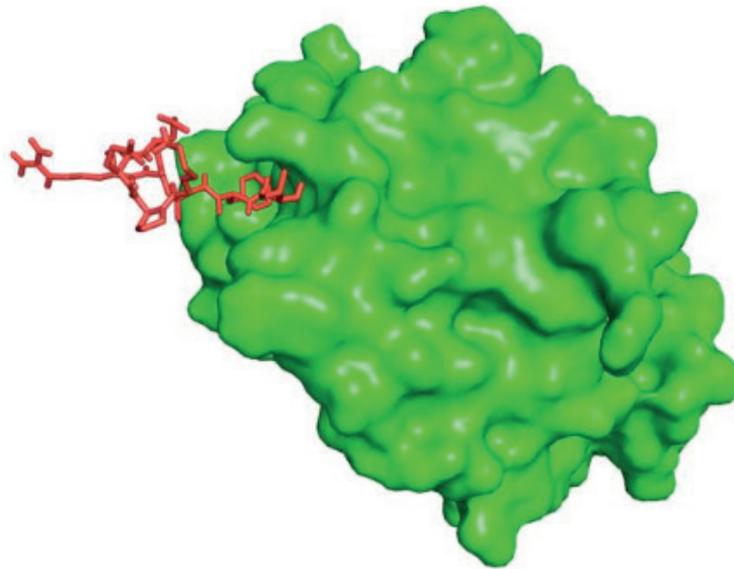


Figura 4: Docagem do peptídeo (vermelho) na proteína CREBBP (verde).

### 3.3 Modelagem da mutagênese

Através do programa Pymol foi possível realizar o ensaio de mutagênese a partir da inserção mutação pontual no resíduo de interleucina na posição 1084, que foi substituída por uma serina, obtendo um arranjo estrutural muito diferente da interação normal da proteína (figura 6). E com o servidor Cluspro foi possível ter a predição das possíveis interações de menor energia entre e as proteínas após a mutação (figura 7). As mutações nas proteínas P53 e CREBBP podem gerar danos ao sistema hematopoiético e até mesmo câncer [10], e quando utilizado essa amostragem que reitera a possível desordem na estrutura normal da interação entre as proteínas, há uma confirmação nos possíveis alvos críticos de mutações que podem causar estes danos.

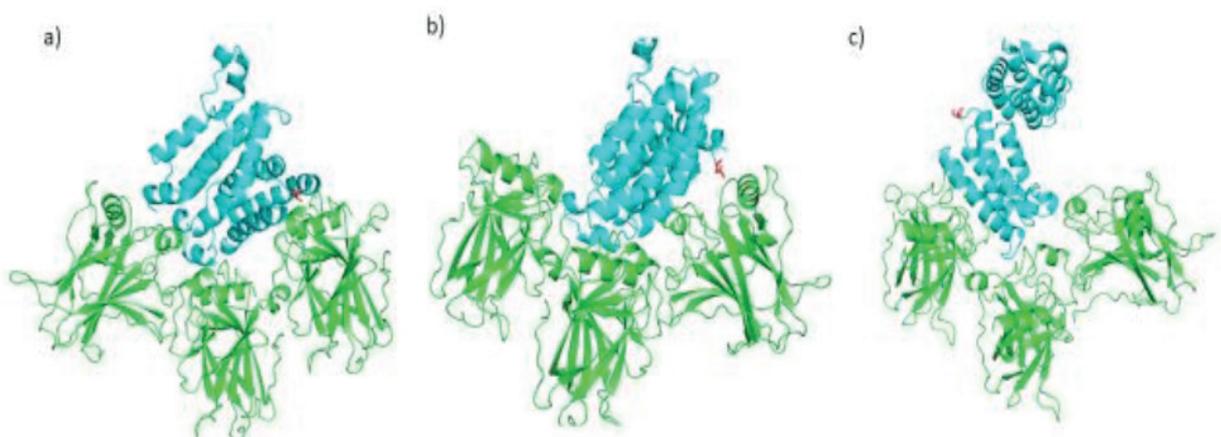


Figura 5: Possíveis interações entre as proteínas. a) interação normal; b) e c) possíveis interações modeladas pelo Pymol.

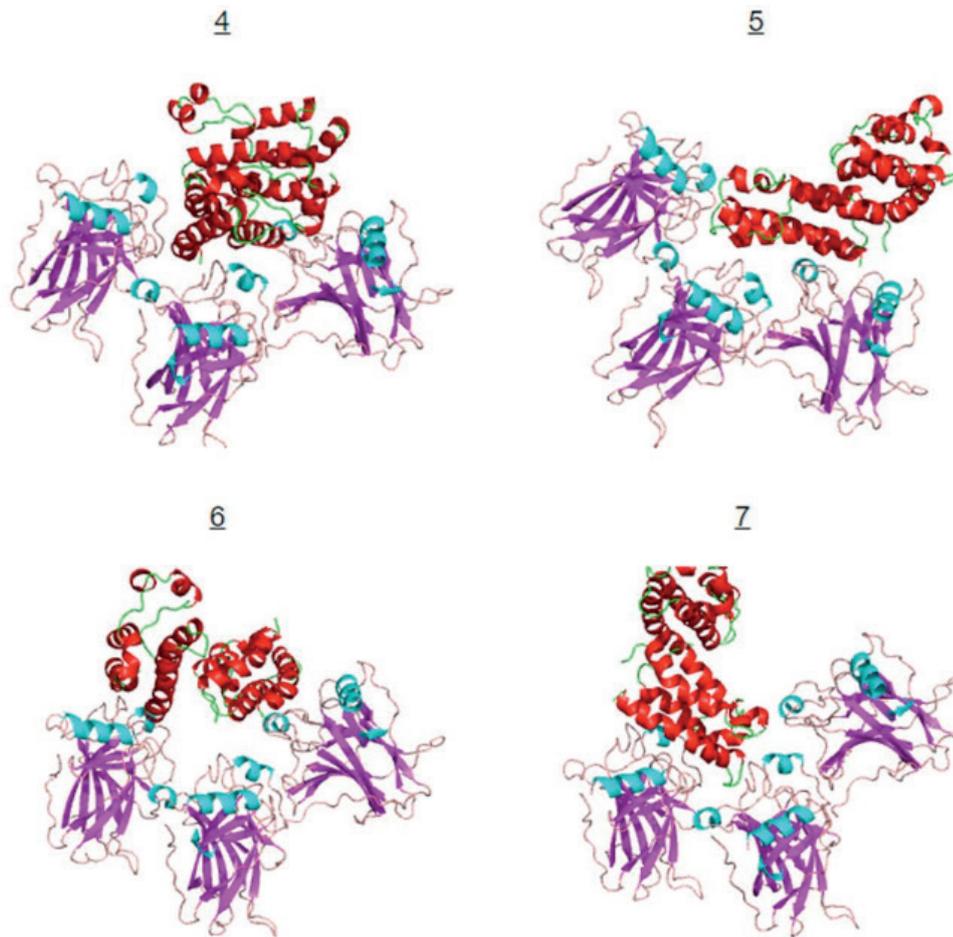


Figura 6: Interações de menor energia entre as proteínas ao ser inserida a mutação de um aminoácido, obtidas a partir do servidor Cluspo.

A desestruturação da estrutura normal da interação proteica é um indicio muito forte frente aos danos já conhecidos pela associação desta proteína (figura 7)

#### 4 | CONCLUSÃO

Foi observado expressiva mudança estrutural e perda de parte da interface de interação entre as proteínas após a mutagênese. O alinhamento da estrutura selvagem com a estrutura mutada evidenciou a diferença de posição entre as duas estruturas. Em conclusão, a mutação foi capaz de desestruturar a conformação do complexo e a superfície de contato entre as proteínas, o que pode aumentar a susceptibilidade de desenvolvimento de leucemias.

#### REFERÊNCIAS

BLOMBERG, Piers A.; WALL, Meaghan; SEYMOUR, John F. The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. **European journal of haematology**, v. 95, n. 4, p. 280-293, 2015.

DARNELL, Steven J.; PAGE, David; MITCHELL, Julie C. An automated decision-tree approach to predicting protein interaction hot spots. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 813-823, 2007. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 471(7337), 189–195 (2011).

PORTER, Kathryn A. et al. ClusPro PeptiDock: efficient global docking of peptide recognition motifs using FFT. **Bioinformatics**, v. 33, n. 20, p. 3299-3301, 2017

KALKHOVEN, Eric. CBP and p300: HATs for different occasions. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1145-1155, 2004.

KRETISOVALI, Androniki et al. Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with the class II transactivator. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 11, p. 6777-6783, 1998.

MANTOVANI, Fiamma; COLLAVIN, Licio; DEL SAL, Giannino. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 2, p. 199-212, 2019

OTERO, Luize et al. Chromosome 17 abnormalities and mutation of the TP53 gene: Correlation between cytogenetics, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 40-43, 2005

IVANOV, Andrei A.; KHURI, Fadlo R.; FU, Haiyan. Targeting protein–protein interactions as an anticancer strategy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 7, p. 393-400, 2013  
Grosman SR. p300/CBP/ p53 interaction and regulation of the p53 response: p300/CBP and p53 signaling. *European Journal of Biochemistry*. 268(10), 2773–2778 (2001).

SUZUKI, Keli Tiekko. **Investigação molecular por sequenciamento do gene CBP em portadores da síndrome de Rubinstein-Taybi**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

## EFEITO DO EXTRATO DE *Uncaria tomentosa* E PALMITATO SOBRE A MORTE CELULAR DE MIOBLASTOS C2C12

Data de aceite: 18/06/2020

**Bruna Letícia de Freitas**  
**Jeniffer Farias dos Santos**  
**Carla Roberta de Oliveira Carvalho**  
**Viviane Abreu Nunes**

### DE LIPÍDIOS A ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Lipídios consistem em uma classe de macromoléculas orgânicas cuja insolubilidade em solvente aquoso é a principal característica. Esta lhes confere uma importância biológica, pois as células tanto podem utilizar a insolubilidade para dividir dois compartimentos que devem ser isolados, o meio intra e o extracelular, quanto podem armazenar os lipídios de forma praticamente anidra e, conseqüentemente, representam uma importante forma de reserva energética. Os lipídios intracelulares são encontrados, em sua maioria, na forma de triglicerídeos (TG), que são compostos por uma molécula de glicerol associada a três moléculas de ácidos graxos.

Uma vez liberados devido à lipólise, o glicerol é transportado livremente pelo sangue até o fígado, onde pode ser utilizado na gliconeogênese ou servir como intermediário da glicólise, na forma de gliceraldeído-3-fosfato<sup>6,12</sup>. Já os ácidos graxos são transportados no sangue

majoritariamente ligados de modo reversível à albumina. Desta maneira, são denominados de ácidos graxos livres (AGL), e são utilizados principalmente pelo tecido muscular esquelético e cardíaco como fonte energética<sup>18</sup>.

### MECANISMO DA LIPOTOXICIDADE NA RESISTÊNCIA À INSULINA

O tecido muscular esquelético, em repouso, é responsável pelo consumo de 20 a 30% do oxigênio e contribui para a regulação da glicemia, uma vez que capta aproximadamente, 75% de toda glicose sanguínea. É, portanto, um tecido importante para o balanço energético<sup>35</sup>, principalmente no estado pós-alimentar como resultado da ação da insulina.

No entanto, diversos fatores contribuem para o comprometimento da ação deste hormônio no músculo esquelético. Como exemplo, o acúmulo ectópico de gordura e a excessiva disponibilidade de lipídeos e carboidratos na alimentação. Elevadas concentrações plasmáticas de AGL estão associadas a aumento do conteúdo lipídico intramiocelular<sup>13</sup>, que por sua vez interferem na sinalização celular da insulina, prejudicando o transporte, a fosforilação e a subsequente oxidação da glicose, bem como a síntese de

glicogênio de modo semelhante aos defeitos moleculares observados no diabetes do tipo 2<sup>15, 23</sup>.

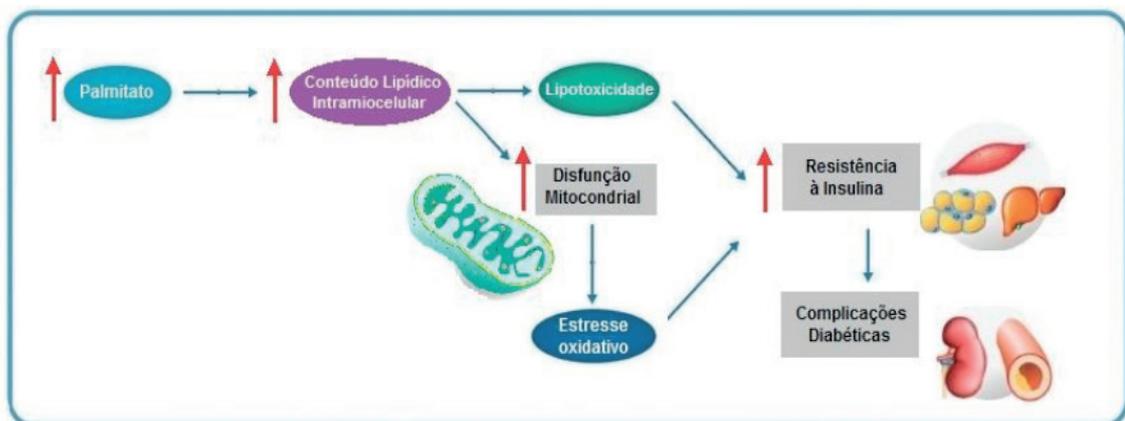
O ácido palmítico é um dos AGL mais abundantes, representando cerca de 75% do total de AGL plasmáticos<sup>6</sup>. Os ácidos graxos de cadeia longa – que contém número maior do que doze átomos de carbono, como palmítico, linoleico e linolênico, tem efeito potencializador da secreção de insulina em resposta à concentração basal de glicose, que é cerca de 3,0 mM. Ademais, dietas ricas em AG monoinsaturados (óleo de oliva, com 71% de ácido oleico) e poli-insaturados (óleo de soja, com cerca de 60% de linoleico) aumentam esta resposta. Já as dietas ricas em ácidos graxos saturados (banha e manteiga de origem animal, como de porco por exemplo, contendo cerca de 30-35% de ácidos palmítico e esteárico) reduzem a responsividade das ilhotas pancreáticas à glicose<sup>25</sup>.

Curi<sup>6</sup> descreve que a concentração fisiológica de AGL plasmáticos, durante o jejum em humanos, varia de 100 a 500  $\mu\text{M}$ , sendo a média de 300  $\mu\text{M}$ . O *turnover* (taxa de produção e degradação) deste AGL é, nesse contexto, de 6.000  $\mu\text{mol}/\text{min}$  por kg de peso corporal. No estado alimentado, tanto a concentração do AGL quanto seu *turnover* são menores<sup>6</sup>.

Concentrações de AGL em pessoas com diabetes do tipo 2 não compensados são significativamente maiores. O palmitato, por exemplo, possui taxas no plasma de 1,5 e 3 vezes maiores nestas pessoas durante o sono noturno e estados pós-prandiais, respectivamente, quando comparados com indivíduos euglicêmicos<sup>12, 37</sup>.

Distúrbios metabólicos relacionados à resistência à ação da insulina no tecido muscular apresentam como mecanismos celulares o comprometimento dos componentes iniciais da cascata de sinalização da insulina<sup>27</sup>, aumento do conteúdo de triglicerídeos intramusculares<sup>14,19</sup> e queda na habilidade da insulina em regular a utilização de combustíveis celulares<sup>4</sup>.

Os efeitos mediadores nas alterações dos níveis de AGL de cadeia saturada no músculo esquelético incluem: aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, aumento na taxa de apoptose, inibição da sinalização pela insulina e redução na captação de glicose<sup>11,16</sup> (Figura1).



**Figura 1. Mecanismo proposto para a lipotoxicidade no diabetes do tipo 2.** O acúmulo do AGL palmitato leva à lipotoxicidade e à disfunção mitocondrial, que contribuem para o aumento do quadro de resistência à insulina em tecidos alvo como o músculo esquelético e para as complicações associadas ao diabetes.

A exposição celular à hiperglicemia e o aumento de AGL induzem alterações nas vias de sinalização, que levam à disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, pois induz à produção de superóxido, o que pode ser restaurado por tratamentos antioxidantes em algumas situações<sup>7</sup>.

## TERAPIAS FARMACOLÓGICAS E POSSÍVEIS ALTERNATIVAS NÃO FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa uma doença de alto custo, tanto para os indivíduos afetados quanto para o sistema de saúde, elevando consideravelmente os gastos no controle da doença<sup>40</sup>. Além disso, os tratamentos farmacológicos para o controle da resistência à insulina, e para minimizar suas comorbidades, aprovados para uso pelo FDA (por exemplo, orlistat, lorcaserin, fentermina-topiramato, rimonabant e sibutramina/merídia) têm efeitos colaterais importantes que limitam seu uso, como a doença do refluxo esofágico, hipertensão arterial, obstipação intestinal, enxaqueca, doença cardíacas, depressão, falência hepática, insônia, efeitos cognitivos e psiquiátricos<sup>10</sup>.

O uso de fitoterápicos por pacientes acometidos por DM2 representa uma forma alternativa de tratamento, pois deve-se levar em consideração os benefícios como o baixo custo e a possibilidade de união à terapia convencional.

Nas duas últimas décadas, pesquisadores desenvolveram diversos métodos de utilização de fitoterápicos para testar suas propriedades farmacológicas, incluindo a redução da morte de células epiteliais em resposta ao estresse oxidativo, citoproteção por meio da remoção de radicais livres, redução do estresse oxidativo e inibição direta da produção de fatores que regulam a inflamação<sup>8</sup>.

Essa busca por alternativas não farmacológicas derivadas de plantas levou a criação do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, aprovado pelo Decreto número 5.813 de 22 de junho de 2006. Esse programa foi, e ainda é, utilizado para avaliar a eficiência de fitoterápicos com potencial uso clínico. Em novembro de 2015, foi divulgada uma atualização da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (RENAFITO), na qual foram apresentados 71 nomes de plantas medicinais de interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS). Dentre elas, estão algumas como a *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como Unha-de-gato.

A *Uncaria tomentosa* é um fitoterápico que possui a capacidade de modular a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>3, 17, 31</sup>, além de inibir a proliferação de linfócitos<sup>1, 38</sup>, conferindo-lhe, assim, uma ação antiinflamatória. Ela está disponível nas Unidades Básicas de Saúde dos municípios que aderiram à Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, como a Farmácia Viva, para distribuição aos usuários mediante prescrição por um médico especializado. Sua indicação no SUS é restrita ao tratamento de doenças articulares, em especial a osteoartrite.

Estudos prévios desenvolvidos no laboratório de Sinalização Celular da Universidade de São Paulo mostraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, por um período de 10 a 12 semanas, apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina, enquanto que o grupo tratado com este fitoterápico mostraram redução na glicemia de jejum e aumento da sensibilidade à insulina, entre outros parâmetros, sugerindo que tal tratamento poderia interferir na resistência à insulina no tecido muscular (Tabela1).

Resultados	Dieta Hiperlipídica	Tratamento (Ut)
Glicemia de jejum	↑	↓
K <sub>itt</sub>	↓	↑
GTT	↑	-
Ingestão calórica	↑	-
Índice de massa corpórea (IMC)	↑	↓
Consumo de VO <sub>2</sub> e Produção de VCO <sub>2</sub>	↓	↑

Tabela 1: Efeito da dieta hiperlipídica e do tratamento com *Uncaria tomentosa* sobre glicemia de jejum, sensibilidade à insulina medida pelo índice de decaimento da glicose (Kitt), tolerância glicose (GTT), ingestão calórica, medida de massa corporal (IMC) e gasto energético medido pelo consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono (Araújo et al., 2018).

Considerando esses elementos, foi desenvolvido um sistema para se avaliar o efeito do extrato seco de *Uncaria tomentosa*, na proteção de células musculares esqueléticas da linhagem C2C12, contra o possível efeito citotóxico do palmitato, um dos AGL mais abundantes no plasma, testado em diferentes concentrações. Os resultados gerados nesse trabalho podem contribuir para melhor entendimento do mecanismo molecular relacionado à resistência à insulina nas células do músculo esquelético, abrindo perspectivas para o uso da *Uncaria tomentosa* no tratamento do diabetes.

## DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA UNCARIA TOMENTOSA E PALMITATO SOB CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultivo padrão - Eagle modificado por Dulbecco (do inglês de, *Dulbecco modified Eagle Medium* com alta concentração de glicose – DMEM) contendo soro fetal bovino (SFB) 10%. Para simular a temperatura e oximetria humana, as culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo CO<sub>2</sub> 5%.

Foi realizada uma curva dose-resposta para o tratamento com *Uncaria tomentosa* (Figura 3) e palmitato (Figura 4). Foram classificadas em viáveis ou citotóxicas para as células, segundo a tabela 2, utilizando o método MTT, que quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan.

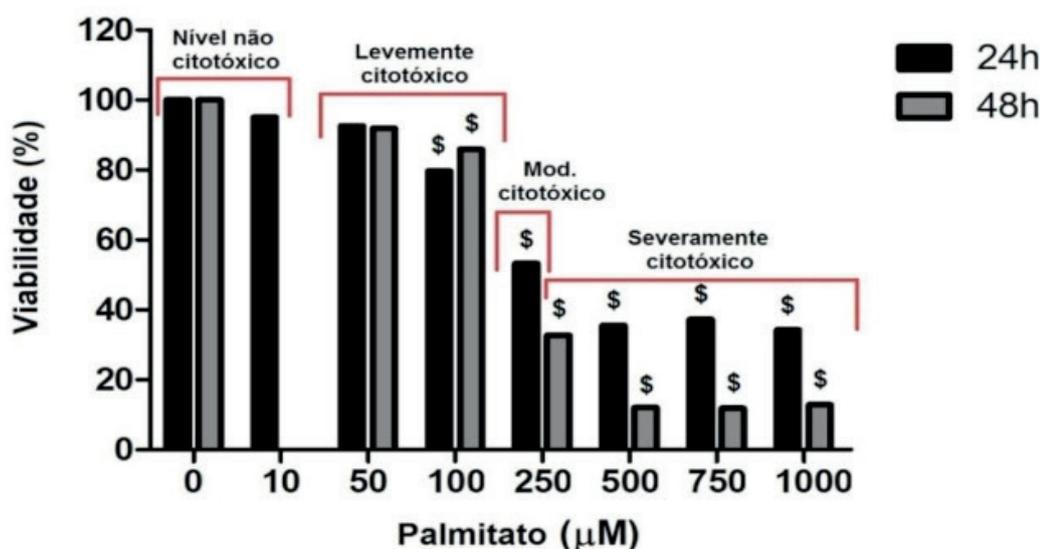
Os dados foram obtidos pela absorbância mensurada em 595 nm, e expressos em termos da porcentagem de viabilidade celular média ± desvio padrão de amostras (n≥3),

segundo Oliveira<sup>22</sup> e descrito na Tabela 2.

Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)
Não-citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

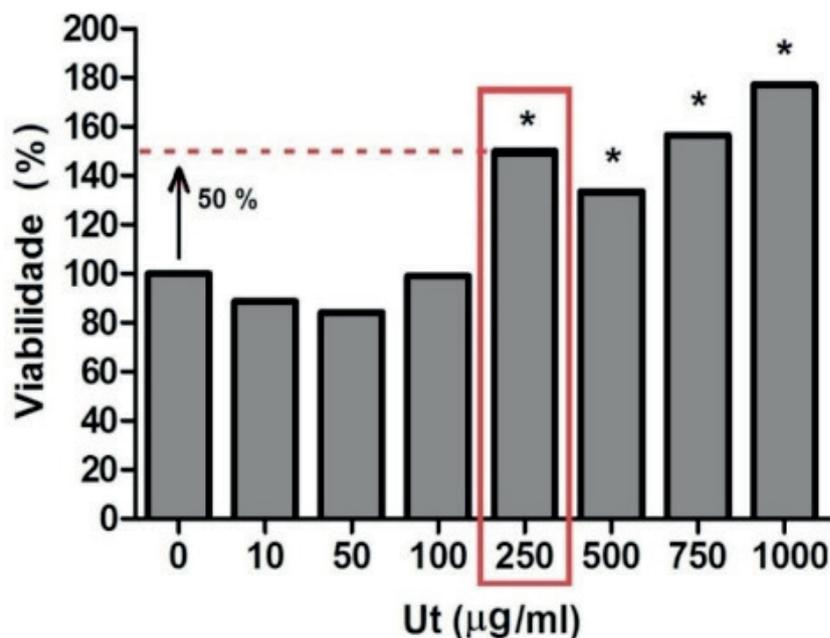
Tabela 2. Classificação de citotoxicidade em relação à porcentagem de viabilidade celular.

Os resultados mostraram que a viabilidade das células tratadas com palmitato, a partir da concentração de 250  $\mu\text{M}$ , foi reduzida para, aproximadamente, 50% em 24 h e 65% em 48 h (Figura 3). Tais resultados indicam que a exposição das células a concentrações de palmitato maiores do que 250  $\mu\text{M}$  causa diminuição significativa da viabilidade celular, sendo considerado severamente citotóxico em concentrações superiores a 500  $\mu\text{M}$ .



**Figura 3. Efeito do palmitato sobre as células C2C12.** O palmitato em concentrações maiores do que 250  $\mu\text{M}$  foi citotóxico para as células C2C12. Foram realizadas incubações, por 24 e 48 h, com o palmitato nas concentrações 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{M}$ . Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 7 experimentos em triplicatas. A absorbância foi medida em 595 nm. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \$, indica diferença significativa quando comparado ao controle ( $p < 0.05$ ).

Por outro lado, a incubação com o extrato da *Uncaria tomentosa* induziu o aumento da viabilidade celular (Figura 4). A menor concentração que induziu aumento em 50% da viabilidade celular em relação ao controle foi a de 250  $\mu\text{g/ml}$ . Assim, foi escolhida esta concentração para ser utilizada nos experimentos subsequentes como aquela capaz de induzir efeito protetor frente ao tratamento compalmitato.



**Figura 4. Efeito da *Uncaria tomentosa* (Ut) sobre as células C2C12.** Foram realizadas incubações, por 24 h, com o extrato seco de Ut nas concentrações 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg. As concentrações de Ut maiores do que 250 µg/ml causaram aumento da viabilidade das células musculares, quando comparado com o controle. A absorbância foi medida em 595 nm. Os dados estão apresentados como a média ± DP. \*, indica diferença significativa quando comparado ao controle.

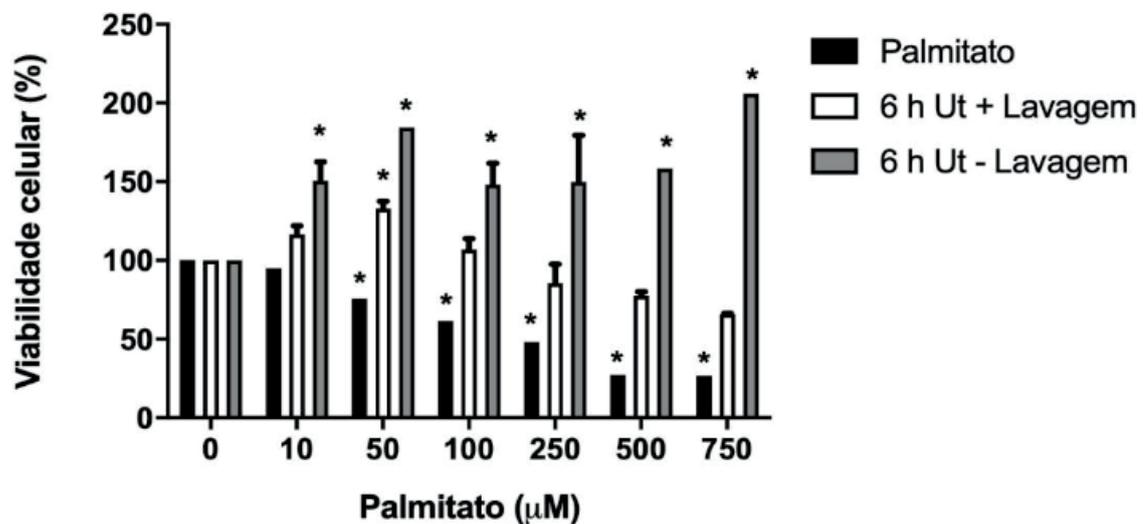
## EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *UNCARIA TOMENTOSA* CONTRA A CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELO PALMITATO EM CÉLULAS MUSCULARES

Para se verificar o efeito protetor do extrato de *Uncaria tomentosa* sobre a citotoxicidade do palmitato, as células foram plaqueadas em meio de cultivo padrão. Após 24 h em cultura, as células foram incubadas com o extrato de *Uncaria tomentosa* na concentração final de 250 µg/ml, e permaneceram em cultura por 6 horas. Após os períodos definidos, o meio contendo a *Uncaria tomentosa* foi substituído por meio padrão contendo palmitato em diferentes concentrações (10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µM) e as células mantidas em cultura por mais 24 h.

Ainda, para se verificar se o possível efeito protetor da *Uncaria tomentosa* contra a citotoxicidade induzida pelo palmitato, dependia de sua presença contínua no meio de cultura, foram adotadas duas abordagens: 1) lavagem com tampão fosfato salino (PBS) após a pré-incubação, por 6 h, com o fitoterápico, e posterior incubação do palmitato em diferentes concentrações, para avaliar o eventual efeito preventivo da lesão induzida pelo palmitato; 2) após a pré-incubação, 6 h, com o fitoterápico, o palmitato nas diferentes concentrações foi, diretamente, adicionado às culturas, para avaliar o eventual efeito terapêutico.

Na Figura 5, estão mostrados os resultados referentes à viabilidade celular após tratamento com *Uncaria tomentosa* 250 µg/ml, por 6 h. Nas culturas que permaneceram com *Uncaria tomentosa* e foram tratadas com palmitato, verificou-se aumento da viabilidade em, pelo menos, 45%, chegando a 90%, para todas as concentrações de palmitato. Por outro lado, as amostras em que a *Uncaria tomentosa* foi removida após o período de pré-

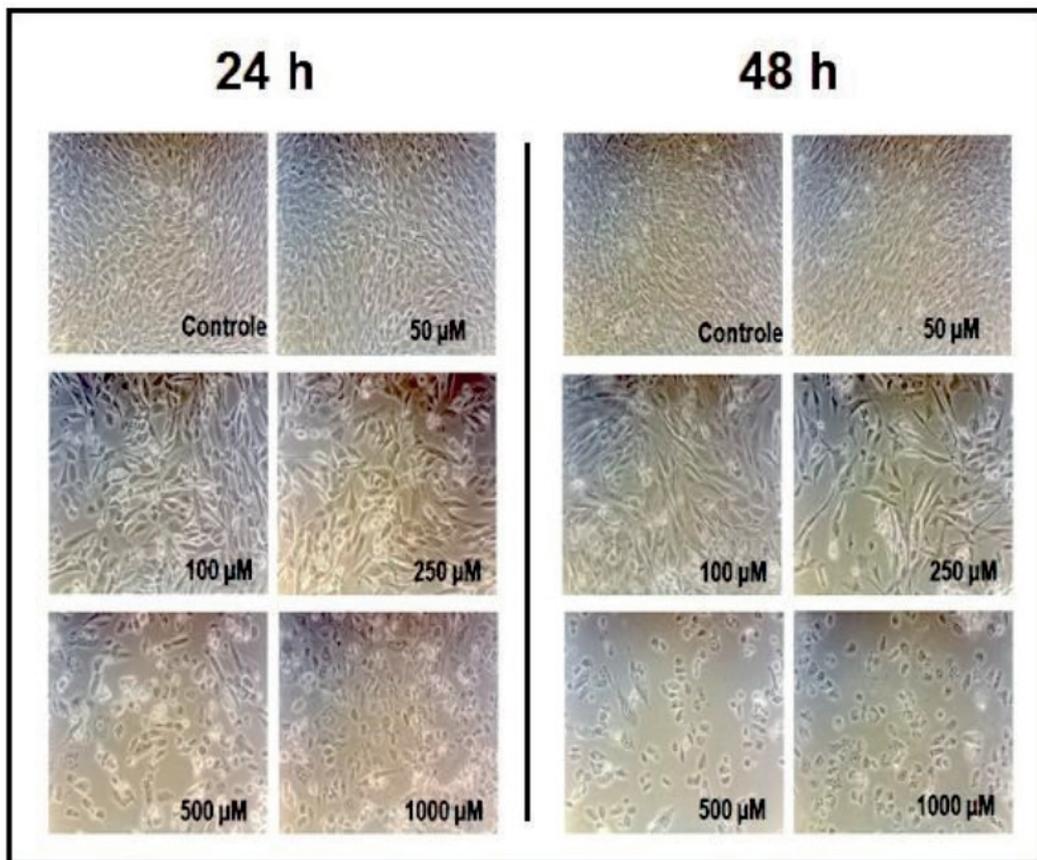
incubação de 6 h, mostraram aumento de até 30% na viabilidade das células na incubação com palmitato 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , quando comparadas ao controle (zero) e aumento de 35 à 40% na viabilidade das células na incubação com palmitato 100 à 750  $\mu\text{M}$ , quando comparadas à própria incubação do ácido graxo.



**Figura 5. Efeito da Ut sobre a citotoxicidade induzida por palmitato.** Após pré-incubação com o fitoterápico Ut 250  $\mu\text{g/ml}$  por 6 h, foi feita a incubação, por 24 h, com palmitato nas concentrações 10, 50, 100, 250, 500 e 750  $\mu\text{M}$ . Os dados estão apresentados como média  $\pm$  DP \*, indica a presença de diferença estatisticamente significativa no aumento da taxa de viabilidade comparado ao controle ( $p < 0,05$ ).

## A CITOTOXICIDADE DO PALMITATO ALTERA A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MUSCULARES *IN VITRO*

Foi realizada análise da morfologia dos mioblastos C2C12 durante os ensaios, usando-se as diferentes concentrações de palmitato (Figura 6). O tratamento das células com as concentrações crescentes de palmitato resultou em células mais irregulares, com diminuição em seus diâmetros e quantidade nuclear. A confluência e os agrupamentos em colônias foram reduzidos, sendo mais evidentes no tratamento com 48h de palmitato.



**Figura 6. Células C2C12 incubadas com diferentes concentrações de palmitato.** Fotografias capturadas das células após os períodos de 24 e 48 h de incubação com palmitato sob as diferentes concentrações descritas. As células cultivadas em meio de cultivo padrão foram consideradas controle. Quanto maior a dose de palmitato, mais as células foram perdendo suas características fusiformes e de agrupamento em colônias. Ampliação de 100 x.

## DISCUSSÃO

Considerando que a concentração aumentada de AGL no meio extracelular é capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, resultando em lipotoxicidade associada a estresse de retículo endoplasmático, desequilíbrio no conteúdo de cálcio intracelular, disfunção mitocondrial, resistência à insulina e morte celular em diversos tipos celulares, nós demonstramos que o palmitato nas concentrações de 250 a 1000  $\mu\text{M}$  foi citotóxico para as células musculares C2C12. Este efeito foi dose e tempo dependente.

Por outro lado, o fitoterápico *Uncaria tomentosa*, aumentou a viabilidade celular em até 170%, provavelmente envolvendo 2 efeitos distintos: (1) devido a um aumento na proliferação celular e (2) a uma redução da morte celular.

Avaliando o efeito protetor do fitoterápico contra a toxicidade do AGL, foi observado que após os tratamentos com *Uncaria tomentosa* 250  $\mu\text{g/ml}$ , por 6 h, tanto nas culturas que permaneceram com o fitoterápico, como as que foram lavadas após o tratamento com *Uncaria tomentosa*, e tratadas com palmitato, verificou-se aumento da viabilidade celular, sugerindo uma diminuição do estresse oxidativo.

Neste estudo, foi proposto um sistema para simulação de um cenário de citotoxicidade, induzida pelo ácido palmítico, com concentrações que podem estar presentes desde uma

situação de jejum noturno até um jejum prolongado ou diante de uma dislipidemia associada a DM2 descompensado (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu$ M).

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de palmitato de 250, 500 e 750  $\mu$ M foram responsáveis por diminuição significativa da viabilidade celular, em 24 horas. O fitoterápico se mostrou eficiente para prevenir e reduzir o efeito tóxico do AGL.

Embora não tenham sido analisados os possíveis mecanismos celulares pelos quais o extrato foi capaz de interferir sobre a citotoxicidade do AGL, esse estudo, nos permite propor não apenas futuros ensaios para compreensão dos mecanismos envolvidos, mas o estabelecimento de um modelo *in vitro* e viável para avaliar potencial efeito de outros fitoterápicos, como proteção à citotoxicidade associada à resistência à insulina.

## REFERÊNCIAS

1. Akesson, C. et al. C-Med 100®, a hot water extract of *Uncaria Tomentosa*, prolongs lymphocyte survival in vivo. *Phytomedicine*, v. 10, p. 23 - 33,2003.
2. Allen-Hall, L. et al. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria Tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 2, p. 312 - 317,2007.
3. Allen-Hall, L. et al.,. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n 3, p. 685 - 693,2010.
4. Brehm, A. et al. Increased Lipid Availability Impairs Insulin-Stimulated ATP Synthesis in Human Skeletal Muscle. *American Diabetes Association*, v.55, n.1, p. 136 - 140,2006.
5. Bors, M. et al. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (in vitro). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.33, n. 2 p. 127 - 134,2012.
6. Curi R, Pompeia C, Miyasaka C, Procópio J. Entendendo as gorduras - os ácidos graxos. 1ª ed., São Paulo: Ed. Manole,2002.
7. Deldicque, L. et al.,. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v.299, n. 5, p. E695 - E705,2010.
8. Dreifuss, A. et al.,. *Uncaria tomentosa* Exerts Extensive Anti-Neoplastic Effects against the
9. Walker-256 Tumour by Modulating Oxidative Stress and Not by Alkaloid Activity. *Plos One*, v. 8, n. 2, 2013.
10. Evans, J. et al.,. Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction? *American Diabetes Association*, v. 52, n. 1, p. 1 - 8,2003.
11. Ezequiel, D. et al.,. Obesidade: da fisiopatologia ao tratamento. *HU Revista*, 44 (2), 147,2019.
12. Hoehn, K.L. et al.,. IRS1-Independent Defects Define Major Nodes of Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, v. 7, n. 5, p. 421 - 433,2008.
13. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, p. 860 - 867, 2006.
14. Houstis, N. et al.,. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance.

Nature, v. 440, p. 944 - 948, 2006.

15. Kelley, D. et al., Muscle Triglyceride and Insulin Resistance. Annual Review of Nutrition, v. 22, p. 325 - 346, 2002.

16. Kelley, D. and Mandarino, L. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. American Diabetes Association, v. 49, n. 5, p. 677 - 683, 2000.

17. Lambertucci, R. et al., Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. Cellular Physiology, v. 216, n. 3, p. 796 - 804, 2008.

18. Lemaire, E. et al. Functional and morphological changes in the pancreatic remnant following pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastric anastomosis. British Journal of Surgery, v. 87, n. 4, p. 434 - 438, 2000.

19. Lehninger, D.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

20. Levin, A. et al., Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: Getting to the heart of the matter. American Journal of Kidney Diseases, v. 38, n. 6, p. 1398 - 1407.

21. Livak, K. and Schmittgen, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402 - 408.

22. Matsumoto, S. et al. Circulating p53-Responsive microRNAs are Predictive Indicators of Heart Failure after Acute Myocardial Infarction. Circulation Research, v. 122, n. 12, 2003.

23. Oliveira M. Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana. Tese de mestrado em Medicina e Ciências da Saúde - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.

24. Ozcan, U. et al., Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action and Type 2 Diabetes. Science, v. 306, n. 5695, p. 457 - 461, 2004.

25. Palou, A. et al. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. European Journal of Nutrition, v. 39, n. 4, p. 127 - 144, 2000.

26. Picinato, M. et al. Soybean- and olive-oils-enriched diets increase insulin secretion to glucose stimulus in isolated pancreatic rat islets. Physiol Behav, 65 (2): 289 - 94, 1998.

27. Peter, A. et al., Individual Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Modulates Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Human Myotubes and Is Associated With Skeletal Muscle Lipid Storage and Insulin Sensitivity In Vivo. American Diabetes Association, v. 58, n. 8, p. 1757 - 1765, 2009.

28. Petersen, K. and Shulman, G. Etiology of Insulin Resistance. The American Journal of Medicine, v. 119, n. 5, p. S10 - S16, 2006.

29. Pfaffl, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

30. Randle P. J. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. Diabetologia 1994; 37: S155 - S161.

31. Sandoval, M. et al., Cat's claw inhibits TNF alpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. Free Radical in Biology and Medicine, v. 29, p. 71 - 78, 2000.

32. Sandoval, M. et al., Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (Uncaria tomentosa and Uncaria

guianensis) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine*, v. 9, n. 4, p. 325 - 337, 2002.

33. Sandoval-Chacón, M. et al.,. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NK- $\kappa$ B. Blackwell Science Ltd, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 12, p. 1279 - 1289, 1998.

34. Solinas, G. and Becattini, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Molecular metabolism*, v. 6, n. 2, p. 174 - 184, 2017.

35. Stump, C. et al.,. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 4, 2003.

36. Stump, C.S. et al.,. The metabolic syndrome: Role of skeletal muscle metabolism. *Annals of Medicine*, v. 38, n. 6, p. 389 - 402, 2006.

37. Walter, P. and Ron, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, v. 334, n. 6059, p. 1081 - 1086, 2011.

38. Weigert, C. et al.,. Palmitate, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induces the Expression of Interleukin-6 in Human Myotubes through Proteasome-dependent Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 23942 - 23952, 2004.

39. Winkler, F. et al.,. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*, v. 6, n. 6, p. 553 - 563, 2004.

40. WORLDHEALTH ORGANIZATION. *Overweight and Obesity*, 2015.

WORLDHEALTH ORGANIZATION. *Diabetes: The costs of diabetes*. WHO Fact Sheet. n. 236, 2002.

## ALTERAÇÕES NA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS P53 E TPP1 COMO CAUSA DA ENDOMETRIOSE

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

Ciências Biológicas

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3632033730008798>

### **Olivia Basso Rocha**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/0176020525650551>

### **Jackeliny Garcia Costa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/6968057310324859>

### **Marcos Antonio Batista de Carvalho Junior**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/1104307184099700>

### **Katheryne Lohany Barros Barbosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/5289830186684127>

### **Kleber Santiago Freitas**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3813868830071259>

### **Livia do Carmo Silva**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/7092484043564604>

### **Gabriela Danelli Rosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de

**RESUMO:** A endometriose é uma doença caracterizada pelo crescimento anormal de tecido endometrial fora da cavidade uterina. A TPP1 é uma proteína telomérica, que faz parte do complexo de Shelterin. Ela é responsável por proteger o DNA do telômero através do bloqueio das vias de danos e reparos. A p53 tem papel na regulação do ciclo celular e em eventos como envelhecimento e carcinogênese. Caso a p53 não venha a interagir com a TPP1, o controle do ciclo celular pode ser perdido e a atividade da telomerase pode ser induzida, provocando uma instabilidade de genoma e aumento proliferativo com formação de células tumorais. O objetivo do presente trabalho foi identificar a interação entre tais proteínas e desenhar um peptídeo capaz de modular a ação da p53. Para verificar a interação, as estruturas das proteínas foram adquiridas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), foi utilizado o servidor Cluspro 2 para prever a interação. Através da análise de *hotspots* pelo servidor KFC para o desenho

do peptídeo. Um ensaio de mutagênese foi realizado para avaliar se polimorfismos podem alterar a interação das proteínas e aumentar a predisposição a doenças. O resultado da docagem proteína–proteína evidenciou a interface de interação entre as duas. Através dos polimorfismos encontrados no dbSNP, uma leucina na posição 127 foi mutada para uma arginina, o que resultou em uma falha na interface de interação. Assim é possível concluir que a interação entre as proteínas é necessária para que ocorra a supressão do aumento tecidual, que pode aumentar a predisposição à doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** DNA; proliferação celular; telômeros

## CHANGES IN THE INTERACTION OF P53 AND TPP1 PROTEINS AS A CAUSE OF ENDOMETRIOSIS

**ABSTRACT:** Endometriosis is a disease characterized by the abnormal growth of endometrial tissue outside the uterine cavity. TPP1 is a telomeric protein, which is part of the Shelterin complex. It is responsible for protecting the telomere's DNA by blocking pathways from damage and repair. P53 plays a role in the regulation of the cell cycle and in events such as aging and carcinogenesis. If p53 does not interact with TPP1, cell cycle control can be lost and telomerase activity can be induced, causing genome instability and proliferative growth with tumor cell formation. The aim of the present work was to identify the interaction between such proteins and to design a peptide capable of modulating the action of p53. To verify the interaction, the protein structures were acquired in the PDB database (Protein Data Bank), the Cluspro 2 server was used to predict the interaction. Through the analysis of hotspots by the KFC server for the design of the peptide. A mutagenesis assay was carried out to assess whether polymorphisms can alter the interaction of proteins and increase the predisposition to diseases. The result of the protein-protein docking evidenced the interaction interface between the two. Through the polymorphisms found in dbSNP, a leucine at position 127 was mutated to an arginine, which resulted in a failure in the interaction interface. Thus, it is possible to conclude that the interaction between proteins is necessary for the suppression of tissue increase to occur, which can increase the predisposition to the disease.

**KEYWORDS:** DNA; cell proliferation; telomeres

## INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença crônica, de caráter inflamatório, caracterizada pela localização ectópica do tecido endometrial (incluindo glândulas e estroma) em locais extra-uterinos, como septo retovaginal, superfícies peritoneais ou ovários (DAWSON et al., 2018). Apesar da endometriose não estar relacionada a altas taxas de mortalidade, os sintomas associados a doença podem causar um impacto significativo na qualidade de vida de um paciente e alguns casos podem representar fatores de risco para malignidades ginecológicas, como o câncer (CZYZYK et al., 2017).

Desde 1927, relatos de malignidade associada à endometriose têm sido apresentados (SAMPSON et al., 1927). Estudos epidemiológicos mostraram que a frequência de câncer

de ovário a partir de pacientes diagnosticados com endometriose foi de 0,3 a 0,8% (WEI et al.,2011). Acredita-se que uma predisposição genética seja multifatorial para endometriose, como perda de heterozigosidade, alterações no número de cópias de genes específicos de tecidos (MAFRA et al., 2017) , instabilidade de microssatélites (SÁINZ DE LA CUESTA et al.,2004) e mutações gênicas na proteína de reparo P53 (BISCHOFF et al.,2002; FUSEYA et al., 2012).

Acredita-se que o encurtamento dos telômeros tenha um papel importante na no processo de carcinogêneses, podendo funcionar como um mecanismo supressor de tumor, uma vez que as células com telômeros criticamente curtos sofrem senescência ou apoptose dependente de p53 (SHAY et al.,1991). A proteína p53 é uma proteína regulatória, que condições normais, tem sua baixa atividade nas células. No entanto, frente a determinados estresses, p53 é ativada, permitindo o reparo de danos ocorridos na replicação do DNA e mantendo a integridade genômica (NIAZI et al.,2012). Por outro lado, TPP1, uma proteína telômerica, faz parte do complexo de Shelterin, responsável por proteger o DNA do telômero através do bloqueio das vias de danos e reparos (XIN et al.,2007; PALM et al.,2008). A inativação de p53 faz com que células cancerígenas com telômeros curtos ignorem os pontos de verificação do ciclo celular (AKBAY et al.,2013).

As interações proteína-proteína possuem importantes funções em uma variedade de processos biológicos, como transdução de sinais, modificação pós-traducional respostas a estresses e defesa (ATHANASIO et al.2017). No processo de carcinogênese é evidenciado a importância da interação da proteína p53 com outras proteínas moduladoras da supressão do tumor (AKBAY et al.,2013). Assim, a avaliação da interação entre P53 e TPP1 e de possíveis mutações que afetam esta interação é relevante para a compreensão da função deste complexo na endometriose e os cânceres associados.

## MATERIAIS E METÓDOS

Todas as análises do trabalho foram realizadas puramente *in silico*, os ensaios realizados buscaram compreender a interação existente entre as duas proteínas de forma que futuramente permitam gerar mecanismos que contornem a doença quando a causa forem problemas na interação. Os estudos foram realizados na Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas.

Os modelos estruturais das proteínas foram obtidos no banco de dados de proteínas (PDB; <https://www.rcsb.org/>), com as seguintes identificações, 2I46 para a TPP1 de humanos e 1TSR para p53 também de humanos. O programa Pymol (<https://pymol.org>) foi utilizado para verificar as estruturas cristalizadas das moléculas, bem como para extrair a molécula de DNA que estava acoplada ao arquivo da p53.

Para análise da interface de interação foi utilizado o servidor ClusPro, assim é possível verificar quais domínios e quais resíduos de aminoácidos estão interagindo, o Pymol foi então utilizado para visualizar tal resultado (KOZAKOV et al., 2017). A partir da observação dos

resíduos que estavam interagindo, manualmente verificamos os hot spots, após o servidor KFC2 (Knowledge-based FADE and Contacts) realizou a busca automatizada para os hot spots, para que fosse possível a confirmação dos mesmos encontrados anteriormente de forma manual.

A partir da lista de polimorfismos encontrada no dbSNP (base de dados do polimorfismo de nucleotídeo único; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), verificamos o resíduo polimórfico do hot spot na p53 e mutamos de leucina na posição 127 para uma arginina. Posteriormente todos os procedimentos de docagem foram novamente realizados e a interface de interação foi novamente analisada para verificarmos se houve alteração na mesma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A p53 tem um papel muito importante na supressão tumoral e no reparo de danos ao DNA. Trata-se de uma proteína humana formada por cerca de 393 aminoácidos, seu peso molecular é de aproximadamente 53 kDa ((MAY et al.,1999). Podemos identificar que a proteína se dobra de forma que gera um homotetrâmero possuindo três domínios distintos, um primeiro de transativação, um segundo domínio central responsável pela ligação ao DNA e o último domínio é o responsável pela oligomerização, evento determinante para a montagem dos tetrâmeros (FIGURA 1) (MILNER, 1995).

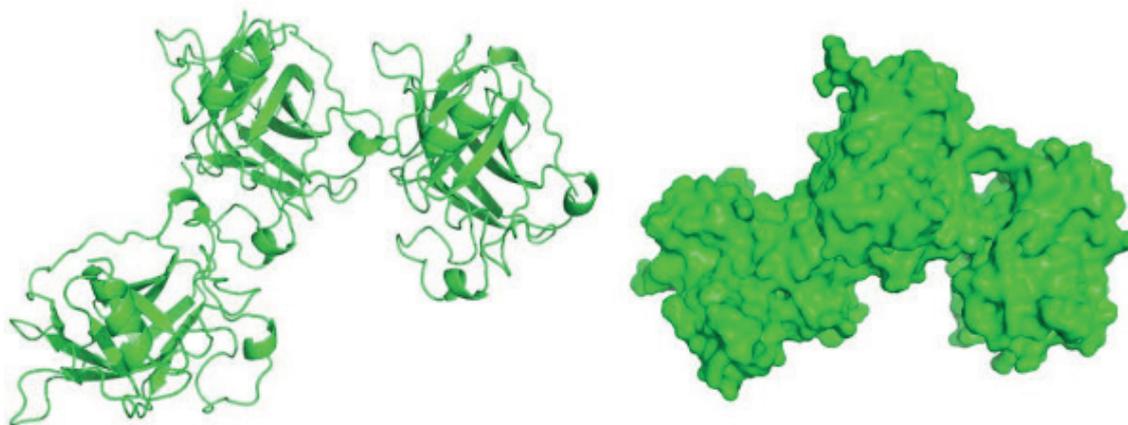


FIGURA 1: Estrutura tridimensional da P53 demonstrada de maneiras diferentes.

Ao avaliarmos a estrutura tridimensional da TPP1 foi observado uma molécula formada por duas cadeias (FIGURA 2), apresentando forma de bobina estendida com quatro alfa hélices no entorno da proteína (RICE et al., 2017). Na sua parte N- terminal a proteína apresenta um domínio OB (do inglês oligossaccharide-binding) que é denominado porção TEL, responsável pela ativação da telomerase (NANDAKUMAR et al., 2012; ZHONG et al.,2012).



FIGURA 2: Estrutura tridimensional da TPP1 demonstrada de maneiras diferentes.

O resultado do docking pelo servidor Cluspro forneceu uma região de interação de cerca de 80 resíduos entre as proteínas, mostrando que realmente ambas podem interagir para evitar a proliferação de células com danos de DNA (Figura 3). Estudos já demonstraram que a interação dessas proteínas é de extrema importância na supressão de tumores, em um trabalho que se provocou o encurtamento dos telômeros em camundongos foi possível verificar o surgimento de tumores na deficiência de p53 (ARTANDI et al.,2000).

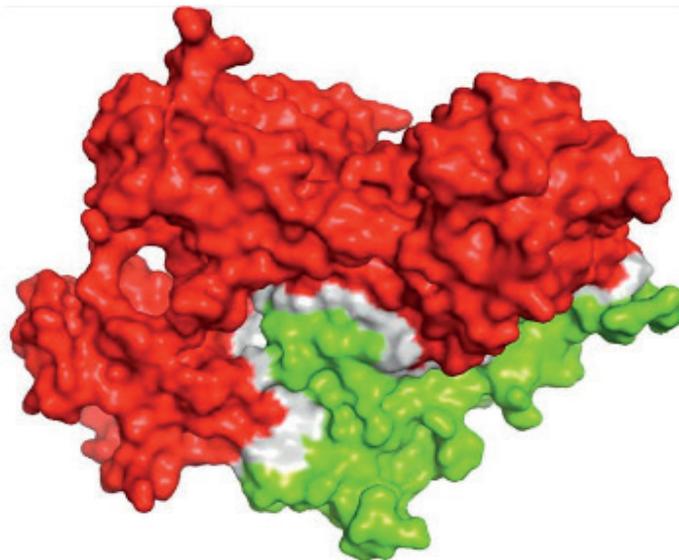


FIGURA 3: Interface de interação entre as proteínas p53 e TPP1. P53 em verde, TPP1 em vermelho e em cinza a região de interação entre elas.

As mutações na p53 são causas de muitos tipos de câncer, tais mutações em hotspots representam alterações na proteína que levam a uma vantagem no crescimento das células defeituosas (WALKER et al.,199), que geram a formação de tumores, por esse motivo mutamos um resíduo que fazia parte de um hotspots que interagira com a TPP1, uma leucina na posição 127, que foi alterada para uma arginina. A alteração levou a uma mudança na conformidade da p53 alterando a interface de interação dela com a TPP1, resultando em falhas nessa região (Figura 4).

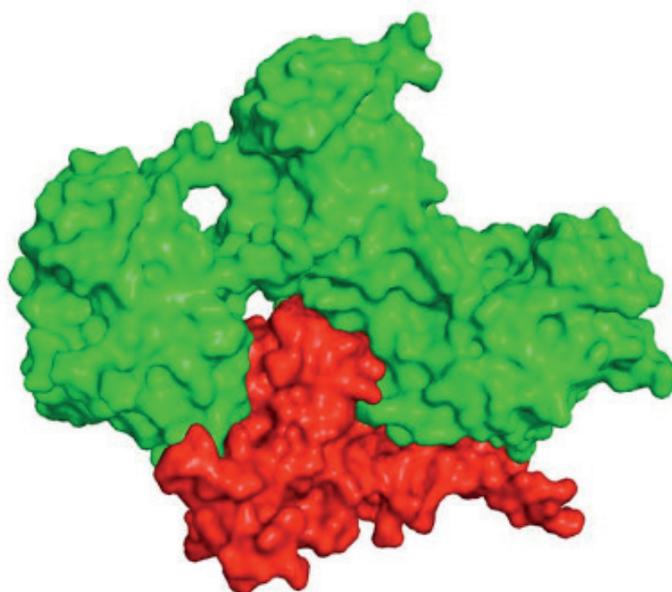


FIGURA 4: A interface de interação foi alterada após a mutação da p53.

A TPP1 é responsável pela replicação das extremidades dos telômeros em momentos de divisão, problemas durante esse processo devem ser corrigidos, e a responsável por essa correção no DNA é a p53, quando elas não interagem observamos defeitos proliferativos (TEJERA et al.,2010). Outra questão é que durante os processos do ciclo celular os telômeros podem sofrer encurtamento, deixando o DNA exposto para possíveis alterações durante a divisão, dessa forma a telomerase TPP1 não conseguiria funcionar de forma satisfatória, necessitando do auxílio da p53, que caso esteja ausente pode acarretar na indução de tumores (ELSE et al.,2009; ROAKE et al.,2017).

## CONCLUSÃO

Assim é possível concluir que a interação entre as proteínas é necessária para que ocorra a supressão do aumento tecidual, que pode aumentar a predisposição à doença. Em casos de suspeita da doença, uma avaliação dessas proteínas deve ser realizada, a fim de buscar um possível tratamento baseado nas mesmas.

## REFERÊNCIAS

AKBAY, E. A. et al. Cooperation between p53 and the telomere-protecting shelterin component Pot1a in endometrial carcinogenesis. **Oncogene**, v. 32, n. 17, p. 2211-2219, 2013.

ARTANDI, Steven E. et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. **Nature**, v. 406, n. 6796, p. 641-645, 2000.

ATHANASIOS, Alexiou et al. Protein-protein interaction (PPI) network: recent advances in drug discovery. **Current drug metabolism**, v. 18, n. 1, p. 5-10, 2017.

BISCHOFF, Farideh Z.; HEARD, Michael; SIMPSON, Joe Leigh. Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis. **Journal of reproductive immunology**, v. 55, n. 1-2, p. 49-64, 2002.

DE LA CUESTA, Ricardo Sáinz et al. Increased prevalence of p53 overexpression from typical endometriosis to atypical endometriosis and ovarian cancer associated with endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 113, n. 1, p. 87-93, 2004.

CZYZYK, Adam et al. Atualização na patogênese da endometriose. **Minerva ginecologica**, v. 69, n. 5, p. 447-461, 2017.

DAWSON, Amy et al. Endometriosis and endometriosis-associated cancers: new insights into the molecular mechanisms of ovarian cancer development. **ecancermedicalscience**, v. 12, 2018.

ELSE, Tobias et al. Genetic p53 deficiency partially rescues the adrenocortical dysplasia phenotype at the expense of increased tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 15, n. 6, p. 465-476, 2009.

FUSEYA, Chiho et al. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. **Human pathology**, v. 43, n. 11, p. 1964-1972, 2012.

MAFRA, Fernanda et al. Copy number variation analysis reveals additional variants contributing to endometriosis development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, n. 1, p. 117-124, 2017.

MAY, Pierre; MAY, Evelyne. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7621-7636, 1999.

MILNER, Jo. Flexibility: the key to p53 function?. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 2, p. 49-51, 1995.

NANDAKUMAR, Jayakrishnan et al. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 285-289, 2012.

NIAZI, Sarfaraj; PUROHIT, Madhusudan; NIAZI, Javed H. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: a brief review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 158, p. 7-24, 2018.

PALM, Wilhelm; DE LANGE, Titia. Como shelterin protege telômeros de mamíferos. **Revisão anual de genética**, v. 42, p. 301-334, 2008.

RICE, Cory et al. Structural and functional analysis of the human POT1-TPP1 telomeric complex. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.

ROAKE, Caitlin M.; ARTANDI, Steven E. Controle do envelhecimento celular, função dos tecidos e câncer pela p53 a jusante dos telômeros. **Perspectivas de Cold Spring Harbor em medicina**, v. 7, n. 5, p. a026088, 2017.

SAMPSON, John A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. **The American journal of pathology**, v. 3, n. 2, p. 93, 1927.

SHAY, Jerry W.; PEREIRA-SMITH, Olivia M.; WRIGHT, Woodring E. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. **Experimental cell research**, v. 196, n. 1, p. 33-39, 1991.

TEJERA, Agueda M. et al. TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. **Developmental cell**, v. 18, n. 5, p. 775-789, 2010.

WALKER, D. Roland et al. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation

with p53 protein structural and functional features. **Oncogene**, v. 18, n. 1, p. 211-218, 1999.

WEI, Jian-Jun; WILLIAM, Josette; BULUN, Serdar. Endometriosis and ovarian cancer: a review of clinical, pathologic, and molecular aspects. **International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, v. 30, n. 6, p. 553, 2011.

XIN, Huawei et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- $\beta$  and interacts with POT1 to recruit telomerase. **nature**, v. 445, n. 7127, p. 559-562, 2007.

ZHONG, Franklin L. et al. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 481-494, 2012.

## OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS SEMELHANTES ÀS BACTERIOCINAS POR *Lactococcus lactis* UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICROORGANISMO CAUSADOR DE CÁRIE

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### Liz Caroline Mendes Alves

Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da  
Universidade de São Paulo (USP)  
São Paulo, SP

<http://lattes.cnpq.br/2448303617644576>

### Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Departamento de Tecnologia Bioquímico-  
Farmacêutico (FBT), Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São  
Paulo (USP)  
São Paulo, SP

<http://lattes.cnpq.br/9356367360155337>

**RESUMO:** A cárie dentária, uma doença bucal ligada a formação de biofilmes, se desenvolve quando o equilíbrio microbiano no ambiente bucal é perturbado. A doença é caracterizada pela dissolução do fosfato de cálcio que compõe as camadas superficiais do esmalte dentário, como consequência de longos períodos de baixo pH na cavidade oral. Essa acidez é proveniente da metabolização de carboidratos fermentáveis (sacarose p. ex.) por microrganismos, especialmente *Streptococcus mutans*, uma das espécies mais estudadas relacionadas à doença. Pelo fato de a doença apresentar alta prevalência (cerca de 80%-90% na população mundial), métodos alternativos de

prevenção da cárie vem sendo estudados, entre eles a utilização de microrganismos probióticos. Bactérias probióticas têm a capacidade produzir substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substance) que possuem efeito bacteriostático ou bactericida em diferentes grupos de bactérias, uma vez que estes peptídeos podem atuar na síntese de parede celular e proteica, replicação ou até mesmo na formação de poros na membrana plasmática da célula alvo. A cepa de *Lactococcus lactis* CECT-4434 foi capaz de produzir substâncias inibitórias semelhantes à bacteriocinas, as BLIS, quando cultivadas em meio de cultura contendo um resíduo de um processo agroindustrial, o bagaço de cana de açúcar. Os sobrenadantes livres de células apresentaram atividade antimicrobiana quando testadas contra a principal bactéria causadora da cárie *Streptococcus mutans* UA159.

**PALAVRAS-CHAVE:** BLIS; Bacteriocina; Cárie dentária; Probiótico; Bagaço de cana-de açúcar.

OBTAINING BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES BY *Lactococcus lactis* USING SUGARCANE BAGASSE: EFFECT OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST CARIE CAUSING MICROORGANISM

**ABSTRACT:** Dental caries, an oral disease linked to the formation of biofilms, develops

when the microbial balance in the oral environment is disturbed. The disease is characterized by the dissolution of calcium phosphate that makes up the superficial layers of tooth enamel, as a consequence of long periods of low pH in the oral cavity. This acidity comes from the metabolization of fermentable carbohydrates (sucrose, for example) by microorganisms, especially *Streptococcus mutans*, one of the most studied species related to the disease. Since the disease has a high prevalence (around 80%-90% in the world population), alternative methods of preventing caries have been studied, including the use of probiotic microorganisms. Probiotic bacteria have the capacity to produce inhibitory substances similar to bacteriocins (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substance) that have a bacteriostatic or bactericidal effect on different groups of bacteria, since these peptides can act in the synthesis of cell and protein walls, replication or even even in the formation of pores in the plasma membrane of the target cell. The strain *Lactococcus lactis* CECT-4434 was able to produce inhibitory substances similar to bacteriocins, the BLIS, when grown in a culture medium containing a residue from an agro-industrial process, sugar cane bagasse. Cell-free supernatants showed antimicrobial activity when tested against the main bacteria causing caries *Streptococcus mutans* UA159.

**KEYWORDS:** BLIS; Bacteriocin; Dental caries; Probiotics; Sugar cane bagasse.

## 1 | INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das doenças mais prevalentes (aproximadamente 50%) em crianças ao redor do mundo (Mathur, V.P. et al., 2018), tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos (Nobile, C.G.A. et al., 2014). O processo patológico ocorre na superfície dos dentes por meses ou até anos (Bowen, W.H., 2015), e é mediado pela formação de biofilmes (Krzyściak, W. et al., 2013). Biofilmes são aglomerados bacterianos formados sob substâncias extracelulares mucilaginosas. Estes grupamentos, protegidos por uma matriz de exopolissacarídeos, permite a formação de estruturas tridimensionais que protegem as células que os compõem, tornando-as mais resistentes contra antibióticos e mudanças que ocorram no ambiente.

Um dos principais fatores etiológicos da doença é a presença da bactéria *Streptococcus mutans* (Krzyściak, W. et al., 2013). Considerada uma das principais bactérias cariogênicas, *S. mutans* é capaz de produzir glicosettransferases (Gtfs) responsáveis pela síntese de polissacarídeos extracelulares (EPSs). Os EPSs, especialmente glucanos insolúveis em água, contribuem para a formação da placa dentária, estabilidade dos biofilmes e integridade estrutural por permitir a aderência das bactérias à superfície dos dentes e fornecendo a elas proteção contra estímulos nocivos e ataques ambientais (Chen, L. et al., 2016).

A alimentação tem profunda influência no desenvolvimento da cárie dentária. As dietas atuais apresentam uma quantidade crescente de carboidratos fermentáveis, incluindo alimentos com alto teor de amido e com novos carboidratos sintéticos, como sucralose, oligofrutose e outros polímeros de glicose (Gupta, P. et al., 2013). *S. mutans* quebra estes açúcares em ácido lático, o qual leva à desmineralização, ou perda do fosfato de cálcio, das estruturas dentárias. Como resultado, os dentes se tornam “amolecidos” e eventualmente

colapsam sobre si mesmos, formando a cavidade (Heng, C., 2016).

A prevenção da cárie dentária e de doenças periodontais é tradicionalmente direcionada ao controle inespecífico ou mecânico da placa dentária, uma vez que ela é o fator precipitante. Esta abordagem deve preferencialmente diminuir a formação de biofilmes orais sem afetar o equilíbrio da cavidade oral, que é habitada por aproximadamente 1000 espécies diferentes de bactérias, com 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> bactérias por mL de saliva ou mg de placa bacteriana (Allaker, R. et al., 2015). Porém, o uso constante de drogas antimicrobianas pode levar à efeitos colaterais no trato gastrointestinal, devido à antibióticos de amplo espectro, resistência bacteriana e reações alérgicas (Seminario-Amez, M. et al., 2017; Laleman, I. et al., 2015). Tendo em vista o desenvolvimento de métodos terapêuticos alternativos para o tratamento e prevenção de doenças comuns na cavidade bucal, começou a ser estudado na Odontologia o uso de micro-organismos probióticos (Caufield et al., 2015; Palombo, E.A., 2011). Os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade bucal ainda não são muito bem definidos, mas estão associados com a redução no número de UFCs (unidades formadoras de colônia) de patógenos cariogênicos (Seminario-Amez, M. et al., 2017).

Probióticos, por definição, são microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, fornecem benefícios à saúde do hospedeiro (Allaker, R. et al., 2017). São reconhecidos por executar várias ações no sistema digestivo como prevenir a adesão celular e a invasão de bactérias patogênicas, modificar o ambiente intestinal e modular respostas imunes inflamatórias locais e sistêmicas (Floch MH. et al., 2011). No entanto, pesquisas realizadas nos últimos anos (Lin, X. et al., 2017; Cagetti, MG. et al., 2013; Saha, S. et al., 2012) têm relatado o uso de linhagens probióticas na prevenção de doenças orais, incluindo a cárie. Como bactérias probióticas podem produzir diferentes compostos antibacterianos, melhorar a ecologia microbiana oral e raramente causar infecções em humanos, esse organismos representam uma maneira segura e promissora de controlar a cárie (Lin, X. et al., 2017).

As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem o principal grupo de microrganismos utilizados como probióticos (Rao, Y. et al., 2012). Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998). A fim de se prevenir a cárie dentária, probióticos devem aderir à superfície dentária e causar efeitos antagônicos às espécies cariogênicas, como *S. mutans*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (LYE, H. S. et al., 2016). Estudos realizados por Nase et al. (2001) demonstraram uma diminuição significativa na cárie dentária e a redução das contagens salivares de *S. mutans* em pacientes após o consumo de produtos lácteos contendo *L. rhamnosus* por sete meses. Além disso, um estudo feito por Haukioja et al. (2008) também revelou que lactobacilos e bifidobactérias foram capazes de modificar a composição protéica da película salivar e, assim, prevenir especificamente a aderência de *S. mutans*.

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos produzidos pelos ribossomos de certas linhagens de bactérias, e que podem matar (efeito bacteriocida) ou inibir (efeito bacteriostático) o crescimento de bactérias relacionadas ou não à bactéria produtora, a qual

não sofrerá danos devido a proteínas de imunidade específicas (Yang et al., 2014). Assim como os antibióticos, as bacteriocinas são classificadas como metabólitos secundários, ou seja, não estão diretamente envolvidos no crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução das bactérias que os produzem. Considerando a atividade antimicrobiana das bacteriocinas, alguns pesquisadores especulam classificá-las sob a mesma dos antibióticos; mas como bacteriocinas são peptídeos bactericidas e antibióticos são produzidos por complexos multi-enzimáticos, permanece esta demarcação entre os dois agentes antimicrobianos (Ramu, R. et al., 2017).

As bacteriocinas agem sobre bactérias gram-positivas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*, bactérias patogênicas e que estão relacionadas a deterioração de alimentos (Hernández et al., 2005). Usualmente, bactérias gram-negativas são naturalmente resistentes às bacteriocinas devido à presença da membrana externa, que age como uma barreira efetiva (Cao-Hoang et al., 2008; Gyawali et al., 2014). No entanto, existem agentes químicos e tratamentos que desestabilizam esta membrana externa, permitindo que as bacteriocinas afetem as bactérias gram-negativas (Gálvez et al., 2014; Chalón et al., 2012; Marttinen, A. et al., 2011). Demonstrou-se que o uso de agentes quelantes e hipoclorito de sódio, por exemplo, são importantes na sensibilização de inúmeras bactérias gram-negativas, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *Arcobacter butzleri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Yersinia enterocolitica* (Prudêncio, C.V. et al., 2015).

Segundo Klaenhammer (1993), quatro classes diferentes de bacteriocinas foram identificadas com base na caracterização bioquímica e genética. A classe I é a dos lantibióticos, como a nisina, pequenos peptídeos com peso molecular inferior a 5kDa e que contêm o aminoácido não usual lantionina e  $\beta$ -metil lantionina; a classe II é formada por peptídeos termoestáveis (< 10kDa) divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III é composta por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (> 30kDa), como helveticina V-1829; o grupo IV é formado por bacteriocinas complexas, compostas por peptídeos associados a lipídeos e carboidratos, que são essenciais para a atividade da bacteriocina, como a lactocina 27. A maioria destas bacteriocinas atuam interagindo com os lipídios aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias gram-positivas, permeabilizando-a por meio da formação de poros, os quais promovem a dissipação da força próton motora (PMF) e a inibição do transporte de aminoácidos (Zacharof, M. et al., 2012; Guilhelmelli, F. et al., 2013; Cotter et al., 2013).

Muitas bactérias ácido-láticas (BALs) produzem bacteriocinas com grande espectro de ação, e essas moléculas apresentam diferentes mecanismos de ação. A maioria das bacteriocinas produzidas por BALs, em particular as que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas, exercem seu efeito antimicrobiano interferindo na estrutura do envelope celular (Cotter et al., 2013). Nisina tem como alvo o lipídio II, um intermediário na maquinaria da biossíntese dos peptidoglicanos que compõem o envelope celular, inibindo desse modo a síntese destes peptidoglicanos (Héchar, Y. et al., 2002; Breukink, E. et al., 2006). A

maioria das bacteriocinas da classe II dissipam a força motriz dos prótons na célula alvo, via formação de poros (Héchar, Y. et al., 2002); outras matam ou danificam a célula alvo via ligação ao sistema manose-6-fosforotransferase (Man-PTS) associado ao envelope celular, e subsequente formação de poros na membrana celular (Cotter et al., 2013). Ainda há aquelas que inibem a expressão gênica (Parks, W. et al., 2007; Vincent and Morero, 2009) e a síntese de proteínas (Metlitskaya, A. et al., 2006) nas células alvo.

Nos processos agroindustriais são gerados subprodutos ou resíduos que quando não são convenientemente reciclados ou processados, podem causar diversos problemas ao meio ambiente. Segundo Heath et al. (1958) muitas bactérias lácticas, como *L. lactis*, podem metabolizar as pentoses pela via fosfocetolase induzida. É nesse contexto que o projeto se torna importante, pois utiliza um resíduo agroindustrial (bagaço de cana-de-açúcar) rico em pentoses (xilo-oligossacarídeos) para produzir biomoléculas de alto valor agregado, como no caso de substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substance). Ademais, a proposta abre um caminho para identificação de uma futura bacteriocina que poderá dificultar a instalação do processo de cárie, contribuindo assim, para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle do biofilme bucal e para a promoção da saúde na cavidade oral.

## 2 | OBJETIVO

O objetivo do presente projeto é de verificar o efeito da produção de BLIS por *Lactococcus lactis* CECT-4434 utilizando o resíduo da indústria sucro-alcooleira (bagaço de cana).

## 3 | METODOLOGIA

### 3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

Neste trabalho foi utilizada a bactéria probiótica *Lactococcus lactis* CECT-4434 para a produção de substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substance).

A linhagem bioindicadora causadora da cárie utilizada foi a bactéria *Streptococcus mutans* UA159. Além disso, a linhagem da bactéria *Listeria innocua* 2711 foi empregada como padrão na verificação da ação das BLIS.

### 3.2 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo Man Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) apresenta a seguinte composição, em mg/L: 10,0 de peptona, 10,0 de extrato de carne, 5,0 de extrato de levedura, 20,0 de glicose, 1,0 tween 80, 2,0 de citrato de amônio, 5,0 de acetato de sódio, 10,0 de sulfato de magnésio, 0,05 de sulfato de manganês e 2,0 de fosfato de potássio.

O meio de cultivo lapt G apresenta a seguinte composição, expressa em mg/L: expresso em g/L: 15,0 de peptona, 10,0 de extrato de levedura, 10,0 de triptona e 1 mL de tween 80.

O meio de cultivo TSB (Difco) apresenta a seguinte composição, expressa em g/L: 17,0 de triptona, 3,0 de extrato de soja, 2,5 de glicose, 5,0 de cloreto de soja, 2,5 g de fosfato de dipotássio.

Como meio de cultivo alternativo, será utilizado o bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com alto conteúdo do prebiótico XOS na produtividade de BLIS em células de *L. lactis* CECT-4434. O licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar será obtido da seguinte forma: o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar consistirá em suspender uma quantidade de bagaço (10% w/w, base seca) em água e carregá-lo em um reator de escala laboratorial (7,5 L de volume total, Modelo 4554, Parr, EUA). A temperatura será aumentada desde a temperatura ambiente (25 °C) até 190 °C, durante um período de 1 h. Após 10 min, o reator foi resfriado à temperatura ambiente e o licor rico em pentoses será coletado com a ajuda de um filtro de tela em escala laboratorial (filtro Nutsche, POPE Scientific, EUA). A composição do licor hidrotérmico será caracterizada por hidrólise ácida com ácido sulfúrico e análise por HPLC (Dionex Ultimate 3000, equipado com coluna Aminex HPX-87 H 300 mm x 7,8 mm x 9 mm, a 50 °C, vazão de 0,5 mL/min, fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M, detector Shodex IR a 40 °C, volume de injeção de 50 mL) (Robl et al. 2013).

### 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de *Lactococcus lactis* CECT 4434 foi cultivada em meio MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), por 24 horas a 37°C. Em seguida o meio foi centrifugado a 4470 g, a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com solução salina 0,75%, esse processo de lavagem foi repetido duas vezes. E em seguida, a cepa foi cultivada em lapt G em concentrações de 0%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25% de licor de bagaço de cana de açúcar.

A cepa bioindicadora (*S. mutans* UA159), previamente criopreservada a -70°C na presença de 20% de glicerol (v/v) foi reativada em 5,0 mL de meio de cultura específico por 16 h a 37°C sem agitação e, para verificação da pureza da cultura, o cultivo foi resfriado em TSB ágar 2%, com incubação overnight a 37°C.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE BLIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a extração das substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS), amostras dos cultivos sofreram redução no pH para 2 através da adição de HCl 1,0M, uma vez que o valor do pH afeta a liberação da bacteriocina na célula produtora (Yang et al., 1992). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos, a 4,470 g. Para exclusão da possibilidade de inativação das BLIS por meio da produção de ácidos orgânicos, pH do sobrenadante livre de células foi ajustado para pH 6,0-6,5 através da adição de NaOH 1,0M, em seguida aquecido em banho-maria a 80°C por 10 minutos para facilitar a extração e garantir a inativação de proteases presentes no meio (Cabo, M.L. et al., 1999). A capacidade

antimicrobiana dos sobrenadantes desta etapa foi testada contra o bioindicador *S. mutans* UA159.

A quantidade de BLIS liberada na primeira extração foi quantificada e expressa em unidades arbitrárias (AU) por mL, utilizando-se o método de diluição crítica de Mayr-Harting et al (1972). O sobrenadante foi serialmente diluído na proporção de 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:12, 1:16 e 1:18, em tampão fosfato 25mM pH 7,0. A seguir, 10 $\mu$ L de cada diluição foi colocada sobre placas com ágar 0.75% contendo a cepa indicadora (~10<sup>6</sup> UFC) e incubada a 37°C por 24 horas. A primeira diluição em que não houve zona de inibição formada foi considerada e, utilizando a expressão matemática:

$$Au = \frac{D^n \cdot 1000}{P}$$

Onde (D) representa o fator de diluição, (n) a primeira diluição não apresentando zona de inibição e (P) o volume de sobrenadante colocado sobre o ágar. Os resultados foram expressos em AU/mL.

As placas de Petri contendo a cepa indicadora de *Listeria innocua* 2711 foram preparadas a partir de cultivos ativos em fase estacionária de crescimento. Estes foram inoculados a 5% em TSG ágar 0,7 e, após suave homogeneização, foram despejados em placas de Petri estéreis. Após solidificação do ágar a temperatura ambiente, as placas foram utilizadas para os testes.

### 3.5 ANTIMICROBIANO DE *S. mutans* UA159 CONTRA SOBRENADANTES COM BLIS

A atividade antimicrobiana de BLIS foi avaliada frente a bactéria bioindicadora como descrito por Najjar et al. (2009) e exposto no item 3.4. Para isto, células de *S. mutans* foram crescidas em TSB líquido durante 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, o cultivo celular foi diluído 100 vezes (~10<sup>6</sup> UFC/mL) em meio TSB com concentração dobrada e adicionados em placas de 96 poços (100  $\mu$ L por poço). O controle negativo foi feito utilizando-se solução fosfato 25mM pH 7,0 no volume de 100  $\mu$ L. As placas foram incubadas por 24h a 30 °C, sendo agitadas a cada 30 minutos. A densidade ótica (630 nm) foi medida em leitor de microplaca Synergy™ HTX (Biotek, Shoreline, WA). Todos os pontos foram realizados em triplicata.

Uma vez que a atividade antimicrobiana está relacionada à concentração de BLIS em solução, foi feito o cálculo desta concentração de acordo com a definição de unidade de bacteriocina (BU) (Cabo, M.L. et al., 1999): é a quantidade de princípio ativo presente, por unidade de volume, em uma amostra capaz de produzir uma inibição de I=0.5, sob determinadas condições experimentais.

### 3.6 ESTABILIDADE DAS BLIS

Para confirmar a natureza proteica das BLIS, o sobrenadante livre de células foi tratado com 1 mg/mL de pepsina, tripsina e papaína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) durante 2 horas a 30°C. Caso o halo de inibição desapareça, o pressuposto pode ser confirmado. Para esse teste foi utilizada a cepa indicadora de *Listeria innocua* 2711.

A estabilidade das BLIS foi avaliada frente a detergentes (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 e SDS), solventes orgânicos (acetonitrila e isopropanol), etanol e os sais cloreto de sódio e sulfato de amônio na concentração final de 2%. As amostras contendo BLIS foram incubadas durante 1 hora a 35,7°C, sob agitação de 74 g, e a atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo com a técnica de *spot-on-lawn*.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BLIS

Inicialmente, bactérias da cepa de *Lactococcus lactis* CECT 4434 (produtoras de substâncias inibitórias semelhantes à bacteriocinas) foram cultivadas em MRS, seguindo-se então para o cultivo das mesmas em meio lact G contendo seis diferentes concentrações do licor de bagaço de cana de açúcar. O sobrenadante livre das células foi testado quanto a sua ação antimicrobiana contra o bioindicador *Listeria innocua* 2711 e *S. mutans* UA159.

Para avaliação da atividade antimicrobiana das BLIS foi utilizada a técnica de diluição crítica de Mayr-Harting et al.: o sobrenadante foi serialmente diluído na razão de 1:2 (v/v) em microtubos de centrifugação, utilizando-se solução-tampão fosfato 25mM pH 7. Em seguida, alíquotas de 10µL foram depositadas em placas de Petri contendo a cultura indicadora de *Listeria innocua* 2711. Após o período de incubação de 24 horas a 37°C, a primeira diluição que não apresentou zona de inibição considerada, que no caso foi a diluição de número 4. Considerando-se que o fator de diluição (D) foi igual a 2 (ou seja, proporção de 1:2 entre sobrenadante e tampão fosfato, respectivamente) e que o volume do sobrenadante colocado sobre o ágar (P) foi de 5 mL, a quantidade de BLIS liberada na primeira extração, em unidades arbitrárias por mL (AU/mL) foi de:

$$Au = D^n \cdot 1000 / P$$

$$Au = 2^4 \cdot 1000 / 5$$

$$Au = 3200$$

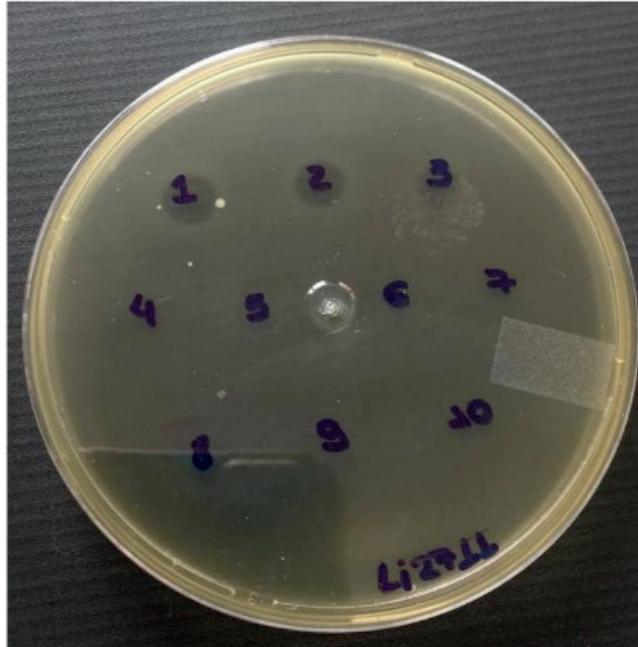


Imagem 1: placa de meio MRS com a cepa indicadora *Listeria innocua* 2711, com os halos de inibição revelando a atividade antimicrobiana da BLIS.

#### 4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DE *S. mutans* UA159

Neste experimento, os procedimentos foram preparados conforme descrito no item 3.5. Os parâmetros da curva de crescimento foram obtidos através do método de microplacas, que apresenta uma maior sensibilidade em relação à técnica de Dose resposta. A densidade óptica foi medida à 600nm.

As fases de latência, exponencial e estacionária foram observadas para cada sobrenadante livre de células contendo BLIS. O controle do teste foi realizado com o cultivo de *S. mutans* UA159 sem o sobrenadante das produtoras de BLIS e utilizado como referência na comparação com as fases que compõe o crescimento bacteriano. O controle apresentou um intervalo de aproximadamente 7 horas entre a fase de latência e o início da fase exponencial, além de a fase estacionária ter se iniciado após 12 horas do início da medição, com 0,534 de densidade óptica.

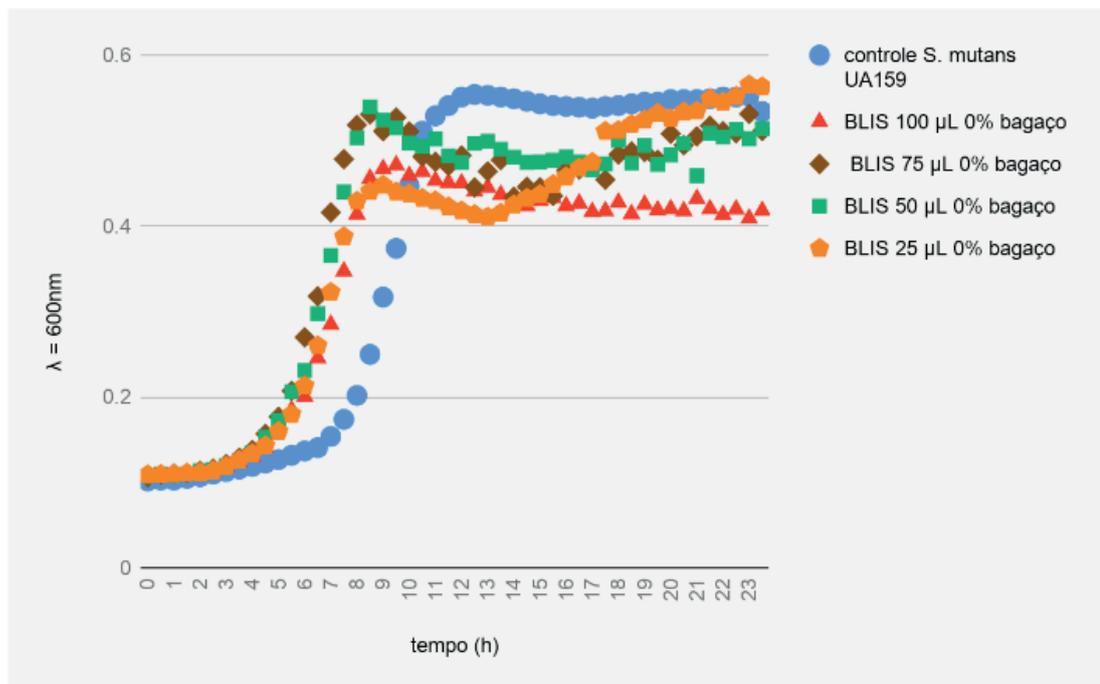


Figura 1: Crescimento de *S. mutans* UA159 em diferentes concentrações de BLIS, obtido na ausência do bagaço de cana de açúcar.

Na figura 1 observa-se que, em todos os volumes analisados, o sobrenadante livre de células de *L. lactis* CECT-4434 foi capaz de retardar o início da fase exponencial do crescimento bacteriano de *S. mutans* UA159. O intervalo entre a fase de latência e a fase exponencial passou de 7 horas (observado no controle) para 5 horas. O crescimento bacteriano foi mais afetado na presença de 100µL de sobrenadante em BLIS, apresentando uma densidade ótica final de 0,418. Os volumes de 75µL, 50µL e 25µL de BLIS apresentaram as seguintes densidades óticas, respectivamente: 0,531, 0,513 e 0,563.

Nota-se também que, na presença de 25µL de sobrenadante, o crescimento bacteriano apresentou uma leve queda 13 horas após o início da leitura, porém o crescimento foi retomado até que a fase de latência fosse atingida.

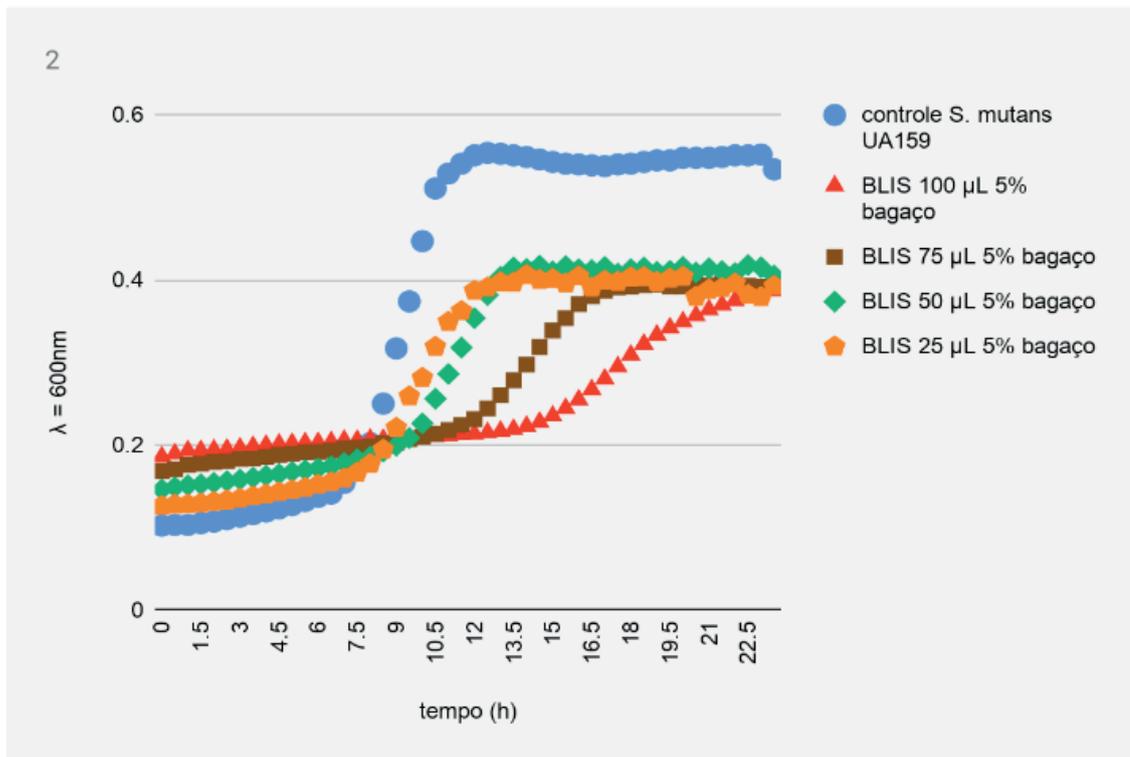


Figura 2: Crescimento de *S. mutans* UA159 em diferentes concentrações de BLIS, obtido na presença de 5% em volume de bagaço de cana de açúcar.

A figura 2 evidencia os resultados obtidos no experimento realizado com *L. lactis* CECT-4434 cultivada em meio contendo 5% (em volume) do licor de bagaço de cana de açúcar. Nota-se que os volumes de 25µL e 50µL de sobrenadante apresentaram início da fase exponencial semelhantes, aproximadamente 8 horas após o início da leitura. Neste caso, assim como relatado na figura 2, o crescimento bacteriano se tornou mais lento, e as densidades ópticas finais foram, respectivamente, 0,393 e 0,4053. Já os volumes de 75µL e 100µL de sobrenadante foram os que apresentaram uma maior retardação no princípio da fase exponencial, sendo que o segundo volume foi o que causou um maior impacto, apresentando 0,387 de densidade óptica ao final da medição, em comparação com 0,394 do volume de 75µL.

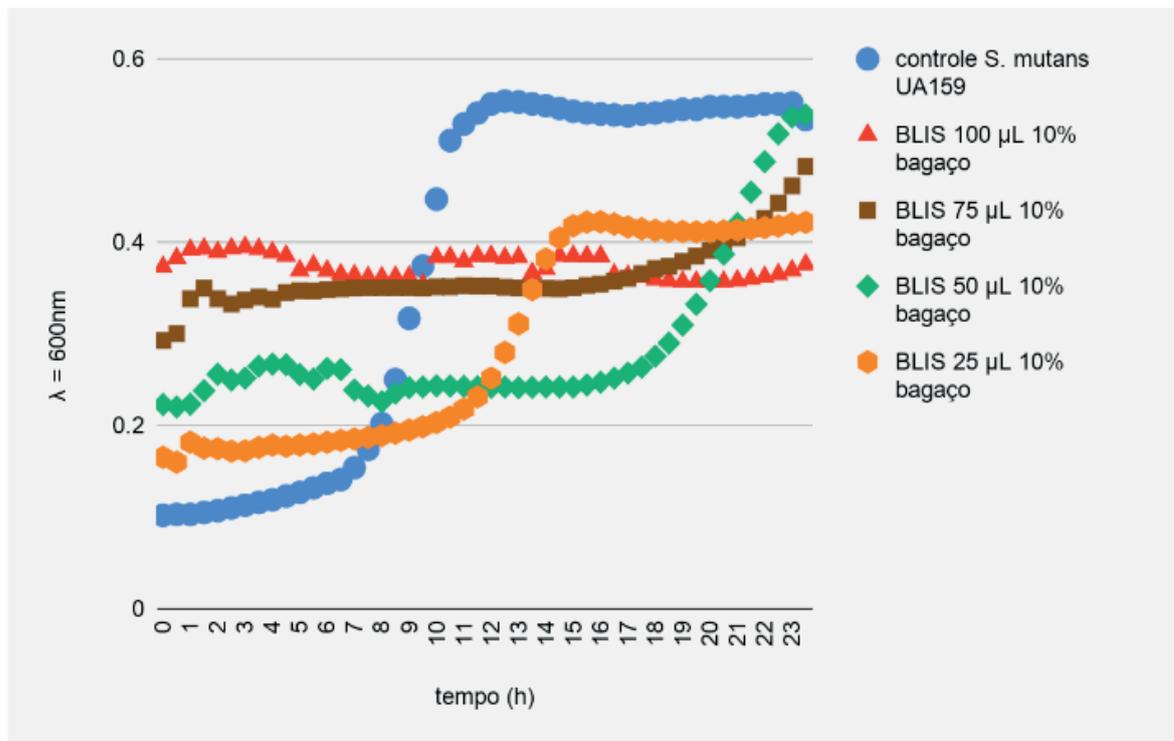


Figura 3: Crescimento de *S. mutans* UA159 em diferentes concentrações de BLIS, obtido na presença de 10% em volume de bagaço de cana de açúcar.

A figura 3 expõe os resultados da atividade antimicrobiana das BLIS de *Lactococcus lactis* CECT-4434 cultivada em meio de cultura contendo 10% (em volume) de licor de bagaço de cana de açúcar. O menor volume de sobrenadante utilizado ( $25\mu\text{L}$ ) teve o início da fase exponencial atrasado em 5 horas em relação ao controle de *S. mutans* UA159 sem o sobrenadante, com densidade óptica final de 0,422. Por outro lado, os volumes de  $50\mu\text{L}$  e  $75\mu\text{L}$  apresentaram início de crescimento em, respectivamente, 19 e 22 horas, salientando o efeito bacteriostático (Yang et al. 2014) da BLIS nestes volumes. Em  $100\mu\text{L}$  de sobrenadante o crescimento bacteriano foi totalmente inibido.

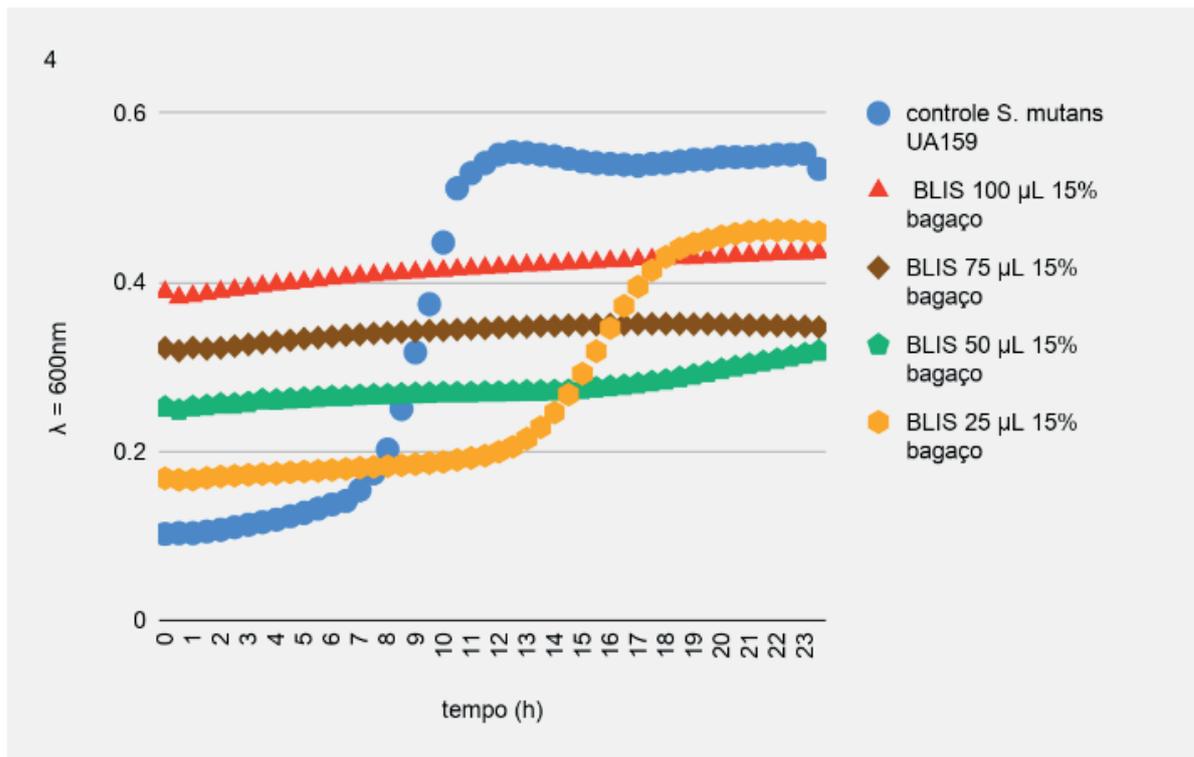


Figura 4: Crescimento de *S. mutans* UA159 em diferentes concentrações de BLIS, obtido na presença de 15% em volume de bagaço de cana de açúcar.

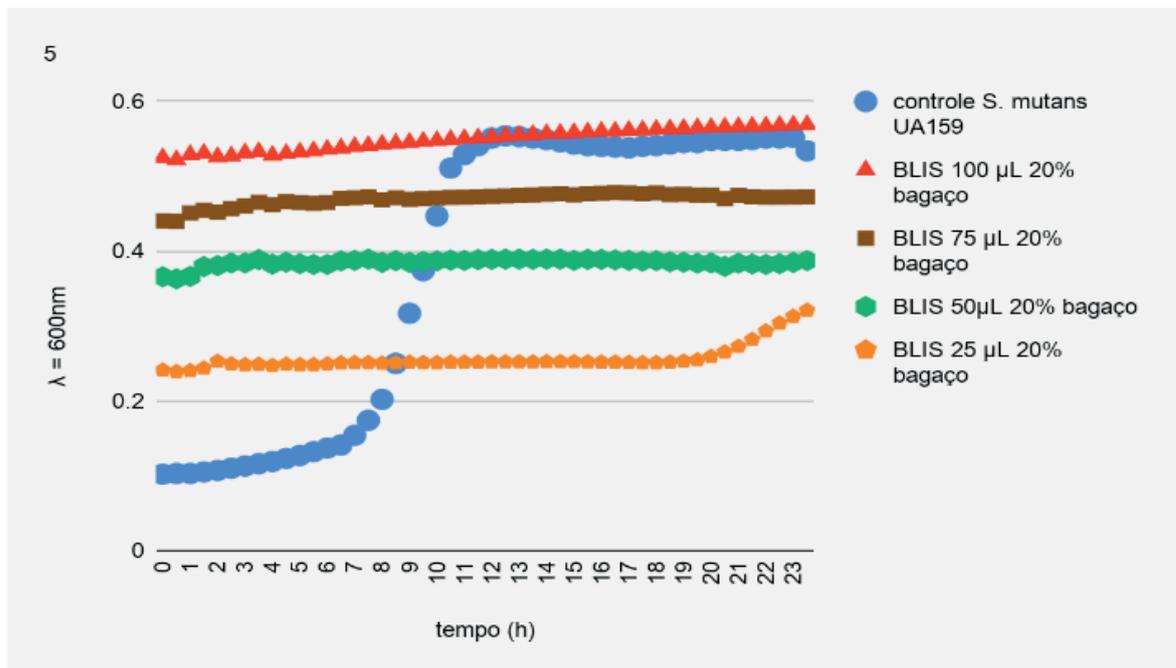


Figura 5: Crescimento de *S. mutans* UA159 em diferentes concentrações de BLIS, obtido na presença de 20% em volume de bagaço de cana de açúcar.

As figuras 4 e 5 apresentaram curvas de crescimento semelhantes, sendo que o sobrenadante obtido em meio com 20% (em volume) de bagaço de cana de açúcar apresentou maiores densidades ópticas finais para 100µL, 75µL e 50µL de BLIS (0,569, 0,473, 0,387 e 0,321, respectivamente) quando comparado aos mesmos volumes obtidos em meio com 15% (em volume) do bagaço (0,435, 0,347, 0,312, respectivamente). Nestes volumes, o

crescimento bacteriano foi totalmente inibido. Em 25µL de sobrenadante, porém, o BLIS obtido em 20% apresentou atividade antimicrobiana mais eficiente em comparação ao meio com 15% de bagaço, uma vez que o primeiro apresentou a fase exponencial 21 horas após o início da leitura, em comparação com as 15 horas do segundo.

### 4.3 ESTABILIDADE DAS BLIS

O sobrenadante que apresentou atividade antimicrobiana foi submetidos ao teste com as proteases pepsina, tripsina e papaína (item 3.6). Como não se observou a formação de halo de inibição, pôde-se concluir que houve a degradação das BLIS e sua natureza proteica foi confirmada.

	Pepsina	Tripsina	Papaína
<i>Lactococcus lactis</i> CECT-4434	+	+	+

(+) amostras que apresentaram resultado positivo para origem proteica.

Tabela 1: Teste de comprovação de origem proteica do composto antimicrobiano produzido contra *Listeria innocua* 2711.

Na tabela 2, a medida dos halos de inibição gerados pelos sais, solventes e detergentes em relação ao sobrenadante livre das células foi registrada com o intuito de descobrir se essas substâncias interferem a atividade antimicrobiana das BLIS. Como controle, essas substâncias também foram testadas sem o sobrenadante, para verificar se as substâncias possuem ação antimicrobiana na concentração do experimento.

<i>Lactococcus lactis</i> CECT-4434	
TritonX-100	12,99 mm
Tween-20	11,16 mm
Tween-80	11,24 mm
SDS	13,29 mm
Acetonitrila	9,73 mm
Isopropanol	10,30 mm
NaCl	9,76 mm
Sulfato de amônio	10,26 mm
Etanol	10,19 mm

Teste realizado com a técnica de spot-on-lawn, e usando 10 µL para cada ponto, *Lactococcus lactis* CECT 4434 contra *Listeria innocua* 2711.

Tabela 2: Teste de estabilidade a solventes orgânicos, sais e detergentes.

A tabela 2 mostra que, dentre os solventes orgânicos, sais e detergentes utilizados, o SDS é a substância que mais causa alteração na atividade das BLIS e possui atividade apresentando halo (dados não mostrados), com um halo de inibição medindo 13,29mm, em contraste com a acetonitrila, substância que gerou o menor halo de inibição, de 9,73mm.

O controle dos solventes sem o sobrenadante não apresentaram halos, comprovando que a alteração na atividade antimicrobiana foi decorrente da interação dos solventes com o sobrenadante.

## 5 | CONCLUSÃO FINAL

A partir dos resultados apresentados, a cepa de *Lactococcus lactis* CECT-4434 foi capaz de produzir substâncias inibitórias semelhantes à bacteriocinas, as BLIS, quando cultivadas em meio de cultura contendo um resíduo de um processo agroindustrial, o bagaço de cana de açúcar. Os sobrenadantes livres de células apresentaram atividade antimicrobiana quando testadas contra a principal bactéria causadora da cárie *Streptococcus mutans*, cepa UA159.

A atividade anticariogênica foi capaz de inibir totalmente o crescimento de *S. mutans* UA159 a partir de BLIS obtidas em meio com 10% em volume de bagaço de cana de açúcar, com 100 $\mu$ L do volume do sobrenadante.

## REFERÊNCIAS

ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. I. Non-conventional therapeutics for oral infections. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 196–207, 2015.

ALLAKER, R. P.; STEPHEN, A. S. Use of Probiotics and Oral Health. **Current Oral Health Reports**, v. 4, n. 4, p. 309–318, 2017.

BOWEN, W. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 228–233, 2015.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. D. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 321–323, 2006.

CAGETTI, M. et al. The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2530–2550, 2013.

CAO-HOANG, L. et al. Synergistic action of rapid chilling and nisin on the inactivation of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 105–109, 2008.

CAUFIELD, P. et al. Diversity of Lactobacilli in the Oral Cavities of Young Women with Dental Caries. **Caries Research**, v. 41, n. 1, p. 2–8, 2006.

CHALÓN, M. C. et al. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 735–744, 2012.

CHEN, L. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 857–867, 2015.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2012.

FLOCH, M. H. Recommendations for Probiotic Use—2008 Response. **Journal of Clinical Gastroenterology**,

v. 43, n. 8, p. 793, 2009.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

GUPTA, P. et al. Role of Sugar and Sugar Substitutes in Dental Caries: A Review. **ISRN Dentistry**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

GÁLVEZ, A. et al. Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. **Food Biopreservation SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition**, p. 3–14, 2014.

HAUKIOJA, A.; LOIMARANTA, V.; TENOVUO, J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 4, p. 336–343, 2008.

HEATH, E. C. et al. **PENTOSE FERMENTATION BY LACTOBACILLUS PLANTARUM**. Disponível em: <<https://www.jbc.org/content/231/2/1009.long>>

HENG, C. **Tooth Decay Is the Most Prevalent Disease**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6373711/>>

HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 77–84, 2005.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H.-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 545–557, 2002.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1-3, p. 39–85, 1993.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103–125, 1998.

KRZYŚCIAK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 499–515, 2013.

LALEMAN, I.; TEUGHEL, W. **Probiotics in the dental practice: a review**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25485319>>

LIN, X. et al. Effect of Probiotic *Lactobacilli* on the Growth of *Streptococcus mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 4175–4181, 2017.

LYE, H. S. et al. Beneficial Properties of Probiotics. **Tropical Life Sciences Research**, v. 27, n. 2, p. 73–90, 2016.

MARTTINEN, A. et al. Short-term consumption of probiotic *Lactobacilli* has no effect on acid production of supragingival plaque. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 3, p. 797–803, 2011.

MATHUR, V. P.; DHILLON, J. K. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 3, p. 202–206, 2017.

METLITSKAYA, A. et al. Aspartyl-tRNA Synthetase Is the Target of Peptide Nucleotide Antibiotic Microcin C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18033–18042, 2006.

NOBILE, C. G. et al. Pattern and severity of early childhood caries in Southern Italy: a preschool-based cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, 2014.

PALOMBO, E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

PARKS, W. M. et al. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 500–507, 2007.

PRUDÊNCIO, C. V.; SANTOS, M. T. D.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5408–5417, 2015.

RAMU, R. et al. Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00–00, 2015.

RAO, Y.; LINGAMNENI, B.; REDDY, D. **Probiotics in oral health--a review**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22866427>>

SAHA, S. et al. Probiotics as oral health biotherapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 9, p. 1207–1220, 2012.

SEMINARIO-AMEZ, M. et al. Probiotics and oral health: A systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2017.

VINCENT, P.; MORERO, R. The Structure and Biological Aspects of Peptide Antibiotic Microcin J25. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 538–549, 2009.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3355–3359, 1992.

YANG, S.-C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

ZACHAROF, M.; LOVITT, R. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

## EFEITOS DO TOLUENO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO E REPRODUTOR DE RATOS WISTAR

Data de aceite: 18/06/2020

### Ana Rosa Crisci

Centro Universitário “Barão de Mauá”  
Departamento de Morfologia,  
Ribeirão Preto, São Paulo

CV: <http://lattes.cnpq.br/5780770064633516>

### Marcos Leandro Paoleli dos Santos

Centro Universitário “Barão de Mauá”,  
Ribeirão Preto, São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/0622716434158908>

### Paulo Henrique da Silva Santos

Centro Universitário “Barão de Mauá”,  
Ribeirão Preto, São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/6446311179826835>

### Ângelo Rafael Bueno Rosa

Centro Universitário “Barão de Mauá”  
Ribeirão Preto, São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/5072884129749536>

### Betina Ferreira Lacerda

Centro Universitário “Barão de Mauá”,  
Ribeirão Preto, São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/3707474012873476>

### Wilson Roberto Malfará

Centro Universitário “Barão de Mauá”  
Departamento de Farmacologia,  
Ribeirão Preto, São Paulo  
CV: <http://lattes.cnpq.br/1349279406406034>

### Lucila Costa Zini Angelotti

Centro Universitário “Barão de Mauá”  
Departamento de Estatística,  
Ribeirão Preto, São Paulo

CV: <http://lattes.cnpq.br/8754211273865269>

**RESUMO:** O tolueno é um dos principais solventes orgânicos presente em adesivo de contatos, composto este que traz um problema social porque adolescentes usam como droga ilícita além de corresponder a um obstáculo laboral, ao qual muitos trabalhadores estão expostos. De maneira geral, todos estão em contato com este tóxico, já que este composto está presente em combustíveis fósseis que são queimados e despejados na atmosfera diariamente. Um trabalho experimental foi realizado, em busca de entender melhor os efeitos da exposição crônica, às altas concentrações desta substância nos aparelhos respiratório e reprodutivo de ratos. Para tanto, dois grupos com 10 animais, um controle exposto a água destilada e outro tratado exposto a 12.000ppm de tolueno, de forma inalatória, por meio de nebulizador ultrassônico acoplado a uma caixa plástica com capacidade de 30L, durante 53 dias. Posteriormente, foram coletados os órgãos e fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina para análises histológicas. Foi constatado que não houve alterações na vigor dos espermatozoides

nem danos nos tecidos do aparelho reprodutivo, no entanto, foi possível observar alterações nos tecidos do aparelho respiratório tais como: danos ao epitélio da laringe e diminuição dos cílios da traqueia, além de espessamento de septos alveolares. Os resultados permitem concluir que grandes exposições ao tolueno podem acarretar danos ao sistema respiratório.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tolueno. Hidrocarbonetos. Ocupacional.

## EFFECTS OF TOLUENE ON THE WISTAR RAT BREATHING AND BREATHING APPLIANCE

**ABSTRACT:** Toluene is one of the main organic solvents present in different products such as in contact stickers. This compound causes a social problem once some adolescents use as an illicit drug and a also corresponds to a labor obstacle, causing several damages to workers exposed to this substance. In general, everyone is in contact with this toxic, whereas it is also present in fossil fuels that are burned and released into the atmosphere daily. An experimental study was carried out in order to better understand the effects of chronic exposure to high concentrations of this substance in respiratory and reproductive organs. Two groups with 10 animals, one control exposed to distilled water and another exposed to 12.000ppm of toluene (treated) in an inhalation form, by means of ultrasonic nebulizer coupled to a plastic box with a capacity of 30L for 53 days. Subsequently, they organs were collected it, fixed in 10% buffered formalin and included in paraffin for histological analysis. It has been found that there were no changes in motility of spermatozoa and neither tissue damage of the reproductive apparatus. However, it was possible to observe changes in respiratory apparatus like: damage to the larynx epithelium and decreased cilia of the trachea, despite thickening of alveolar septa. Thus it was possible to conclude that high concentrations of toluene promotes severe damages to respiratory system

**KEYWORDS:** Toluene. Hydrocarbons. Occupational.

## 1 | INTRODUÇÃO

O metilbenzeno  $C_6H_5CH_3$ , fenilmetano, toluol, metilbenzol ou tolueno como é popularmente conhecido, é um solvente orgânico com peso molecular de 92,15 g/mol e, segundo a Agência Ambiental Americana (*Environmental Protection Agency*) sua concentração letal (LC50) é de 33,176 mg/m<sup>3</sup> em ratos.

São encontrados em adesivos de contato, combustíveis fósseis, solventes e produtos de limpeza (FORSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994), porém sua principal utilidade é na octanagem da gasolina. O tolueno também está comumente associado a outros hidrocarbonetos que auxiliam na composição da gasolina como o benzeno e xilol, a associação destes três solventes é chamada de BTX (benzeno, tolueno e xilol) (BRASIL, 2005).

Estudos a respeito da toxicidade do tolueno e seus efeitos no organismo, datam de meados de 1930, nos quais foram verificadas alterações hematológicas em trabalhadores

no decorrer dos anos de exposição a tolueno e benzeno, como leucopenia e anemia além de outras alterações no hemograma (FERGUSON; HARVEY; HAMILTON, 1933).

Foi descrito que a exposição inalatória de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) à cola de sapateiro, na qual está presente o tolueno, causou danos às fibras estriadas cardíacas (MANZAN; MONTEIRO; SOUZA et al., 2010). Ainda, segundo os autores, trata-se também de um problema de saúde pública e de ordem social, pois é usado como droga ilícita por jovens e adolescentes e ocupacionais, já que muitos trabalhadores de fábricas e indústrias podem entrar em contato com tolueno de forma indireta.

Por se tratar de uma substância lipossolúvel, o tolueno consegue passar pela barreira hematoencefálica, atuando como um depressor do sistema nervoso central, além de ter afinidade por tecidos gordurosos pelo seu caráter lipofílico (FORSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994).

Os sintomas da exposição inalatória ao tolueno são fadiga, perda de lucidez, tonturas, dores de cabeça, disfunção da coordenação motora, mudança de comportamento, anorexia reversível, um aumento no número de linfócito no sangue, inflamação de garganta, irritação no trato respiratório superior, inflamação e degradação do epitélio respiratório e na exposição crônica ao tolueno também foram relatadas lesões pulmonares, quanto a sua carcinogenicidade, é classificado como grupo 3, não carcinogênico para seres humanos segundo Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 1999). Quando em contato com a atmosfera se liga em outros gases e pode formar outras substâncias tóxicas como cresol e benzaldeído, é considerado de risco moderado aos sistemas hídricos, quanto ao solo seu impacto é menor, pois é biodegradável.

Estudos realizados sobre a gestação de pais usuários de tolueno de maneira ilícita e abusiva demonstram indícios de efeitos sobre o aparelho reprodutor da prole, além de um aumento nos casos de aborto, porém estes dados não são conclusivos devido a muitas variáveis (JURAS, 2005).

A exposição crônica a altos níveis de tolueno em ratos jovens pode levar a um quadro de disfunção metabólica e alteração da homeostase da glicose e ainda foi verificado uma alteração no RNAm hipotalâmico que expressa genes que atuam na regulação de apetite e saciedade (DICK; SIMPSON; QAMA et al., 2015).

Segundo a portaria N° 1339, de 18 de novembro de 1999 do Ministério da Saúde, (BRASIL, 1999) o tolueno está associado a uma lista de fatores de riscos que, por sua vez, está relacionada a uma série de doenças por sua exposição no ambiente de trabalho.

Foi verificado aumento do nível de ácido hipúrico que é um metabólito decorrente do metabolismo do tolueno em frentistas de postos de gasolina (GRENDELE; TEIXEIRA, 2009).

De acordo com Augusto, Kulay e Franco (2012), houve associação desta substância com perda auditiva, indicando um efeito ototóxico, o que causa muitos problemas a trabalhadores que entram em contato constante com o tolueno, além do ambiente laboral, a população em geral está exposta a este solvente, já que é também derivado da queima de combustíveis fósseis como o diesel (GUIMARÃES, 2004).

A fertilidade masculina tem diminuído no decorrer das últimas décadas, Carlsen,

Giwerzman e Keiding et. al., (1992) verificaram que a concentração de espermatozoides do sêmen humano diminuiu de 133 milhões para 66 milhões/mL entre 1938 a 1990. Para Oshio (2010) a perda de fertilidade masculina pode estar relacionada com a transição do estilo de vida humano, as substâncias, agentes físicos, fatores ambientais e ocupacionais a qual o homem está inserido e, pode permitir tal alteração.

Perante os dados levantados, realizou-se um trabalho experimental em busca identificar e esclarecer os riscos da exposição crônica à inalação de altas concentrações do tolueno (12.000ppm) e constatar os possíveis danos histopatológicos deste solvente orgânico em tecidos dos aparelhos respiratório e reprodutivo, usando como modelo ratos Wistar, pela similaridade dos tecidos com seres humanos.

Objetiva-se verificar as alterações microscópicas referentes à exposição ao solvente nos tecidos das vias respiratórias, analisar se houve alteração no peso dos testículos, bem como averiguar a espermatogênese de ratos Wistar machos expostos à inalação do tolueno.

Tendo em vista as ações tóxicas do tolueno descritas na literatura e sua presença em produtos habitualmente manipulados no âmbito profissional e domiciliar, considera-se importante investigar seus efeitos de forma a permitir ações preventivas de saúde pública, bem como entender melhor os factuais perigos relacionados a este solvente que causa impactos no meio ambiente.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram cedidos pelo Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá sob jurisdição do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN), Protocolo nº 284/2017. Todo experimento foi realizado no Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá.

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos com idade aproximada de 60 dias e pesando inicialmente em média 450 gramas, divididos em dois grupos contendo 10 animais cada. Os animais foram alojados em duplas nas gaiolas de polipropileno contendo cama de maravalha e grade superior (fig. 1 A).

Os animais foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura entre 21 a 24° C, recebendo água e ração própria (NUVILAB®). O grupo de tratamento foi exposto ao tolueno 99% (Anidrol) 12.000 (ppm), concentração similar a utilizada por usuários como droga ilícita (BRUCKENER E PETERSON, 1981), para tanto foram adicionados 120µL de tolueno em 10 mL de água destilada, o grupo controle foi exposto à água destilada (10mL), a exposição ocorreu por meio de um nebulizador ultrassônico (Medicate®) modelo MD 1000, com capacidade de injeção de ar de 7 L / min. acoplado a uma caixa plástica com capacidade de 30 L (25 cm x 30 cm x 40 cm), caixa está semelhante a que foi utilizada por MANZAN; MONTEIRO; SOUZA et al., (2010), as exposições tiveram duração de 10 minutos diariamente durante 53 dias, período este que é referente à espermatogênese (OSHIO, 2010) e ocorreram simultaneamente no grupo tratado e controle.

Os animais foram anestesiados e sacrificados com cloridrato de ketamina (100mg/kg) associado com cloridrato de xilazina (6mg/kg) e Tiopental sódico (40mg/Kg) via Intramuscular

e Intraperitoneal.

Em seguida foram retirados os órgãos traqueia, laringe, pulmão e testículos sendo que todos foram adicionados ao frasco contendo formol tamponado 10% (fig. 1 E e F), para posterior análise histopatológica.



Figura 1 - Procedimentos Metodológicos: Em A: Distribuição dos animais em gaiolas contendo cama de maravalha. Em B e C: Sistema de inalação contendo água e tolueno. Em D: procedimento de inalação. Em E: laparotomia e punção arterial. Em F: coleta dos órgãos para análise histológica.

Fonte: o Autor

Os testículos foram paralelamente pesados em uma balança analítica e, por intermédio de dissecação da cauda do epidídimo, onde foi obtido a secreção espermática, material este que foi transferido para uma placa de Petri contendo 1mL de soro fisiológico, cerca de 500 $\mu$ L desta solução foi passado para uma lâmina previamente aquecida a 36°C. O material foi observado em microscópio óptico, a fim de avaliar o vigor dos espermatozoides e avaliar em uma escala de 0 a 5 quão móvel estão estas células, a alíquota restante desta solução de 1mL foi armazenada em eppendorf para futuras análises de morfologia.

As comparações das massas médias no início do estudo e no final, dos consumos hídricos médios no início e no final do estudo e das demais características de natureza quantitativa nesses dois momentos serão realizadas por teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, uma alternativa não-paramétrica útil e com alto poder estatístico ao teste paramétrico t-Student para dados que violam seus pressupostos teóricos ou amostras pequenas, portanto foram solicitados 20 animais, totalizando dois grupos com 10 animais, para então comparar as alterações propostas para a pesquisa com certa acurácia (SIEGEL e CASTELLAN JUNIOR, 2006), nível de significância de todos os testes realizados foi de 5%.

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Peso inicial x Peso Final dos grupos experimentais

As diferenças entre a massa corporal dos animais quando comparado o peso inicial e final do experimento, por meio do teste estatístico F, foi possível chegar a conclusão de que não houve diferença significativa entre os grupos.

#### 3.2 Peso dos testículos dos grupos experimentais

Em relação ao peso de ambos os testículos do grupo tratado e controle, também verificou-se que não houve diferença estatística significativa.

#### 3.3 Espermograma

O mesmo ocorreu com o vigor, não houve alterações quando comparado ambos os grupos, já na morfologia verificou-se algumas alterações como mostra a figura 2.

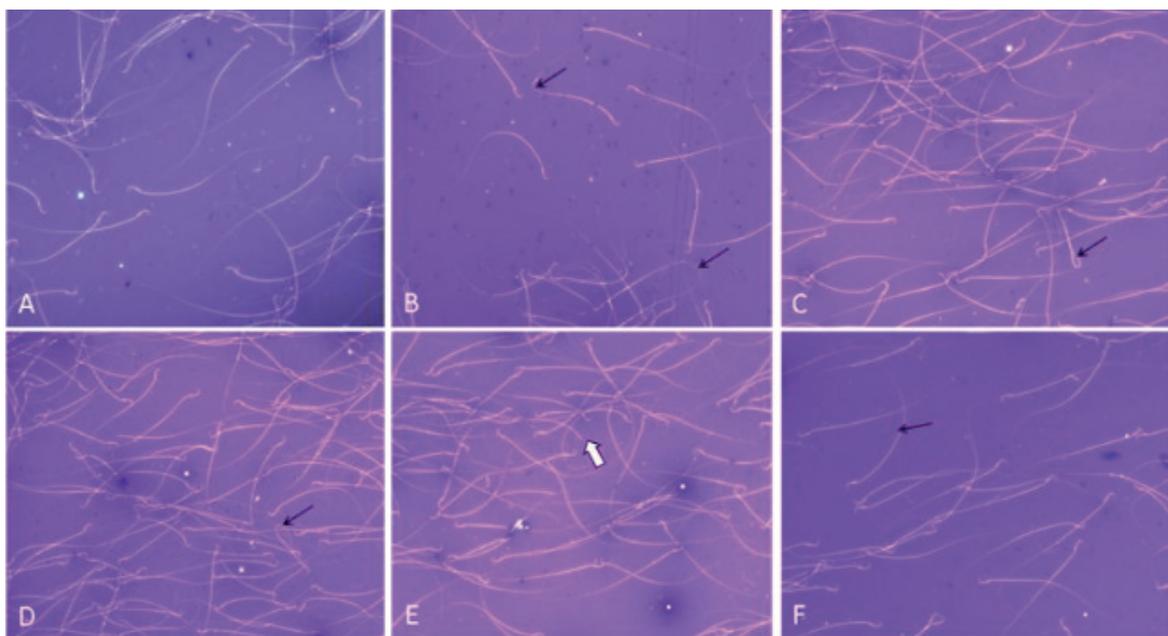


Figura 2 - Alterações morfológicas no esfregaço de espermatozoides. Em A, espermatozoides do grupo controle, apresentam – se de aspectos normais. Em B, C, D, E e F, espermatozoides de animais que inalaram tolueno. Em B: cauda com angulação acentuada. Em C e D: cauda enrolada. Em E: acéfalo.

Em F: cauda com angulação atenuada.

Fonte: o autor

#### 3.4 Resultados histopatológicos

Nas secções testiculares dos ratos do grupo controle os tubos seminíferos apresentaram-se bem organizados. O epitélio seminífero mostrou-se íntegro, com células espermatogênicas em todas as etapas de desenvolvimento (figura 3A), o espaço intertubular

apresentou-se normal contendo vasos sanguíneos e as células de Leydig também com aspectos normais (figura 3 A). Na figura 3B, as secções testiculares dos ratos do grupo tratado, os tubos seminíferos apresentaram em muitas áreas alterações nas células da linhagem espermatogênica, uma descamação das células germinativas para o lúmen tubular, o espaço intertubular apresentou-se diminuído.

Nas secções do epidídimo dos ratos do grupo controle, os estereocílios apresentam-se bem visíveis e característicos (figura 3C). Entretanto, no grupo tratado, os estereocílios apresentam-se bem atrofiados e pouco visíveis.

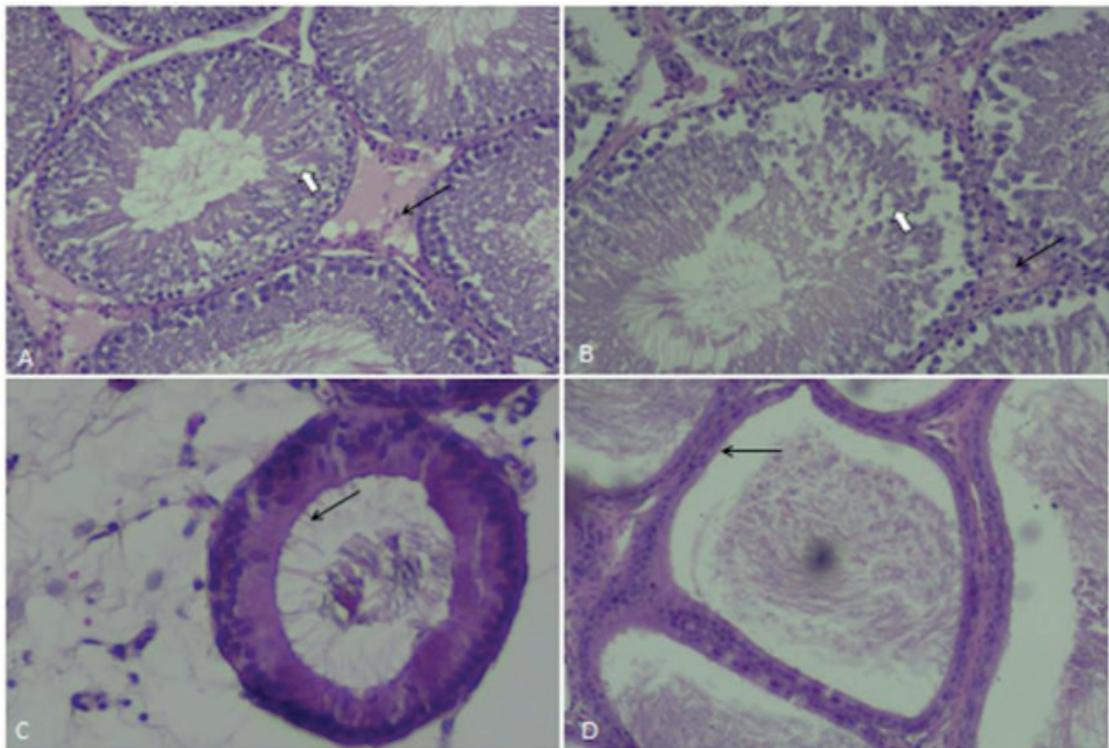


Figura 3 Aspectos histopatológicos aparelho reprodutor Fotomicrografias dos aspectos histopatológicos do testículo e epidídimo dos grupos experimentais. Em A e C grupos controles. Em B e D grupo tratado. Coloração H.E. Aumento de 400x

Fonte: o autor

Nas fotomicrografias dos aspectos histopatológicos da traqueia (figura 4 A) foram observados em A (grupo controle) que a traqueia apresentou um aspecto normal, com preservação de epitélio e de tecido subjacente (conjuntivo). No grupo tratado, a traqueia apresentou um epitélio com alterações nos cílios, e acentuado processo inflamatório no tecido subcutâneo subjacente.

Nos aspectos histopatológicos da laringe (figura 4B) foram observados no grupo controle que a laringe evidenciou-se com aspecto normal, com preservação do epitélio ciliar e mucoso das cordas vocais e o tecido subjacente (conjuntivo e cartilagem) também aparecem normais. Na (figura 4E) do grupo tratado, a laringe apresentou-se com área epitelial alterada com perda total do aparelho ciliar, na figura 4C, as fotomicrografias do pulmão observou-se no grupo controle que o parênquima pulmonar apresentou-se totalmente preservado, bronquíolos e septos interalveolares normais, luz alveolar e do bronquíolo sem congestão

vascular. Entretanto, no grupo tratado o parênquima pulmonar mostrou-se desorganizado apresentando uma congestão pulmonar e um espessamento de septos alveolares devido à congestão vascular.

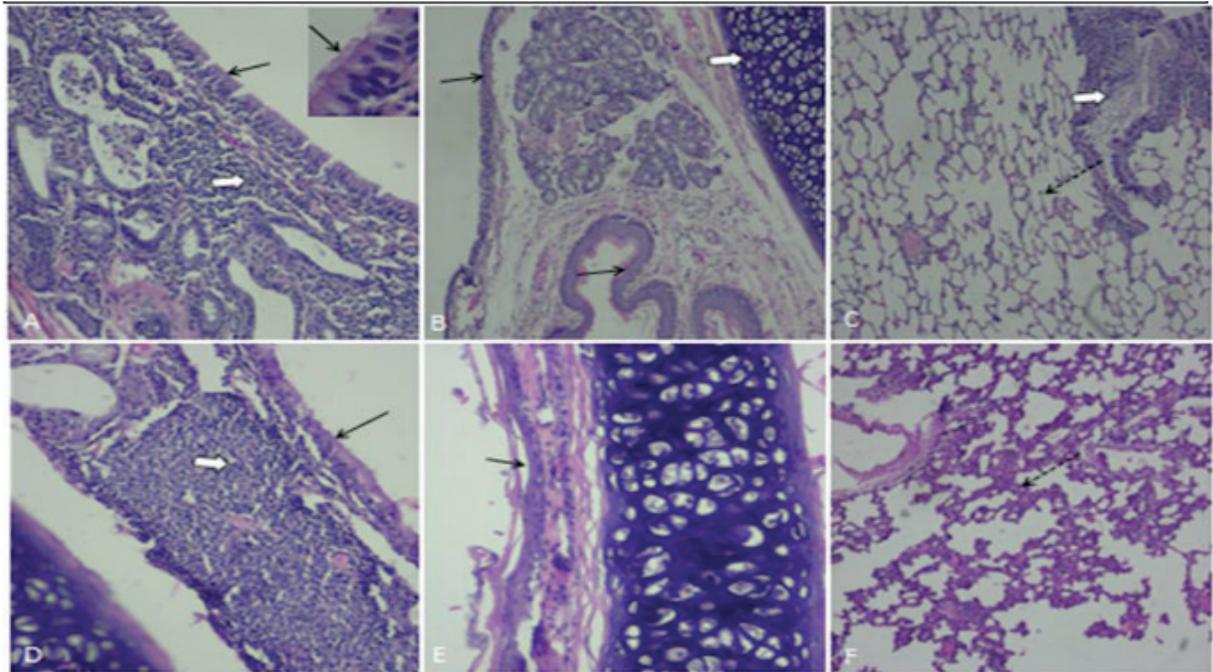


Figura 4 Aspectos histopatológicos aparelho respiratório Fotomicrografias da traqueia, laringe e pulmão, dos grupos experimentais. Em A, B e C grupo controle. Em D, E e F grupo tratado. Coloração H.E. Aum. 400x e 100X

Fonte: o autor

## 4 | DISCUSSÃO

Houve variações na diferença média geral do peso inicial e final dos animais, a média geral do grupo controle foi maior que a do tratado, a discrepância de peso entre o início e o fim do experimento, quando se compara os animais controle e tratado não aparentam ter causa-efeito com o tolueno, que vai à contramão do que foi observado por Callan, Kott, Cleary et al., (2016) onde ficou evidenciado que a exposição à concentrações na categoria muito alta (5.000 a 15.120 ppm) foi descrita como maior causadora de efeitos no ganho de peso corporal dos animais, no entanto, ainda segundo os autores, há indícios que os efeitos da exposição ao tolueno não é universal, uma vez que variou quando analisado em modelos de diferentes espécies .

A hipótese inicial era de que haveria uma alteração no peso médio dos animais tratados em relação ao controle, já que a inalação do tolueno gera um descontrole na homeostase da glicose (DICK; SIMPSON; QAMA et al., 2015), por este descontrole, era inferido que os animais teriam que se alimentar mais ou menos para manter a glicemia em níveis normais, porém esta hipótese não se concretiza quando se observa os dados obtidos.

De acordo com Otero, Oliveira e Vianna (2014) a exposição inalatória de ratos Wistar a fumaça do cigarro, no qual está presente o tolueno (ZANIN; SANTOS, 2006) culminou na

alteração de massa corpórea dos animais durante a fase experimental, diferentemente do que foi observado neste trabalho.

A média de ambos os testículos direito e esquerdo dos animais controle tiveram o mesmo peso, já animais expostos ao tolueno houve uma alteração no peso médio do testículo esquerdo em relação ao direito, o que poderia indicar uma relação com ação do tolueno no órgão, como observado por Ono; Kawashima; Sekita et al., (1999) onde verificaram que animais expostos a 6.000ppm de tolueno, obtiveram uma diminuição na produção do hormônio luteinizante (LH), que por sua vez atua na regulação da testosterona.

A queda na produção de testosterona pode afetar diretamente no tamanho dos testículos, visto que com o estímulo diminuído para produção e amadurecimento dos espermatozoides, a estrutura pode atrofiar e ter uma diminuição no peso do órgão, porém testando estatisticamente se o tratamento influenciou sobre as diferenças médias dos testículos direito e esquerdo dos ratos, conclui-se que não tem influência a exposição ao tolueno, pois a diferença não é significativa, o que corrobora com o trabalho de Pereira (2014), onde foi confirmado que não houve diferença estatística entre os testículos de animais expostos a hidrocarbonetos, classe a qual o tolueno pertence.

Para Oshio (2010) é importante à análise do peso gonadal, mas uma vez que esta estrutura depende de estímulos hormonais, é necessário analisar a histopatologia para uma melhor interpretação, pois a histopatologia testicular é um dos padrões mais sensíveis para a verificação de possíveis alterações na fertilidade masculina.

Notou-se alterações na organização das células da linhagem espermátogênica no túbulo seminífero e atrofiamento dos estereocílios do epidídimo, diferentemente de Ono, Kawashima, sekita et al., (1999) onde não observaram alterações morfológicas no testículo, mas sim apenas especificamente no epidídimo.

Quanto à capacidade de vigor dos espermatozoides não existiu diferenças, portanto, nesse sentido não é possível afirmar que apesar de pequenas alterações morfológicas nos espermatozoides não foi o suficiente para reduzir o vigor destas células, no entanto, ocorreu apenas um ciclo de espermatogênese o que pode não ter sido suficiente para causar alterações mais acentuadas como foi verificado por Ono, Kawashima, sekita et al., (1996) que ao expor os animais por 90 dias observou tais alterações que não ocorreu com 53 dias.

Nos aspectos histopatológicos do sistema respiratório foi verificado em alguns locais como a laringe perda total do aparelho ciliar, o que indica uma possível interrupção por meio do tolueno em algum mecanismo biológico que leva a formação dos cílios, a cilogênese, que é um evento onde ocorre a diferenciação e maturação terminal do epitélio respiratório, resultando na produção de aproximadamente 200 cílios por célula (TAMASHIRO; XIONG, ANSELMO-LIMA et al., 1999)

Na traqueia além da alteração nos cílios, verificou-se processo inflamatório no tecido subcutâneo subjacente, todos estes danos ao epitélio respiratório podem acarretar em uma menor eficiência imunológica do trato respiratório, em vista que em indivíduos normais a secreção de muco do aparelho respiratório é limpo por batimento ciliar cerca de 90% do material ali presente a cada hora. Pessoas com deficiência no batimento ciliar apresentam

episódios de algumas patologias relacionadas com sistema respiratório (BALESTIERI, 2006).

Foi notado um espessamento da membrana e septo alveolar, que é um dos vários fatores que podem comprometer a difusão de O<sub>2</sub> durante a hematose. Em patologias intersticiais, a espessura da membrana leva paralelamente a uma redução da área disponível para trocas gasosas. Os danos causados ao tecido alveolar aparenta ter efeito com a concentração utilizada e tempo de exposição, pois segundo Fujimaki, Yamamoto, Shwe et al., (2007) camundongos expostos a 50ppm por 12 semanas, não foi verificado nenhuma diferença no epitélio alveolar quando comparado ao grupo controle.

Os danos histopatológicos causados ao aparelho respiratório esta em concordância com o que foi observado por Kanter (2010), ao expor ratos a 3000ppm durante 12 semanas ocorreu inflamação do parênquima pulmonar, edema e hemorragia alveolar e muitos alvéolos foram obstruídos, entretanto Bruckner e Peterson (1981) reportaram que ratos expostos de 4.000 a 12.000 ppm de tolueno por 8 semanas, condições similares deste trabalho, não foi verificado nenhum sinal de alterações histológicas no pulmão.

Em vista de algumas dicotomias quanto aos danos causados pelo tolueno, uma vez que há baixo número de trabalhos disponíveis que envolvam os aparelhos respiratório e reprodutor, com as informações aqui obtidas espera-se auxiliar na complementação de dados na literatura, mas, no entanto, ainda é necessária a realização de estudos posteriores em busca de se entender melhor a ação do tolueno nos sistemas biológicos.

## 5 | CONCLUSÃO

No aparelho respiratório, foram verificadas alterações histopatológicas como espessamento de septos alveolares, a laringe apresentou-se com área epitelial alterada com perda total do aparelho ciliar e a traqueia apresentou um epitélio com alterações nos cílios, danos estes que podem ser atrelados à inalação de altas concentrações de tolueno.

No aparelho reprodutor, ocorreram alterações histopatológicas nas células da linhagem espermatogênica, espaçamento intertubular diminuído, estereocílios atrofiados e uma descamação das células germinativas para o lúmen tubular.

Em posse dos resultados aqui obtidos, espera-se fornecer informações como subsídio para que ações em prol da conscientização sobre os perigos do tolueno como droga ilícita, o uso adequado de equipamentos de proteção para que se evite contato com as vias aéreas e busca de políticas públicas adequadas para que se tente atenuar estes problemas, é importante estudos nesta direção para que se explicitem com clareza os riscos associados a este tóxico, presente nos mais variados tipos de ambiente, desde domiciliar até laboral.

## REFERÊNCIAS

AUGUSTO, L. S. C.; KULAY, L. A.; FRANCO, E. S. Audição e exposição ao tolueno uma contribuição para o tema. *Int Arch Otorhinolaryngol*, v. 16, n. 2, p. 246-58, 2012.

BALESTIERI, F. M. P. **Imunologia**. Barueri, SP: Manole,2006. 799 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PORTARIA Nº 1339, DE 18 DE NOVEMBRO DE 1999**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Vigilância do câncer ocupacional e ambiental**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2005. 55p.

BRUCKNER, J. V.; PETERSON, R. G. Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse: I. Pharmacology and pharmacodynamics. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 27-38, 1981.

CALLAN, S. P.; KOTT, J. M.; CLEARY, J. P.; McMACARTHY, M.K.; BALTES, B. B.; BOWEN, S.E. Changes in developmental body weight as a function of toluene exposure: A meta-analysis of animal studies. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 4, p. 341-352, 2016.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence of decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical Journal**, London, v.305, n. 6854, p.609-613, 1992.

DICK, A. L. W.; SIMPSON, A.; QAMA, A.; ANDREWS, Z.; LAWRENCE, A.J.; DUNCAN, J. R. Chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats results in metabolic dysfunction with altered glucose homeostasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 21, p. 5174-5187, 2015.

FERGUSON, T.; HARVEY, W. F.; HAMILTON, T. D. An enquiry into the relative toxicity of benzene and toluene. **Epidemiology & Infection**, v. 33, n. 4, p. 547-575, 1933.

FORSTER, L. M. K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S. L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Rev. Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 167-172, 1994.

FUJIMAKI, H.; YAMAMOTO, S.; SHWE, T. T.W.; HOJO, R.; SATO, F.; KUNUGITA, M.; ARASHIDANI, K. Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice. **Toxicology letters**, v. 168, n. 2, p. 132-139, 2007.

GRENDELE, G. L.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação de ácido hipúrico como biomarcador de exposição ocupacional em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 319-324, set-dez. 2009.

GUIMARÃES, J. R. P. F. Toxicologia das emissões veiculares de diesel: um problema de saúde ocupacional e pública. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 6, n. 1, p. 82-94, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs **on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: IARC, 1999. p. 39. v. 71.

JURAS, I. G. M. **Impacto à saúde e ao meio ambiente do aumento irregular de solventes na gasolina**.

KANTER, Mehmet. Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats. **Toxicology and industrial health**, v. 27, n. 5, p. 387-395, 2011.

MANZAN, L. R.; MONTEIRO, C. O.; SOUZA, M. A.; CONTRERA, M. G. D.; OLIVEIRA, C.; LOPES, R. A. Alterações histopatológicas em músculo cardíaco de rato albino, adulto, variedade Wistar, por inalação crônica de vapores de cola de sapateiro. **INVESTIGAÇÃO**, v. 5, n. 1-6, 2010.

ONO, A., SEKITA, K., OGAWA, Y., HIROSE, A., SUZUKI, S., SAITO, M., NAITO, K., KANEKO, T., FURUYA, T., KAWASHIMA, K., YASUHARA, K., MATSUMOTO, K., TANAKA, S., INOUE, T., KUROKAWA, Y. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. **J. Journal of toxicological sciences**, v. 21, n. 5, p. 357, 1996.

ONO, A.; KAWASHIMA, K.; SEKITA, K.; HIROSE, A.; OGAWA, Y.; SAITO, M.; NAITO, K.; YASUHARA, L.

K.; KANEKO, T.; FURUYA, T.; INOUE, T.; KUROKAWA, Y. Toluene inhalation induced epididymal sperm dysfunction in rats. **Toxicology**, v. 139, n. 3, p. 193-205, 1999.

OTERO, C.; OLIVEIRA, L. F. F.; VIANNA, N. P. **Poluição tabagista ambiental (PTA) e suas consequências no aparelho respiratório e ganho de peso em ratos Wistar**. 2014. 43f. Monografia (conclusão do curso) Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto.

OSHIO, Leonardo Toshio. Métodos em toxicologia do sistema reprodutor masculino e fertilidade em roedores. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 3, 2010.

PEREIRA, Paulo Augusto Amador. **Estudo das alterações no sistema reprodutor de camundongos expostos a contaminação ambiental**. 2008.90f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TAMASHIRO, E.; XIONG, G.; ANSELMO-LIMA, W. T.; KREINDLER, J. L.; PALMER, J.N.; COHEN, N. A. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 2009.

U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS).**Toluene**. 1992. 5 p.

SIEGEL, S., CASTELLAN JUNIOR, J.N. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448 p.

ZANIN, I; SANTOS, V. **Análise do programa “Abordagem cognitivo comportamental de controle e tratamento ao fumante” no município de Caçador – SC**. 2006. 79 p . Monografia (Graduação em Enfermagem) - Universidade do Contestado, Santa Catarina.

## ESTUDO DA INTERAÇÃO E ENSAIO DE MUTAGÊNESE VISANDO O COMPLEXO ENOS-CALMODULINA POR ABORDAGENS *in silico*

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

Ciências Biológicas

Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/6968057310324859>

### **Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/1104307184099700>

### **Olívia Basso Rocha**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/0176020525650551>

### **Katheryne Lohany Barros Barbosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/5289830186684127>

### **Livia do Carmo Silva**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/7092484043564604>

### **Gabriela Danelli Rosa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3632033730008798>

### **Jackeliny Garcia Costa**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de

### **Kleber Santiago Freitas**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas  
Goiânia – GO

<http://lattes.cnpq.br/3813868830071259>

**RESUMO:** Este trabalho se propõe analisar a interação entre as proteínas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a proteína calmodulina, responsáveis pela síntese do óxido nítrico presente no endotélio e que atua como um agente vaso dilatador. Uma vez que ainda existem muitas lacunas no conhecimento sobre os mecanismos moleculares de regulação da eNOS pela interação com a calmodulina, utilizamos de uma abordagem de bioinformática para tentar elucidar melhor o modo de interação entre essas duas proteínas. Com isso, o trabalho se estruturou da seguinte maneira: 1) Obtenção dos dados cristalográficos de ambas as proteínas na plataforma *RCSB Protein Data Bank*; 2) Realização de ensaios de ancoragem molecular entre essas duas proteínas por meio do servidor ClusPro; 3) Os resíduos de aminoácidos que mais contribuem para a formação do complexo proteína-proteína (*hot spots*) foram preditos pelo servidor KFC2; 4) Substituição pontual de um resíduo de aminoácido da sequência da

eNOS conforme indicado pelo dbSNP; 5) Novo ensaio de ancoragem entre a calmodulina e a eNOS mutada a partir do ClusPro. Como resultado, pudemos identificar novos resíduos de aminoácidos promissores para serem alvos de estudos *in vitro* e que ajudariam a clarear os mecanismos moleculares da interação entre essas proteínas que coordenam importantes processos fisiológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** eNOS; interação proteína-proteína; óxido nítrico.

## STUDY OF THE INTERACTION AND MUTAGENESIS ASSAY TARGETING THE ENOS-CALMODULIN COMPLEX THROUGH *in silico* APPROACHES

**ABSTRACT:** This work aims to analyze the interaction between the nitric oxide synthase endothelial proteins (eNOS) with calmodulin, responsible for the synthesis of the nitric oxide that are present in the endothelium and act as a vasodilating agent. Since there are still many gaps in the knowledge about the molecular mechanisms of eNOS' regulation through the interaction with calmodulin, we use a bioinformatics approach trying to elucidate the mode of interaction between these two proteins. Thus, the work was structured as follows: 1) Obtaining crystallographic data of both proteins on the RCSB Protein Data Bank platform; 2) Conducting molecular anchoring assays between these two proteins using the ClusPro 2.0 webserver; 3) The amino acid residues that contribute most to the formation of the protein-protein complex (as known as hot spots) were predicted by the KFC2 webserver; 4) Point replacement of an amino acid residue of the eNOS sequence as indicated by the dbSNP; 5) New anchorage assays between calmodulin and the mutated eNOS utilizing the ClusPro 2.0 webserver. As result, we were able to identify new promising amino acid residues as targets of prospective studies that would help to clarify the molecular mechanisms of the interaction between these proteins that coordinate important physiological processes.

**KEYWORDS:** eNOS; protein-protein interaction; nitric oxide.

## 1 | INTRODUÇÃO

O óxido nítrico é uma molécula gasosa com grande capacidade de difusão entre as membranas celulares, atuando na sinalização de diversos processos. Sua importância na homeostase do sistema cardiovascular é atribuída ao efeito vasodilatador e protetor na hipertensão arterial e inibidor da agregação plaquetária (FLEISSNER; THUM, 2011). Estudos demonstram que disfunções endoteliais com consequente redução da atividade biológica do óxido nítrico é resultante da redução na síntese ou aumento da degradação pelo estresse oxidativo, os quais desencadeiam importantes eventos como disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas e adesão de leucócitos (PEPINE, 2009).

Óxido nítrico é produzido a partir de L-arginina, por uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase constitutiva (c-NOS), a qual é dependente da interação com calmodulina e de íons cálcio, e está envolvida na sinalização celular, e a óxido nítrico sintase induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas

(GRIFFITH; STUEHR, 1995).

Óxido nítrico sintase constitutiva apresenta-se sob a duas isoformas (I e III). A isoforma III ou óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) produz óxido nítrico em condições basais ou estimulada pelo fluxo sanguíneo, o qual é responsável por inibir a adesão e agregação plaquetária na parede vascular e adesão de leucócitos ao endotélio vascular, regular pressão sanguínea e contração do músculo cardíaco (FORSTERMANN; SESSA, 2012).

Os mecanismos de regulação pós-transcricionais da eNOS têm sido associados à dimerização das subunidades da proteína e formação da estrutura caveolar pela proteína caveolina (ZHANG et al., 2006). A eNOS é menos ativa ao interagir com caveolina-1, sendo sua ativação promovida pelos mecanismos de interação com a calmodulina (BUCCI et al., 2000). A calmodulina atua diretamente, competindo com a caveolina, para promover a ativação cálcio-dependente da enzima (SESSA, 2004).

Em 1996, Venema e colaboradores realizaram um estudo para demonstrar a existência de domínios conservados de ligação da calmodulina à estrutura das NOS por uma abordagem baseada em sequências oligopeptídicas e proteínas quiméricas (VENEMA et al., 1996). Entretanto, os tamanhos reduzidos das moléculas de peptídeos utilizadas nestas análises podem não conseguir representar a complexidade da estrutura terciária das proteínas num contexto de um complexo proteína-proteína. Estas preocupações, aliadas aos desafios em conseguir co-cristalizar complexos proteicos muito grandes, contribuem para o estabelecimento de uma lacuna no conhecimento sobre como ocorre a regulação da eNOS pela calmodulina a nível molecular (ZHANG et al., 2012).

Assim, este estudo propõe analisar a interação entre as proteínas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a proteína calmodulina por uma abordagem de bioinformática.

## 2 | METODOLOGIA

Inicialmente verificamos a existência de dados cristalográficos das proteínas eNOS e calmodulina na plataforma *RCSB Protein Data Bank* (PDB) (BURLEY et al., 2019). Frequentemente essas estruturas são cristalizadas em complexos com outras moléculas, assim, para obtermos apenas as estruturas proteicas, realizamos a remoção de todos os elementos que não compõem as sequências de aminoácidos utilizando as funções disponíveis no software PyMOL (versão 2.3.2).

As estruturas foram então submetidas ao ClusPro 2.0, um servidor utilizado para fornecer predições do modo de ancoragem entre duas proteínas em interação (KOZAKOV et al., 2017), assim obtivemos um modelo do complexo eNOS-calmodulina balanceado para interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals.

O estudo da ancoragem entre os dois polipeptídios seguiu com a análise detalhada da interface de interação utilizando o servidor KFC 2 que faz a predição de hot spots, que são aqueles resíduos de aminoácidos que mais contribuem para a afinidade de ligação do complexo proteína-proteína, por uma metodologia baseada em aprendizado de máquina

(ZHU; MITCHELL, 2011).

Prosseguimos com o estudo da IPP buscando avaliar como a inserção de uma mutação pontual em um *hot spot* da proteína eNOS, é capaz mudar o modo de interação entre os dois polipeptídeos de interesse. Utilizamos do banco de dados de polimorfismos de nucleotídeo único (dbSNP) para identificar os resíduos de aminoácidos polimórficos da eNOS (SHERRY et al., 2001) gene mapping and evolutionary biology, the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Posteriormente recorremos às ferramentas do PyMOL para realizar a substituição de um determinado hot spot. Após realizada a mutação pontual, submetemos a estrutura da eNOS mutada e a calmodulina mais uma vez ao servidor do ClusPro 2.0 e avaliamos as diferenças no complexo eNOS-calmodulina após as mutações. A Figura 1 mostra um fluxograma da metodologia empregada neste estudo.

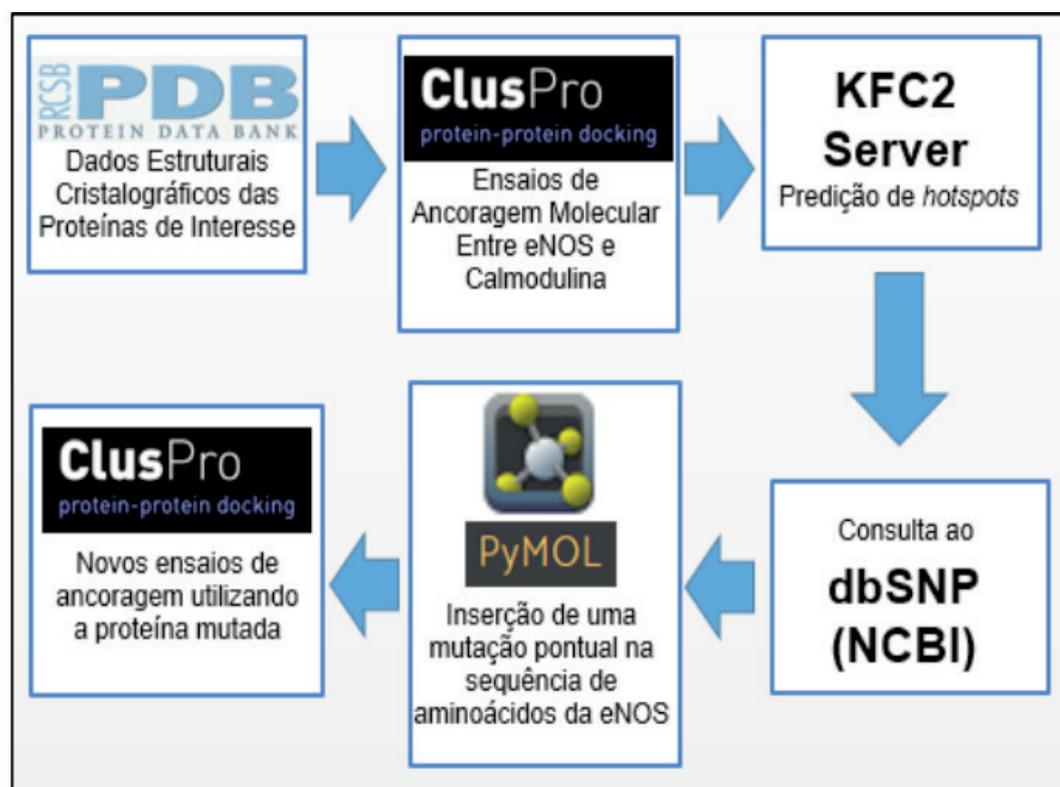


Figura 1 – Fluxograma da metodologia empregada no trabalho.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Obtenção e edição dos dados cristalográficos

O genoma humano contém três genes diferentes para as isoformas neuronal, induzível e endotelial das oxido nítrico sintase (NOS). Tratando especificamente sobre a isoforma endotelial, essa enzima possui 1203 resíduos de aminoácidos com um peso de 133 kDa e frequentemente são encontradas em homodímeros (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Por sua vez, a calmodulina é descrita como uma proteína pequena e promíscua, com peso molecular de cerca de 17 kDa sendo capaz de interagir com mais de 300 proteínas participando da regulação de vários processos celulares, explicitando a importância em

compreender melhor os modos de interação dessa proteína com seus alvos (SPRATT et al., 2007).

Para os ensaios *in silico* utilizamos a estrutura tridimensional da eNOS recuperada do PDB está depositada com o código de acesso 1M9J e em uma análise inicial percebemos que o polipeptídeo foi co-cristalizado com uma molécula de clorzoxazona (ROSENFELD et al., 2002) (Figura 2 A). Similarmente, encontramos a estrutura cristalográfica da calmodulina (depositada com o código de acesso 1A29) em complexo com uma molécula de trifluoperazina (Figura 2 C). Todas as moléculas que não compunham as sequências de aminoácidos das proteínas foram removidas pelo software PyMOL (Figura 2 C e D).

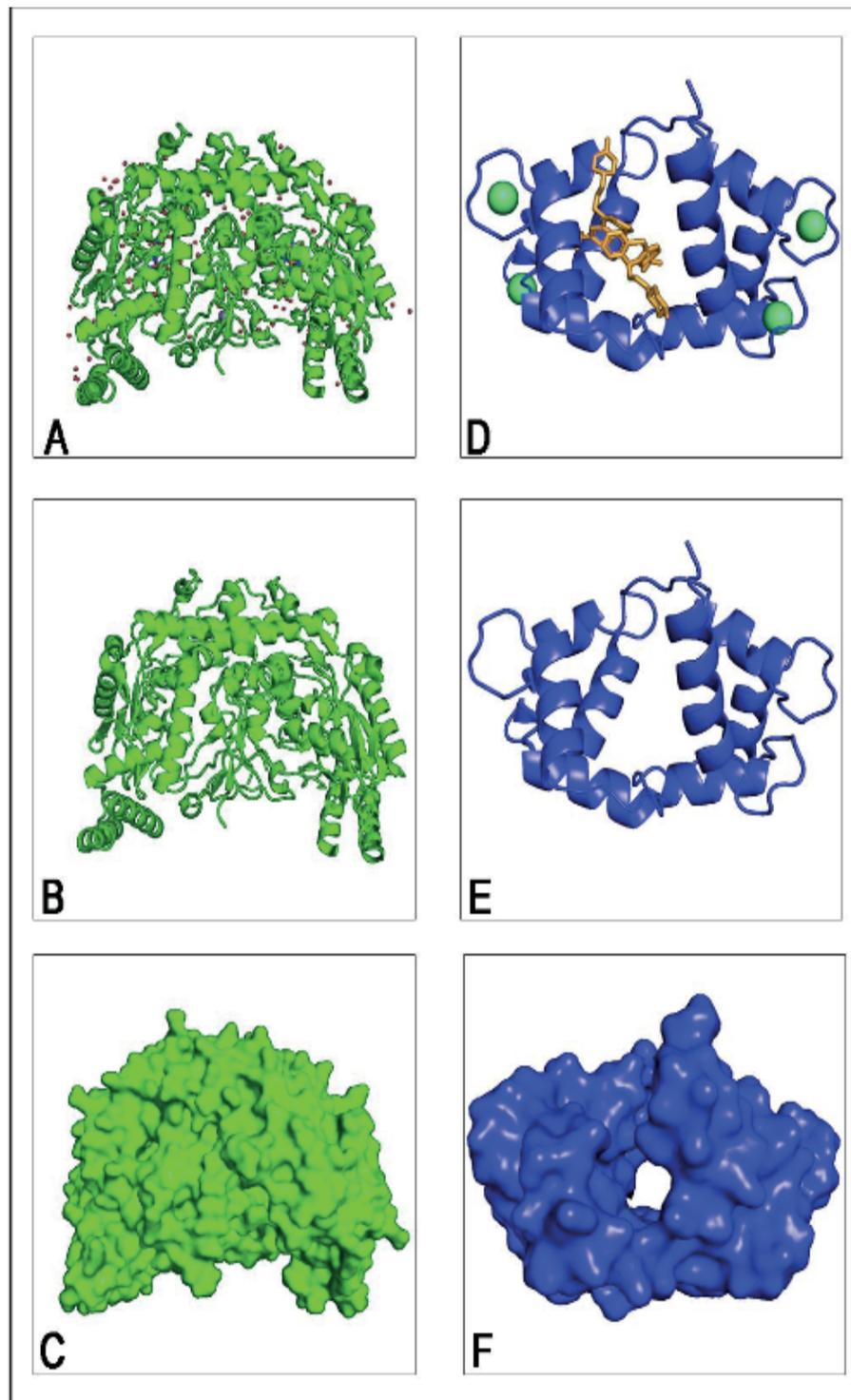


Figura 2 – Comparação das estruturas das proteínas eNOS e calmodulina.

Em A e B são mostradas as estruturas das eNOS antes e após a edição, assim como ocorre em C e D, onde observamos a estrutura da calmodulina antes e após a edição, respectivamente. As figuras C e F mostram uma representação baseada na superfície eletrostática das proteínas eNOS e calmodulina respectivamente.

### 3.2 Ensaio de ancoragem molecular e predição de *hot spots*

O resultado da ancoragem entre as duas proteínas obtidos pelo servidor ClusPro 2.0 podem ser observados na Figura 3. Com a análise pudemos perceber que o modo de interação predito por este servidor proporcionou a ancoragem dos segmentos em hélices da calmodulina nos pockets superficiais da eNOS (Figura 3 C), o que indica uma interação estável com baixo nível de energia livre de ligação.

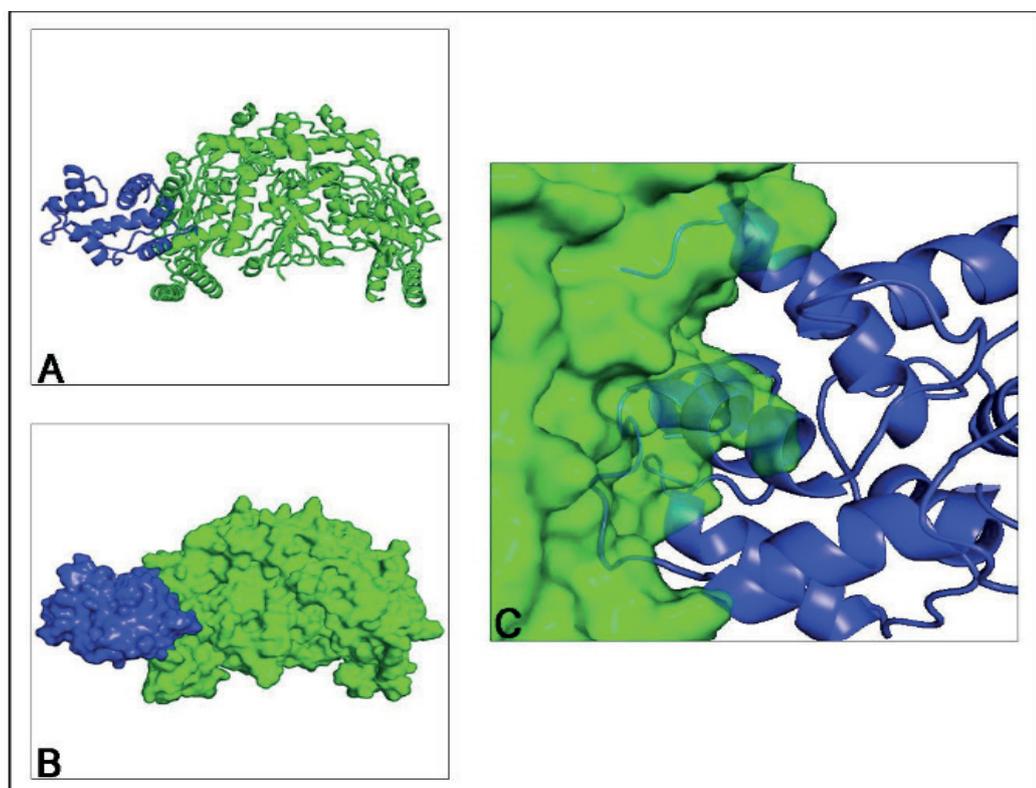


Figura 3 – Predição do complexo eNOS-calmodulina

As figuras A e B mostram ambas as proteínas em interação representadas de duas maneiras distintas. A figura C mostra uma visão ampliada da interface de interação para evidenciar o encaixe das hélices da calmodulina nos pockets da eNOS.

Seguimos com o estudo da interface de interação pela predição dos resíduos de aminoácidos que mais estariam contribuindo para a formação desse complexo. Estes *hot spots* foram preditos pelo servidor KFC2 e, para as nossas análises posteriores, consideramos apenas aqueles resíduos com valor *Conf.* maior que zero para ambos os indicadores (KFC2-A e -B) (Tabela 1).

Proteína	Resíduo	Posição do resíduo	KFC2-A Conf.	KFC2-B Conf.
eNOS	LYS	175	0,84	0,24
eNOS	GLN	194	1,06	0,07
eNOS	PHE	196	0,25	0,27
eNOS	TYR	217	1,1	0,38
Calmodulina	LEU	69	0,45	0,21

Tabela 1 – Hot spots preditos pelo servidor KFC2

### 3.3 Ensaio de mutagênese

A partir do resultado da predição dos resíduos que mais contribuem para a estabilidade do complexo eNOS-calmodulina, consultamos o banco de dados dbSNP para verificar se algum destes *hot spots* já foram reportados como polimórficos anteriormente. Com essa análise identificamos que o resíduo de fenilalanina 196 já foi encontrado sendo substituído por um resíduo de leucina. Assim, utilizamos dessa informação para determinar se a substituição deste *hot spot* seria capaz de impactar na predição da interação entre essas macromoléculas.

Realizamos a substituição da fenilalanina 196 por leucina utilizando o PyMOL e submetemos essa sequência da eNOS mutada junto à calmodulina no ClusPro. Os resultados para este ensaio de mutagênese indicam que o resíduo de fenilalanina 196 é, de fato, essencial para a IPP inicialmente predita pelo ClusPro, uma vez que a inserção da mutação pontual neste resíduo ocasionou um deslocamento da interface de ligação para outra região da eNOS (Figura 4). Isso sugere um aumento na energia livre de interação no local inicialmente predito devido a substituição do aminoácido naquela posição.

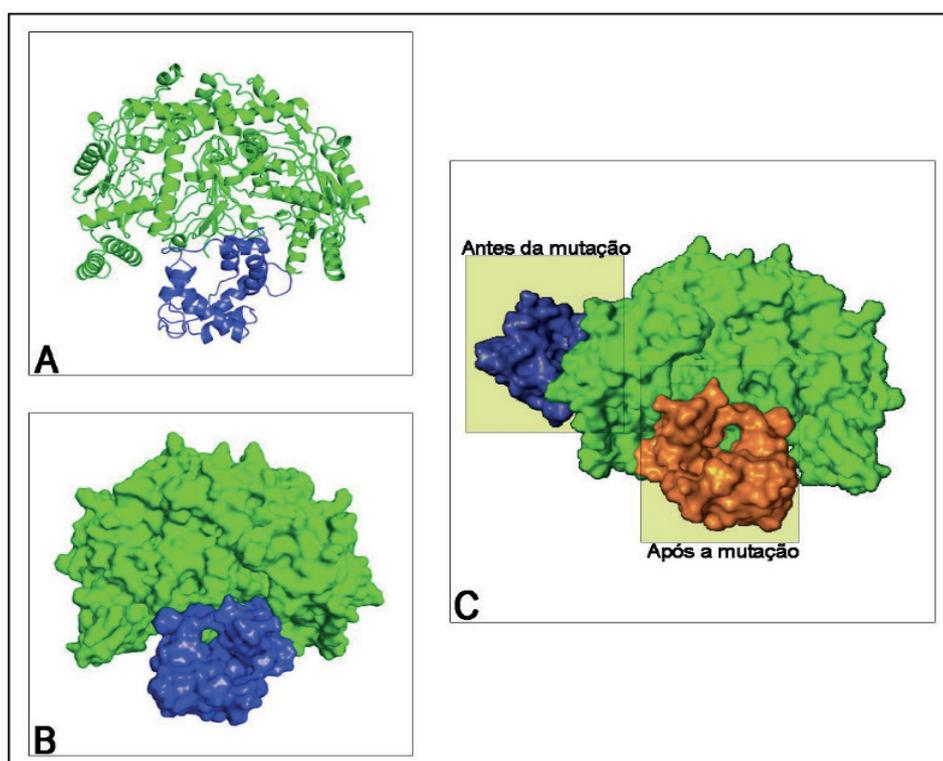


Figura 4 – Ensaio de mutagênese

As figuras A e B ilustram a nova posição da interface de interação entre a eNOS mutada com a calmodulina. A figura C mostra um alinhamento do complexo eNOS-calmodulina antes e depois da mutação pontual.

Venema e colaboradores demonstraram experimentalmente o papel de um domínio de ligação da calmodulina de cerca de 20 resíduos de aminoácidos e a importância dos resíduos Phe-498, Lys-499 e Leu-511 para a ligação dessa proteína à eNOS (VENEMA et al., 1996). Com a abordagem *in silico* que utilizamos conseguimos prever novos sítios putativos de interação entre os dois polipeptídeos.

## 4 | CONCLUSÃO

No sentido de propor uma alternativa às dificuldades em elucidar as características moleculares da IPP entre a eNOS-calmodulina, acreditamos que a metodologia *in silico* empregada foi útil para propor novos sítios putativos de interação que poderão ser explorados por novas abordagens experimentais. Dessa forma, destacamos os *hot spots* preditos como promissores alvos de estudos de *in vitro* para validar seus papéis na formação do complexo, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação de duas proteínas essenciais em diversos processos fisiológicos.

## REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 1 ago. 2001.
- BUCCI, M.; GRATTON, J.-P.; RUDIC, R. D.; ACEVEDO, L.; ROVIEZZO, F.; CIRINO, G.; SESSA, W. C. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. **Nature Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1362–1367, dez. 2000.
- BURLEY, S. K. et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D464–D474, 8 jan. 2019.
- FLEISSNER, F.; THUM, T. Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 4, p. 933–948, 15 ago. 2011.
- FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 1 abr. 2012.
- GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric Oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism. **Annual Review of Physiology**, v. 57, n. 1, p. 707–734, out. 1995.
- KOZAKOV, D.; HALL, D. R.; XIA, B.; PORTER, K. A.; PADHORN, D.; YUEH, C.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, fev. 2017.
- PEPINE, C. J. The Impact of Nitric Oxide in Cardiovascular Medicine: Untapped Potential Utility. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 5, p. S10–S15, maio 2009.

ROSENFELD, R. J.; GARCIN, E. D.; PANDA, K.; ANDERSSON, G.; ABERG, A.; WALLACE, A. V.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D. Conformational changes in nitric oxide synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. **Biochemistry**, v. 41, n. 47, p. 13915–13925, 26 nov. 2002.

SESSA, W. C. eNOS at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 12, p. 2427–2429, 15 maio 2004.

SHERRY, S. T.; WARD, M.-H.; KHOLODOV, M.; BAKER, J.; PHAN, L.; SMIGIELSKI, E. M.; SIROTKIN, K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 308–311, 1 jan. 2001.

SPRATT, D. E.; TAIKINA, V.; PALMER, M.; GUILLEMETTE, J. G. Differential Binding of Calmodulin Domains to Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase Enzymes. **Biochemistry**, v. 46, n. 28, p. 8288–8300, 1 jul. 2007.

VENEMA, R. C.; SAYEGH, H. S.; KENT, J. D.; HARRISON, D. G. Identification, Characterization, and Comparison of the Calmodulin-binding Domains of the Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 11, p. 6435–6440, 15 mar. 1996.

ZHANG, M.; ABRAMS, C.; WANG, L.; GIZZI, A.; HE, L.; LIN, R.; CHEN, Y.; LOLL, P. J.; PASCAL, J. M.; ZHANG, J. Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. **Structure(London, England:1993)**, v. 20, n. 5, p. 911–923, 9 maio 2012.

ZHANG, Q.; CHURCH, J. E.; JAGNANDAN, D.; CATRAVAS, J. D.; SESSA, W. C.; FULTON, D. Functional Relevance of Golgi- and Plasma Membrane-Localized Endothelial NO Synthase in Reconstituted Endothelial Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 5, p. 1015–1021, maio 2006.

ZHU, X.; MITCHELL, J. C. KFC2: A knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density, and plasticity features. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 9, p. 2671–2683, 2011.

## ESTUDO MORFOLÓGICO DO TESTÍCULO DE RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA TRATADOS EM PLATAFORMA VIBRATÓRIA

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### Gabrielly de Barros

Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Campus Cascavel,  
Cascavel – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/1930057612757074>

### Fernando Antonio Briere

Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Campus Cascavel,  
Cascavel – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/1946427660948853>

### Suellen Ribeiro da Silva Scarton

UEL – Universidade Estadual Londrina  
Cascavel – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/4485870782628526>

### Célia Cristina Leme Beu

Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Campus, Cascavel  
Cascavel – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2088054261569808>

**RESUMO:** A obesidade é comprovadamente associada à efeitos negativos sobre a função reprodutiva masculina. Esse estudo avaliou os efeitos da obesidade hipotalâmica, pelo glutamato monossódico (MSG), e do treinamento em plataforma vibratória sobre o epitélio seminífero. Neste estudo, 16 ratos

Wistar foram distribuídos nos grupos: controle (GC), controle plataforma (CP), obeso (GO) e obeso plataforma (OP). Os grupos GO e OP foram expostos ao MSG, a partir do nascimento ao 5° dia de vida pós-natal, para indução da obesidade; enquanto os animais GC e CP receberam no mesmo período solução salina. O treinamento realizou-se (80° ao 136° DPN) em plataforma vibratória (Vibro Oscilatória triplanar, Arktus, 60 Hz, 2 mm de amplitude), por 10 minutos, três vezes/semana, durante oito semanas. Aos 142 DPN os animais foram mortos por saturação anestésica; os testículos foram coletados, pesados, imersos em líquido fixador e submetidos à rotina histológica para obtenção de secções de túbulos seminíferos transversais corados em hematoxilina/eosina. Análises morfométricas foram realizadas utilizando *software* Image Pro Plus e análises estatísticas utilizaram o *software* IBM SPSS 2.0 com o teste de ANOVA *one way* e post test de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com post test de Dunn para dados não paramétricos (5%). Não houve diferença no diâmetro tubular ( $p= 0,31$ ), porém a altura do epitélio seminífero apresentou-se diferente entre GC 50,38 x CP 48,23 ( $p= 0,47$ ) e, ainda, o CP 48,23 foi também diferente quando comparado ao OP 50,85 ( $p= 0,12$ ). Assim, pode-se concluir que o grupo submetido somente ao treinamento apresentou diminuição na altura do epitélio

seminífero.

**PALAVRAS-CHAVE:** lesão hipotalâmica, vibração corporal, via espermática.

## MORPHOLOGICAL STUDY OF THE TESTIS OF RATS WITH HYPOTHALAMIC OBESITY TREATED IN VIBRATORY PLATFORM

**ABSTRACT:** Obesity is associated with negative effects on male reproductive function. This study evaluated the effects of the hypothalamic obesity, by monosodium glutamate (MSG), and training (vibratory platform) on the seminiferous epithelium. In this study, 16 Wistar male rats were distributed in the groups: control (CG), platform control (PC), obese (OG) and platform obese (PO). The OG and PO groups were exposed to MSG, from birth to the 5th day of postnatal life (DPL), to induce obesity; while the CG and PC animals received saline solution in the same period. The training was performed (80° to 136° DPL) on a vibratory platform (Vibro Oscillatory triplanar, Arktus, 60 Hz, 2 mm amplitude), for 10 minutes, three times/week, for eight weeks. At 142 DPL the animals were killed by anesthetic saturation; the testis were collected, weighed, immersed in fixative fluid and submitted to histological routine to obtain sections of transverse seminiferous tubules stained in hematoxylin/eosin. Morphometric analyzes were performed using Image Pro Plus software and statistical analyzes using the IBM SPSS 2.0 software with the ANOVA one way test and Tukey's post test for parametric data and Kruskal-Wallis with Dunn's post test for non-parametric data (5%). There was no difference in the tubular diameter ( $p = 0.31$ ), but the height of the seminiferous epithelium was different between CG 50.38 x PC 48.23 ( $p = 0.47$ ) and also the PC 48.23 it was also different when compared to PO 50.85 ( $p = 0.12$ ). Thus, it can be concluded that the group submitted only to training showed a decrease in the height of the seminiferous epithelium.

**KEYWORDS:** hypothalamic lesion, body vibration, spermatic ducts.

## 1 | INTRODUÇÃO

A obesidade configura-se como um grave problema na sociedade atual, cuja prevalência aumenta em ritmo acelerado, atingindo pessoas de todas as idades (NUNES; GARRIDO, 2019). Além dos problemas psicossociais, a obesidade está relacionada a distúrbios metabólicos (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Também são comprovados os efeitos negativos da obesidade, inclusive a hipotalâmica, sobre a função reprodutiva em homens e em animais, como o comprometimento da fertilidade pela redução de espermatozoides funcionais (FERNANDES et al., 2012).

Diversas formas de tratamentos são indicados para pacientes obesos, entre eles, a mudança nos hábitos alimentares e a prática de exercícios físicos que somados são eficientes na diminuição do peso e dos riscos associados à obesidade (SWIFT et al., 2013; BEAVERS et al., 2014; ROSS et al., 2015). Um tipo de atividade fomentadora do gasto energético que tem sido utilizado é a vibração corporal, promovida por equipamentos que geram uma frequência de vibração, como a plataforma vibratória. Porém, não foi encontrado na literatura

estudos que façam referência à ação deste tratamento sobre o sistema genital masculino em indivíduos com obesidade hipotalâmica. Em virtude desta lacuna, justifica-se a realização deste trabalho.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais para a realização desta proposta foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unioeste. Durante todo procedimento experimental os animais foram mantidos no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Terapêuticos (Campus Cascavel, Unioeste), em temperatura ambiente de 22°C, fotoperíodo de 12 h e receberam água e ração *ad libitum*.

Para a realização do trabalho 16 ratos *Wistar* foram distribuídos nos grupos: Controle (GC), controle plataforma (CP), obeso (GO) e obeso plataforma (OP). A obesidade foi induzida nos grupos GO e OP com injeção intradérmica de glutamato monossódico (MSG) do 0° ao 5° dia pós-natal (DPN). Os animais GC e CP receberam injeção de salina (1,25 mg/g de peso corporal) em período similar.

O treinamento realizou-se do 80° ao 136° DPN em plataforma vibratória (Vibro Oscilatória triplanar, Arktus, 60 Hz, 2 mm de amplitude), por 10 minutos, três vezes por semana, durante oito semanas.

Aos 142 DPN os animais foram mortos por saturação anestésica e os testículos foram coletados, pesados e imersos em líquido fixador (fluido modificado de Davidson). Na rotina histológica a desidratação foi realizada em série ascendente de álcool etílico, a diafanização em álcool n-butílico e a inclusão e embocamento em parafina histológica para a obtenção de secção de túbulos seminíferos transversais (7µm) que foram coradas em hematoxilina/eosina. Para a análise da altura do epitélio seminífero e diâmetro do túbulo seminífero foram confeccionadas lâminas de 4 animais por grupo experimental.

As lâminas histológicas obtidas, a partir das técnicas descritas, foram analisadas quanto às características morfométricas da altura do epitélio seminífero e diâmetro do túbulo seminífero após serem fotodocumentadas (fotomicroscópio Olympus BX60) em objetiva de 20x. Foram fotomicrografados 30 túbulos seminíferos de cada animal, totalizando uma análise de 120 túbulos/grupo. As Análises morfométricas foram realizadas no software Image Pro Plus, e as análises estatísticas no IBM SPSS 2.0, com o teste de ANOVA *one way* e *post test* de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn para não paramétricos (5%).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises para a variável Ln\_EPI foi possível observar que existe diferença significativa  $p < 0,05$  em pelo menos um dos grupos quando comparado ao GC (*p value*:

0,01); o post test revelou que o grupo CP foi estatisticamente diferente do GC (*p value*: 0,47), com médias de altura de epitélio 48,23  $\mu\text{m}$  e 50,38  $\mu\text{m}$  respectivamente, e ainda, o OP foi também diferente quando comparado ao CP (*p value*: 0,01) sendo as médias 50,85  $\mu\text{m}$  e 48,23  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Dessa forma podemos concluir que o grupo que foi submetido somente à plataforma vibratória apresentou diminuição na altura do epitélio germinativo. As médias dos GC, OP e GO não diferiram (Tabela 1). A causa mais comum e importante de diminuição da fertilidade em machos é a degeneração do epitélio seminífero (CUNHA et al., 2015).

A análise da variável DIAM (Tabela 1) não indicou diferença entre os grupos (*p value*: 0,31). Apesar da tendência à diminuição do diâmetro tubular nos grupos CP, GO e OP, as análises estatísticas permitiram concluir que a obesidade e/ou o treino plataforma vibratória interferiram significativamente nesse parâmetro. Ou seja, embora haja correlações importantes entre o diâmetro e a atividade espermatogênica (SINHÁ-HIKIM et al., 1985), em nosso trabalho não houve significância nessa variável, dados que são concordantes com o trabalho de Takashiba et al. (2011), no qual também não foi possível observar alterações estatísticas no diâmetro dos túbulos seminíferos de ratos obesos por dieta de cafeteria e treinamento em esteira.

Grupo Variável	GC (n= 04)	CP (n= 04)	GO (n= 04)	OP (n= 04)
Epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ )	50,38 <sup>a</sup> (8,70)	48,23 <sup>b</sup> (7,83)	50,85 <sup>a</sup> (9,22)	50,39 <sup>ac</sup> (9,79)
Diâmetro do túbulo ( $\mu\text{m}$ )	271,50 <sup>a</sup> (244,11 – 306,41)	266,10 <sup>a</sup> (232,77 – 314,46)	265,52 <sup>a</sup> (241,19 – 302,29)	262,00 <sup>a</sup> (237,80 – 297,74)

ANOVA one way, seguido de post test de Tukey e significância de 5%. Média ( $\pm$ SD)

Kruskall-Wallis, post-test de Dunn. Dados expressos como mediana (25% - 75%).

Letras diferentes indicam diferença estatística  $p < 0,05$

GC: grupo controle; GO: grupo obeso; CP: grupo controle plataforma; OP: obeso plataforma;

Tabela 1 – Altura do epitélio seminífero e diâmetro de túbulos seminíferos.

A influência positiva ou negativa da prática de exercícios físicos ou treinamentos sobre disfunção testicular decorrente de causas como a obesidade, ainda, é controversa (MATOS et al., 2019). Vários estudos apontaram correlação positiva entre exercícios de intensidade moderada e parâmetros da função testicular; enquanto outros estudos indicaram que exercícios moderados não exerceram nenhuma influência ou exerceram influência negativa (MATOS et al., 2019). No caso de relação negativa, inferiu-se que o tipo de exercício, como por exemplo o ciclismo, em humanos, pode exercer pressão sobre os testículos, prejudicando sua função. Uma explicação, em termos fisiológicos em modelos animais, como treinamento de ratos em esteira, seria a diminuição do suprimento de oxigênio para o testículo com conseqüente disfunção vascular (MATOS et al., 2019). Pode-se inferir para o nosso resultado de altura de epitélio do grupo CP, um mecanismo semelhante. Uma hipótese que pode ser lançada para a ausência de diferenças é o tipo de exercício; utilizado, neste estudo, que não pode ser considerado com atividade aeróbica. Ratos com obesidade hipotalâmica submetidos a

exercício aeróbico, natação com carga, tiveram melhora da hiperinsulinemia (SOUZA et al., 2003).

## 4 | CONCLUSÕES

Nesse estudo, apesar do grupo submetido somente à plataforma vibratória apresentar diminuição na altura do epitélio germinativo, não podemos constatar que o exercício em plataforma vibratória tenha causado alterações nos parâmetros reprodutivos de ratos obesos. Mais estudos são necessários para estabelecer melhores condutas terapêuticas para esse parâmetro.

## REFERÊNCIAS

- BEAVERS, K. M. et al. **Effect of an 18 month physical activity and weight loss intervention on body composition in overweight and obese older adults.** *Obesity*, v. 22, n. 2, p 325–331, 2014.
- CUNHA, M. S. et al. **Degeneração Testicular em machos: dos animais ao homem.** *Revista Investigação*, v. 14, n. 6, p. 54-61, 2015.
- FERNANDES, G. S. A. et al. **Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 10, n. 1, p. 105, 2012.
- MATOS, B. et al. **Exploring the effect of exercise training on testicular function.** *European Journal of Applied Physiology*, v. 119, n. 1 p. 1-8, 2019.
- NUNES, M. L; GARRIDO, M. P. **A obesidade e a ação dos prebióticos, probióticos e simbióticos na microbiota intestinal.** *Nutrição Brasil*, v. 17, n. 3, p. 189-196, 2019.
- ROSS, R. et al. **Effects of Exercise Amount and Intensity on Abdominal Obesity and Glucose Tolerance in Obese Adults.** *Annals of Internal Medicine*, v. 162, n. 5, p. 325–334, 2015.
- SINHA-HIKIN, A. P. et al. **Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster teste sin active and inative states of spermatogeneses.** *Endocrinology*, v.125, n. 4, p.1829-1843, 1989.
- SOUZA, C. T. **Insulin secretion in monosodium glutamate (MSG) obese rats submitted to aerobic exercise training.** *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, v. 35, n. 1, p. 43-53, 2003.
- SWIFT, D. L. et al. **The Role of Exercise and Physical Activity in Weight Loss and Maintenance.** *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 56, n. 4, p. 441-447, 2014.
- TAKASHIBA, K. S. et al. **Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico.** *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2011.
- VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. **Disfunção hipotalâmica na obesidade.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 56, n. 6, p. 341-350, 2012.

## ESTUDO MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO EM PLACENTAS DE RATAS COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 18/06/2020

### **Raquel de Mendonça Rosa-Castro**

Universidade de Sorocaba – UNISO

Departamento Anatomia Humana

Sorocaba – SP

<http://lattes.cnpq.br/9338015681947547>

### **Izadora Renosto**

Universidade de Sorocaba – UNISO

Curso Biomedicina

Sorocaba – SP

<http://lattes.cnpq.br/4427655400774023>

### **Euro Marques Junior**

Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho –

Unesp

Departamento Engenharia de Produção

Bauru – SP

<http://lattes.cnpq.br/4343279772210768>

**RESUMO:** O diabetes mellitus gestacional é conceituado como aquele que é diagnosticado pela primeira vez durante o período gestacional e que pode, ou não, persistir após o parto. Filhos de mães com diabetes gestacional não tratado têm maior risco de morte intrauterina, problemas cardíacos e respiratórios, icterícia e episódios de hipoglicemia após o parto. Portanto, o objetivo deste estudo foi empregar

a técnica de estereologia a fim de avaliar quantitativa e qualitativamente a densidade de Células da Hofbauer e as Células da Decídua Basal das placentas de animais com Diabetes Mellitus Gestacional – indução com Estreptozotocina (DMG-SZT), tratados com *Lentinula edodes* (cogumelo comestível). Foram realizadas avaliações das placentas, em cortes histológicos corados com H.E., empregando-se a técnica de estereologia de tecidos moles após a indução do diabetes gestacional com a estreptozotocina (dose única de 40 mg/kg. IP). Com a estereologia tivemos os seguintes resultados: A densidade de volume das células de Hofbauer: Vv(H) diminuiu nos três Grupos diabéticos, comparados com o Grupo I (controle). A Densidade de volume das Células da Decídua Basal Vv(db), permaneceu com porcentagens semelhantes em todos os grupos. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Nossos resultados sugerem que o cogumelo não protegeu as células de Hofbauer dos efeitos tóxicos da STZ, diferentemente das células da decídua basal, que na presença do efeito do *Lentinula edodes*, os grupos que foram induzidos a diabetes foram protegidos, ficando equiparados com o controle negativo. A morfometria e a estereologia, são ferramentas a fim de quantificar resultados, que mesmo não sendo significativos estatisticamente, sugerem

uma alteração em células com potencial de proteção ao desenvolvimento fetal. Desta maneira o estudo sugere que o diabetes gestacional pode causar lesões ou mesmo interferir no desenvolvimento fetal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes Mellitus Gestacional. Estereologia. Placenta. *Lentinula edodes*. Streptozotocina.

## MORPHOMETRIC AND STEREOLOGICAL STUDY IN RAT PLACENTS WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

**ABSTRACT:** Gestational diabetes mellitus is defined as one that is diagnosed for the first time during pregnancy and that may, or may not, persist after delivery. Children of mothers with untreated gestational diabetes have a higher risk of intrauterine death, heart and breathing problems, jaundice and episodes of hypoglycemia after delivery. Therefore, the objective of this study was to employ stereology technique in order to quantitatively and qualitatively assess the density of Hofbauer Cells and the Basal Deciduous Cells of animals with Gestational Diabetes Mellitus - induction with Streptozotocin (DMG-SZT), treated with *Lentinula edodes* (edible mushroom). Placental evaluations were performed in histological sections stained with H.E., using the soft tissue stereology technique after the induction of gestational diabetes with streptozotocin (single dose of 40 mg / kg. IP). With stereology we had the following results: The volume density of Hofbauer cells:  $V_v(H)$  decreased in the three diabetic groups, compared with Group I (control). The volume density of the cells of the Basal Deciduous  $V_v(db)$ , remained with similar percentages in all groups. These differences were not statistically significant ( $p < 0.001$ ). Our results suggest that the mushroom did not protect the Hofbauer cells from the toxic effects of STZ, unlike the cells of the basal decidua, which in the presence of the effect of *Lentinula edodes*, the groups that were induced to diabetes were protected, being equated with the negative control. Morphometry and stereology are tools in order to quantify results, which, although not statistically significant, suggest an alteration in cells with potential to protect fetal development. Thus, the study suggests that gestational diabetes can cause injuries or even interfere with fetal development.

**KEYWORDS:** Gestational Diabetes Mellitus. Stereology. Placenta. *Lentinula edodes*. Streptozotocin.

## 1 | INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença mundial, crônico-degenerativa que envolve alterações metabólicas. Dados da OMS preveem um aumento do número de diabéticos de 171 milhões no ano de 2000, para 336 milhões em 2030 (GALINDO et al., 2006, WILD et al., 2004). Além dos transtornos individuais decorrentes desta patologia, a DM acarreta um grande impacto para a economia dos países, conseqüentes das complicações crônicas decorrentes de sua evolução. Estas complicações crônicas se expressam por: nefropatias, retinopatias, neuropatias, eventos cardiovasculares e cerebrovasculares (GROSS et al., 2005). Dentre as diversas manifestações do DM, a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), é

uma das principais alterações metabólicas que pode acometer as gestantes, sendo a mais preocupante. Trata-se de um problema global de saúde e tem gerado elevado número de mortes prematuras de gestantes e de conceptos. No Brasil, a prevalência de DMG é de 7,6%, sendo considerado na última década, pelo Ministério da Saúde, como um problema de saúde pública (BRASIL, 2001).

Por recomendação da *International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups* (IADPSG, 2010) o rastreamento das desordens glicêmicas na gestação deve ser realizado, para todas as mulheres, diagnosticadas ou não com diabetes pré-gestacional. O diabetes gestacional é geralmente diagnosticado durante a metade do segundo mês de gestação, podendo interferir no crescimento do feto. O recém-nascido de uma mulher com diabetes corre o risco de anoxia, prematuridade, infecção, desconforto respiratório, hipoglicemia grave, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, polidrâmnio, macrosomia, policitemia e óbito fetal (FETITA et al., 2006; KENNER, 2001).

O acompanhamento de gestantes com DMG inclui o controle metabólico mediante o ajuste dos três pilares terapêuticos: dieta, exercício físico e insulina (WHO; 2013); sendo que a insulina de uma maneira geral, só é introduzida quando a dieta e os exercícios não levam a um controle metabólico (AQUINO, 2003). A terapia nutricional é a primeira opção de tratamento para a maioria das gestantes DMG (METZGER et al., 2007; READER, 2007).

As gestantes que realizam uma restrição calórica apresentam melhor controle glicêmico pós-prandial, menor necessidade de adição de insulina, menor incidência de macrosomia fetal e de cesariana (MOSES et al., 2009). Entretanto, é importante a manutenção da oferta protéica, tanto para o crescimento fetal adequado, quanto para garantir o aumento da produção de insulina necessário na gestação (ERICKSSON, SWEENE, 1993; JOVANOVIC-PETERSON et al., 1990). Os carboidratos complexos e com baixo índice glicêmico – massas, pães integrais e cereais com alto teor de fibras – devem ser priorizados (MOSES et al., 2009; READER, 2007).

Os efeitos antidiabéticos de cogumelos como o *Lentinula edodes*, que o coloca em destaque quanto aos valores nutricionais, estão relacionados aos seus teores de compostos fenólicos e de glucanas (TENG et al., 2012; FIRENZUOLI et al., 2008), embora esta espécie contenham uma variedade de outras moléculas bioativas, tais como: nucleotídeos, ácidos graxos, glicoproteínas, esteróis, proteínas, peptídeos, vitamina C, vitamina B12, vitamina D, e além de serem ricas fontes de folatos (BATRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2008).

Estudos *in vivo* com indução de DM por estreptozotocina (DM-STZ) em ratos, mostraram que os compostos fenólicos presentes no *Lentinula edodes* são inibidores naturais da  $\alpha$ -amilase, da  $\alpha$ -glucosidase e da aldose-redutase e, quando administrados no período pós-prandial, diminuem a liberação de glicose do amido e retardam a absorção de hidratos de carbono no intestino delgado (MA et al., 2015). As  $\beta$ -glucanas presentes no *Lentinula edodes* agem reparando as lesões em células  $\beta$ -pancreáticas induzidas pela exposição à STZ, promovendo o aumento na síntese de insulina e a diminuição dos níveis plasmáticos de glicose (MA et al., 2015; YANG et al., 2010; NIWA et al., 2011; RAHAR et al., 2011; KIM et al., 2005).

Este projeto fundamenta-se no valor incremental das técnicas atualmente utilizadas para análises realizadas nos estudos da toxicologia da reprodução com produtos naturais no Laboratório Lapetox-Uniso, e busca identificar as alterações teciduais que a estreptozotocina (STZ) pode induzir nas ratas gestantes e ou nos seus conceptos, bem como, definir as propriedades funcionais do *Lentinula edodes*, no DMG-SZT. Dessa forma, as técnicas que serão desenvolvidas e aplicadas neste projeto, servirão para auxiliar na identificação do potencial deste cogumelo quando da sua utilização em terapia alimentar complementar para o controle do DMG.

O cogumelo *Lentinula edodes*, quando utilizado separadamente e em baixas doses, podem ser uma opção eficaz, como alimentos funcionais, no tratamento do Diabetes Mellitus Gestacional Moderada induzida por estreptozotocina (DMG-STZ), considerando-se os principais mecanismos envolvidos na sua atividade antidiabética. A estereologia das placentas destes animais podem demonstrar se existe eficácia ou não deste alimento.

O tecido placentário consiste no estabelecimento de trocas de nutrientes e gases entre a mãe e o feto. Segundo Cross, 2006, a placenta é formada pelas vilosidades coriônicas que envolve o feto durante toda a gestação e pelo endométrio materno. Nesta região estão presentes as células Hofbauer e muitos vasos fetais.

As células de Hofbauer são conhecidas como macrófagos placentários e desempenham um papel central no desenvolvimento e manutenção da placenta, devido secretarem citocinas importantes para o crescimento e diferenciação do trofoblasto. KHAN, et al. 2000; WOOD, 1980.

A camada de células da Decídua Basal é um componente materno e se relaciona diretamente com as vilosidades coriônicas, região onde ocorre a maioria das trocas entre a mãe e o feto. GUDE, et al. 2004; HUNT, 2006

A interface útero-placenta é responsável pela separação do sangue da mãe e do concepto. Sua ação consiste em uma barreira protetora, agindo como isolante para proteger o embrião de substâncias tóxicas e micro-organismos infecciosos presentes no sangue periférico materno. Em contra partida, essa barreira permite a migração de nutrientes essenciais para o desenvolvimento fetal.

## 2 | OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar qualitativa e quantitativamente o grau de lesão tecidual induzida pela estreptozotocina em placentas de ratas prenhes, quando tratadas com uma espécie de cogumelo comestível – *Letinula edodes*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento, implantação e padronização da metodologia de estereologia para avaliação da placenta;

- Avaliação volumétrica tecidual;
- Comparação volumétrica e de proliferação celular como parâmetros analíticos para avaliação toxicológica qualitativa.

### 3 | MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo com ensaios histológicos onde os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Sorocaba - Protocolo 089/2016.

Foram utilizados métodos seguindo os procedimentos de (1) ensaios biológicos; (2) análise morfométrica das placentas; (3) análise histológica da placenta; (4) análise estereológica da densidade de volume das placentas.

#### 3.1 Ensaios biológicos

As placentas utilizadas são provenientes de ratas Wistar DMG-STZ (Diabetes Mellitus Gestacional induzida por STZ), onde os animais prenhes receberam o seguinte tratamento: Grupo I (n = 6): controle negativo - solução salina; Grupo II (n = 6): controle positivo - STZ e solução salina; Grupo III (n = 6): 1o dia - *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia); Grupo IV (n = 6) no 8o dia STZ e *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia). No vigésimo dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com quetamina (anestésico geral na dose de 100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (relaxante muscular na dose de 6 mg/kg), via IP. Os tecidos maternos de placentas foram fixados em formalina a 10% e encaminhados para rotina histológica de H/E.

#### 3.2 Análise morfométrica das placentas

As placentas após fixação, foram pesadas em balança (Ohaus® -AS200S) e foram realizadas as seguintes medidas em mm: antero-posterior, latero-lateral e longitudinal. Para esta análise utilizamos lâminas preparadas histologicamente em corte seriado e randomizados.

#### 3.3 Avaliação histológica

Após fixação e pesagem, as placentas foram emblocadas em parafina e submetidas a cortes de 5 mm, assim foram escolhidos cortes, e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (TOLOSA et al., 2003). A coloração do H.E. foi escolhida, pois é uma coloração básica e de modo geral, coram estruturas basófilas – como núcleos, matriz extracelular e ergastoplasma. E as proteínas são coradas pelos ácidos, como – citosol e as mitocôndrias. Isto facilita a identificação das estruturas.

As lâminas dos respectivos grupos foram analisadas e comparadas. Em seguida foram capturadas imagens, utilizando a objetiva 40x, com um sistema composto por um Microscópio Invertido, ZEISS®, Modelo Axio Vert.A1 FL e com Câmera Digital Científica Colorida, ZEISS®, Modelo AxioCam Icc 5 e o Software “Zen Pro 2011”, ZEISS®.

### 3.4 Análise Estereológica da Densidade de volume das placentas

Para este estudo foram analisadas as Células de Hofbauer (macrófagos placentários) e a Células da Decidua Basal.

A técnica de estereologia foi utilizada, com base no Princípio de Cavalieri (GUNDERSEN and JENSEN, 1987), em que se demonstra que o volume pode ser determinado em uma estrutura seccionada em série pelo produto das áreas das fatias e pela espessura da fatia. Um a cada três cortes histológicos foi fotografado usando a objetiva 4x, de maneira tal que a distância entre cada corte analisado era de  $150 \mu\text{m}$ .

Para captação da imagem foi utilizado um sistema composto por um Microscópio Invertido, ZEISS®, Modelo Axio Vert.A1 FL e com Câmera Digital Científica Colorida, ZEISS®, Modelo AxioCam Icc 5 e o Software “Zen Pro 2011”, ZEISS®.

Segundo Lacerda (2000), um sistema-teste é um conjunto de linhas (retas ou curvas) e pontos. Esse deve ser superposto à imagem morfológica para a contagem estereológica. Podem-se construir sistemas-teste com arranjo regular ou não. Existem diversos sistemas propostos para variados fins, mas tradicionalmente são desenhados com retas, ou segmentos de reta, apresentando os arranjos geométricos triangular, quadrado ou hexagonal. A figura a seguir mostra o sistema-teste denominado M 42, o qual foi utilizado para fazer a análise estereológica das placentas.

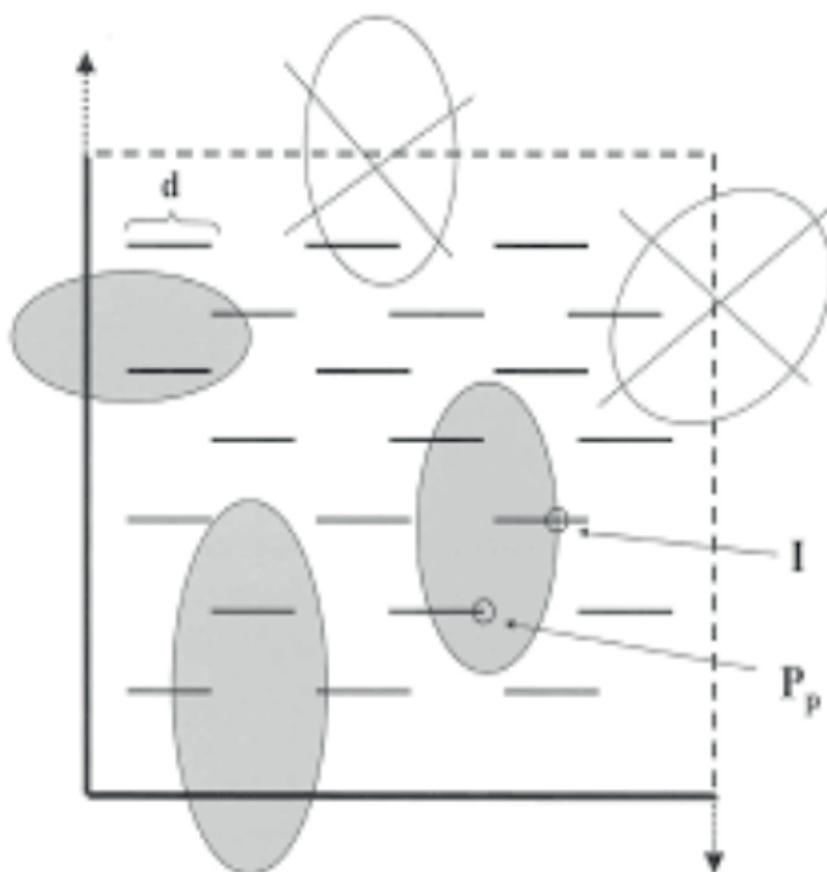


Figura 1: Desenho esquemático do sistema-teste M 42 sobreposto a 5 estruturas. As estruturas que cruzam a “linha proibida” (tracejada) não são consideradas.

A lei básica da estereologia informa que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável à quantidade de área dessa estrutura contida na área-teste. Então, pode-se determinar a densidade do volume (Vv) da seguinte maneira:

$$Vv = \frac{Pp}{Pt}$$

sendo Pp os pontos que tocam as células e Pt o número total de pontos-teste do sistema-teste. Esta foi a fórmula utilizada para estimar a Densidade de volume (%), das Células de Hofbauer e também das Células da Decídua.

### 3.5 Análise estatística

Para análise dos resultados foi utilizado o nível de significância entre 1 e 5%. Utilizou-se a Análise de Variância One-Way (ANOVA) que determina se as médias dos grupos estudados são diferente significativamente.

## 4 | RESULTADOS

Os resultados da avaliação histológicas estão apresentados nas seguintes imagens:

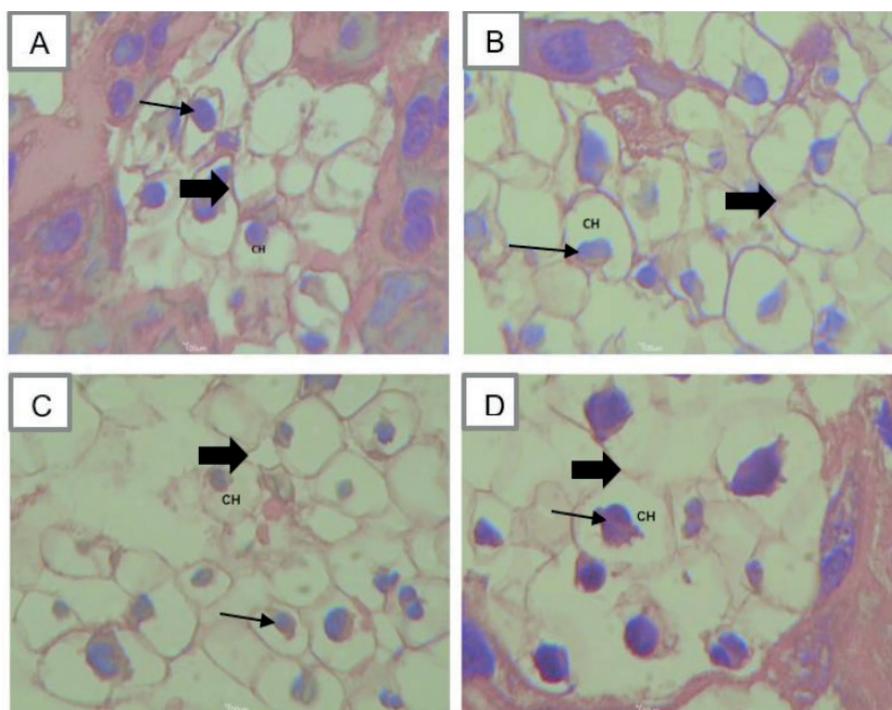


Figura 2: Fotomicrografia de cortes placenta de rata Wistar com 19 dias de gestação, no aumento de 400x: (A) Grupo I - controle negativo: apresenta células de Hofbauer normais (CH), sendo distinguidas pelo seu maior volume, forma esferoidal e citoplasma muitas vezes vacuolado, com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta); (B) Grupo II – controle positivo: apresenta aumento do número e volume, em aproximadamente 20% das células de Hofbauer (CH), com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta); (C) Grupo III- 1º dia estreptozotocina e Lentinula edodes: apresenta aumento do volume, em aproximadamente 17% das células de Hofbauer (CH), com núcleos corados (seta fina), com presença de lacunas intersticiais (seta); (D) Grupo IV - 8º dia estreptozotocina e Lentinula edodes: apresenta aumento do volume, em aproximadamente 31%, das células de Hofbauer (CH), com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta).

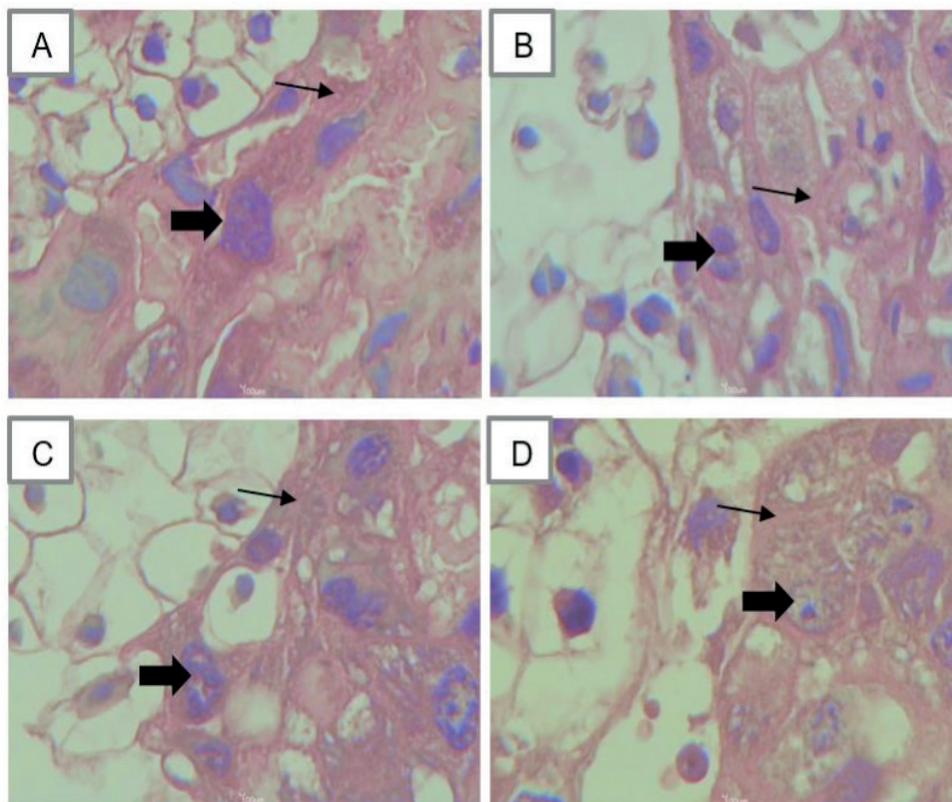


Figura 3: Fotomicrografia da decídua, formada a partir da camada do endométrio, no aumento de 400x: (A) Grupo I: presença de células decíduais (seta), núcleos corados e membrana citoplasmática preservada (seta fina); (B) Grupo II: presença de células decíduais (seta), núcleos corados e membrana citoplasmática preservada (seta fina); (C) Grupo III: presença de células decíduais com discretas vacuolizações (seta) e membrana citoplasmática preservada (seta fina); (D) Grupo IV: presença de células decíduais com vacuolizações (seta) e membrana citoplasmática preservada (seta fina).

Por meio da análise morfométrica das placentas, do Grupo I: controle negativo - solução salina; Grupo II: controle positivo - STZ e solução salina; Grupo III: 1º dia - *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia); Grupo IV: 8º dia STZ e *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia), demonstrado na tabela 1, observou-se um aumento no peso dos grupos II e III em comparação aos grupos I e IV, que não foi significativo para  $p < 0,001$ .

Grupo	Média + Desvio Padrão
I	0,2600 + 0,04561 <sup>a</sup>
II	0,3167 + 0,06653 <sup>a</sup>
III	0,2917 + 0,08256 <sup>a</sup>
IV	0,2617 + 0,02787 <sup>a</sup>
Total	0,2825 + 0,06031 <sup>a</sup>

Nota: Grupo I (0,9% solução salina); Grupo II (STZ e solução salina); Grupo III (1º dia – *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia); Grupo IV (8º dia STZ e *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia). Médias (g) seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste da Análise de Variância Unidirecional (ANOVA),  $p < 0,001$ .

Tabela 1 – Peso das placentas

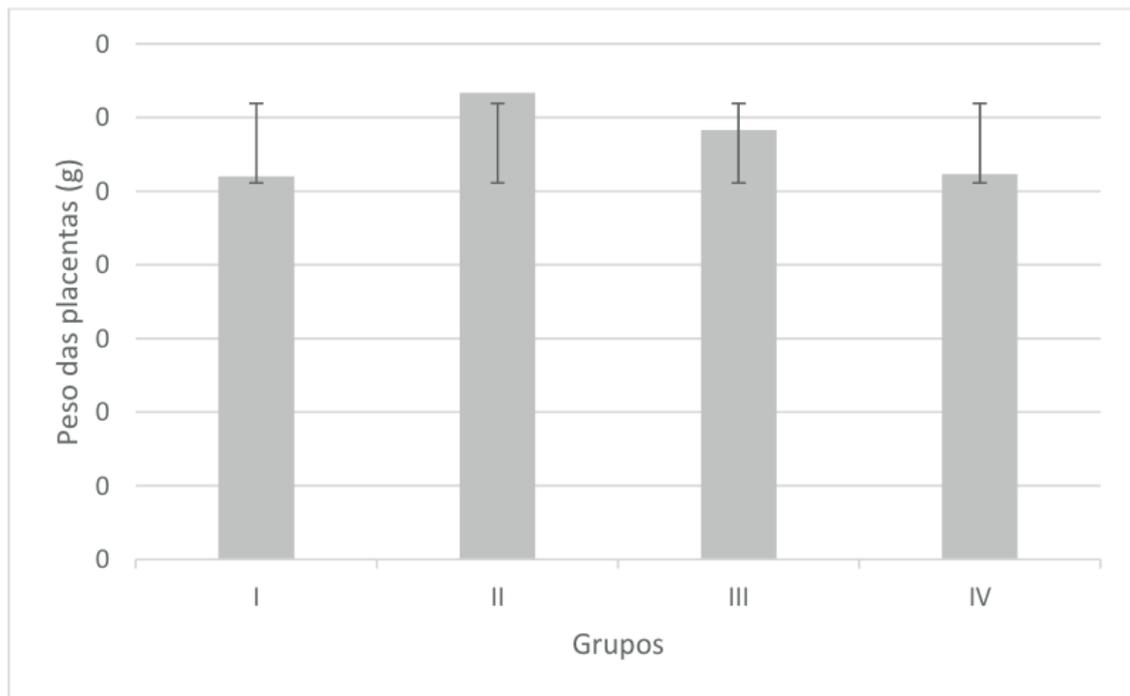


Gráfico 1: Peso das placentas

Nota: Grupo I (0,9% solução salina); Grupo II (STZ e solução salina); Grupo III (1º dia – *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia); Grupo IV (8º dia STZ e *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia).

Por meio da estereologia, realizamos estudos da Densidade de Volume das Células de Hofbauer (Tabela 2 e Gráfico 2) e das Células Decídua Basal (Tabela 3 e Gráfico 2).

CÉLULAS DE HOFBAUER				
Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	19	7	12	14
2	17	9	8	10
3	20	7	9	6
4	17	16	12	9
5	14	18	10	15
6	11	15	11	7
<b>Vv (%)=</b>	0,39	0,28	0,24	0,24

Nota: para cada animal foram analisados 3 cortes alternados e processados histologicamente, para quantificação morfológica por meio do Sistema-teste M 42, envolvendo a estereologia.

Tabela 2: Densidade de Volume das células de Hofbauer

DECÍDUA BASAL				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	12	15	5	8
2	10	12	11	5
3	7	14	9	11
4	12	10	4	12
5	6	12	9	9
6	12	14	10	5

<b>Vv (%)=</b>	0,23	0,3	0,19	0,2
----------------	------	-----	------	-----

Nota: para cada animal foram analisados 3 cortes alternados processados histologicamente, para quantificação morfológica por meio do Sistema-teste M 42, envolvendo a estereologia.

Tabela 3: Densidade de Volume das Células Decídua Basal

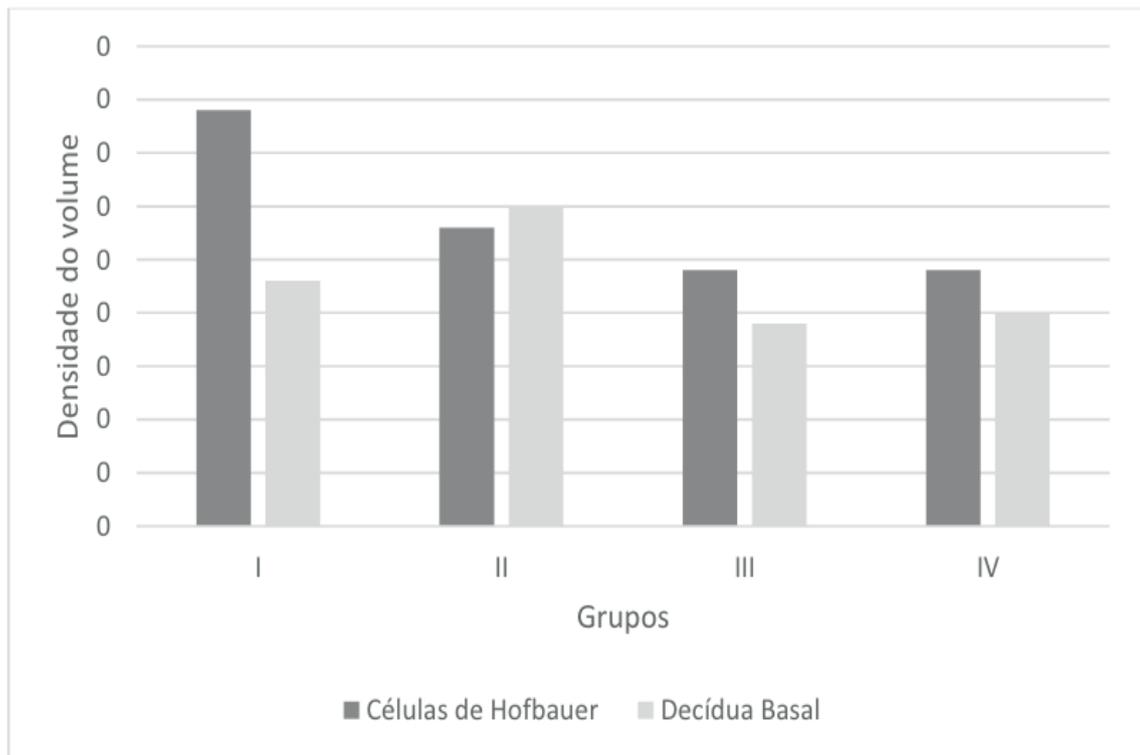


Gráfico 2: Comparação da Densidade de Volume das Células de Hofbauer e das Células Decídua basal

Nota: Grupo I (0,9% solução salina); Grupo II (STZ e solução salina); Grupo III (1º dia – *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia); Grupo IV (8º dia STZ e *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia).

No gráfico 2, as colunas foram divididas de acordo com os respectivos grupos: Grupo I: controle negativo - solução salina; Grupo II: controle positivo - STZ e solução salina; Grupo III: 1º dia - *Lentinula edodes*; Grupo IV no 8º dia STZ e *Lentinula edodes*. Observou-se que o controle positivo apresentou um aumento da Densidade de volume das células de Hofbauer, e uma diminuição nos grupos II, III e IV, considerados grupos com mães diabéticas. Enquanto as células da Decídua Basal apresentou um aumento discreto no Grupo II.

Os estudos estatísticos comprovaram que as alterações observadas nas células de Hofbauer e da camada basal não foram significantes para  $p < 0,001$ .

Para análise dos resultados obtidos pela morfometria da placenta, foi utilizado a Análise de Variância One-Way ANOVA, com nível de significância  $p < 0,001$ , para testar a hipótese de que as médias de dois ou mais grupos não são significativamente diferentes.

## 5 | DISCUSSÃO

A placenta é considerada um órgão bastante importante para avaliação da toxicidade de riscos para as mães e fetos, cuja função principal é de atuar como interface entre eles. (FURUKAWA et al, 2014). O crescimento e a função da placenta desempenham papel importante na manutenção da gravidez, influenciando o desenvolvimento e crescimento fetal (FURUKAWA et al., 2013).

Placentas de animais utilizados em estudos experimentais possuem diferentes tipos, em específico as placentas de ratas apresentam formato discoide e hemotricorial quanto a sua estrutura histológica (SOARES et al., 2012; FURUKAWA et al., 2013). Estas placentas são compostas por regiões: Zona do labirinto – composta por três camadas de células trofoblásticas; Zona Basal – composta pelas células espongiotrofoblastos, células trofoblásticas gigantes e células de glicogênio; Decídua – composta por células mesométricas que desempenham papel importante no desenvolvimento da vascularização da interface decídua-placenta; Glândula Metrial – formada por células decidualizadas do estroma, células NK uterinas, trofoblastos originados de células de glicogênio, fibroblasto e artérias espiraladas. (ENDERS; CARTER, 2006; SOARES et al, 2012; FURUKAWA et al, 2013)

Em nossos estudos, os resultados referentes as células de Hofbauer nos grupos II, III e IV demonstram redução no volume comparados ao grupo controle. Esta redução pode-se sugerir um mecanismo compensatório na tentativa de garantir as principais trocas entre as mães e os fetos, inclusive o suprimento nutricional ao feto em seu desenvolvimento (CALDERON et al., 1999).

Segundo Khan et al. (2000), as células de Hofbauer são conhecidas como macrófagos fetais e estão presentes predominantemente no estroma das vilosidades coriônicas da placenta durante toda a gestação.

Desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção da placenta, que são capazes de secretar citocinas para crescimento e diferenciação do trofoblasto. Como a redução é maior nos grupos que receberam o cogumelo *Lentinula edodes* administrados antes e depois do diabetes, os dados sugerem que o cogumelo não protege as células dos efeitos tóxicos da STZ (estreptozotocina).

Diferentemente das células da decídua que na presença do efeito do *Lentinula edodes*, nos grupos tratados antes e depois do estabelecimento do diabetes, protegeu este grupo de células, ficando equiparados com o controle negativo. (BROLIO et al., 2010).

Na análise estatística dos resultados obtidos na morfometria, o valor de significância do teste F na tabela ANOVA deve ser menor que 0,001 para indicar que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias das amostras. Assim, como os valores são maiores que 0,001, mesmo tendo aumentado o volume das placentas, não foi significativo entre os grupos. O mesmo aconteceu as medidas das células deciduais e das células de Hofbauer. Apesar de haver diferenças entre as médias, elas não são estatisticamente significativas.

Estudos complementares poderão auxiliar em uma melhor compreensão dos resultados

sobre os estudos com administração de suplementação com cogumelos.

## 6 | CONCLUSÃO

Com a análise e a interpretação histológica, o *Lentinula edodes* não caracterizou uma proteção à placenta, que desempenha papel importante para o desenvolvimento do feto.

A morfometria e a estereologia, são ferramentas a fim de quantificar resultados, que mesmo não sendo significativo estatisticamente, sugere uma alteração em células com potencial de proteção ao desenvolvimento fetal. Desta maneira sugerimos que o diabetes gestacional pode causar lesões ou mesmo interferir no desenvolvimento fetal.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M.T.A.; ZIED, D .C. **Avaliação nutricional do cogumelo shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em função da linhagem e do tipo de eucalipto cultivado.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 4, p. 916-921, 2008.

AQUINO, M. M. A.; PEREIRA, B. G.; AMARAL, E.; PARPINELLI, M. A.; PASSINI JR, R. **Reverso diabetes e gravidez.** Revista Ciência Médica, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2003.

BATRA, P.; SHARMA, A. K.; KHAJURIA, R. **Probing lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits.** International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 15, p. 127–143, 2013.

BRASIL. **Plano de Reorganização da atenção básica a hipertensão arterial e ao diabetes mellitus.** Secretaria de Políticas de saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Ministério da Saúde. Brasília, DF; 2001.

BROLIO, M. P. et al., **A barreira placentária e sua função de transferência nutricional.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.34, p. 222-32, 2010.

CALDERON, M. O et al. **Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas e relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intrauterino.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 21, n. 5, p. 91-8, 1999.

CROSS J.C. **Placental function in development and disease.** Reprod Fertil Dev v.18, p. 71-6, 2006.

ENDERS, A.; CARTER, A. **Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition – a review.** Placenta, v. 27, p. 11-16, 2006.

ERICKSSON, U. J.; SWEENE, I. **Diabetes in pregnancy: fetal macrosomia, hyperinsulinism, and islet hyperplasia in the offspring of rats subjected to temporary protein-energy malnutrition early in life.** Pediatric Reserch 1993; 34:791-795.

FETITA, L. S.; SOBNGWI, E.; SERRADAS, P.; CALVO, F.; GAUTIER, J. F. **Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring.** The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, v. 91, n 10, p. 3714-3724, 2006.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. **The medicinal mushroom *Agaricus blazei murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2008.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A. **Comparison of the histological structure of the placenta in the experimental animals.** Journal of Toxicology Pathology, v. 27, n. 5, p. 11-18, 2014.

FURUKAWA, S. et al. **Background data on developmental parameters during the gestation period in rats.** Journal of toxicologic pathology, v. 26, n. 1, p. 83-88, 2013.

GALINDO, V.; CAVALCANTI, N.; LYRA, R. **Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono.** In: Lyra R, Cavalcanti N, coordenação. Diabetes mellitus. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2006.

GROSS, J. L.; DE AZEVEDO, M. J.; SILVEIRO, S. P.; CANANI, L. H.; CARAMORI, M. L.; ZELMANOVITZ, T. **Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment.** Diabetes Care, v. 28, n. 1, p. 164-76, 2005.

GUDE N.M., ROBERTS C.T., KALIONIS B., KING R.G. **Growth and function of the normal human Placenta.** Thromb Res v. 114, p. 397-407, 2004.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. **The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction\*.** Journal Of Microscopy, [s.l.], v. 147, n. 3, p.229-263, 1987.

HUNT J. S. **Stranger in a strange land.** Immunol Rev, v. 213, p. 36-47, 2006.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DIABETES AND PREGNANCY STUDY GROUPS CONSENSUS PANEL et al. **International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy.** Diabetes care, v. 33, n. 3, p. 676-682, 2010.

JOVANOVIC-PETERSON, L.; PETERSON, C. M.; **Dietary manipulation as a primary treatment strategy for pregnancies complicated by diabetes.** Journal of the American College of Nutrition, v. 9, n. 4, p. 320-325, 1990.

KHAN, S. et al. **Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro.** Biology of reproduction, v. 62, n. 4, p. 1075-1083, 2000.

KENNER, C. **Enfermagem neonatal.** Reichmann & Affonso Editores, 2001.

KIM, Y. W. et al. **Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from Agaricus blazei.** Biotechnology letters, v. 27, n. 7, p. 483-487, 2005.

LACERDA, C. A. M. **Fisiologia e Fisiopatologia: Estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo.** Jornal Brasileiro de Nefrologia, v. 22, n. 2, p. 103-9, 2000.

MA, H. T.; HSIEH, J. F.; CHEN, S. T. **Anti-diabetic effects of Ganoderma lucidum.** Phytochemistry, v. 114, p. 109-113, 2015.

METZGER, B. E.; BUCHANAN, T. A.; COUSTAN, D. R.; LEIVA, A.; DUNGER, D. B.; HADDEN, D. R. **Summary and recommendations of the fifth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus.** Diabetes Care, v. 30, n. 2, p. 251-60, 2007.

MOSES, R. G.; BARKER, M.; WINTER, M.; PETOCZ, P.; BRAND-MILLER, J. C. **Gestational diabetes: can a low glycemic index diet reduce the need for insulin? A randomized trial.** Diabetes Care, v. 32, p. 996-1000, 2009.

NIWA, A.; TAJIRI, T.; HIGASHINO, H. **Ipomoea batatas and Agarics blazei ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potential in streptozotocin-induced diabetic rats.** Journal of clinical biochemistry and nutrition, v. 48, n. 3, p. 194-202, 2011.

RAHAR, S. et al. **Preparation, characterization, and biological properties of  $\beta$ -glucans.** Journal of advanced pharmaceutical technology & research, v. 2, n. 2, p. 94-103, 2011.

READER, D. M. **Medical nutrition therapy and lifestyle interventions.** Diabetes Care, v. 30, n. 2, p.188-93, 2007.

SOARES, M. J. et al. **Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface.** Placenta, v. 33, n. 4, p. 233-243, 2012.

TENG, B. S.; WANG, C. D.; ZHANG, D.; WU, J. S.; PAN, D.; PAN, L. F.; YANG, H. J.; ZHOU, P. **Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v. 16, p. 166–175, 2012.

TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G.; BEHMER, A. O.; RODRIGUES, C. J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** Manole. 2ed. São Paulo p. 331, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** Diabetes Care, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WOOD G.W. **Mononuclear phagocytes in the human placenta.** Placenta, v. 1, n. 2 p.113-123, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy.** Geneva, WHO, 2013.

YANG, Q.; WANG, S.; XIE, Y.; SUN, J.; WANG, J. **HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression.** International journal of biological macromolecules, v. 46, n. 2, p. 167-172, 2010.

## RELAÇÃO ENTRE AGROTÓXICOS E CÂNCER: UMA ANÁLISE DO GLIFOSATO

Data de aceite: 18/06/2020

### Júlio César Silva de Souza

Centro Universitário do Vale do Ipojuca, UNIFAVIP  
/ Wyden  
Caruaru- PE

E-mail: julioww00@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/1414063468275492>

### Tatianny de Assis Freitas Souza

Centro Universitário do Vale do Ipojuca, UNIFAVIP  
/ Wyden  
Caruaru- PE

E-mail: tatianny.souza@unifavip.edu.br

<http://lattes.cnpq.br/8829756785242359>

**RESUMO:** No Brasil, a utilização de agrotóxicos vem aumentando a cada ano, refletindo a maioria do sistema de agrícola do país ser convencional, levando ao uso intenso desses produtos. Com o crescente uso, muitos agricultores, sem acesso adequado das informações, não fazem ideia dos riscos de contaminação, tanto ao homem como ao meio ambiental. Logo, essa pesquisa tem como o objetivo central, que vai além do debate sobre os agrotóxicos, especificando-se sobre a ligação entre um herbicida bastante difundido o Glifosato e o câncer. Por meio de uma revisão bibliográfico, indicou que há estudos, realizados pela maior produtora desse herbicida, onde essas pesquisas feitas com

ratos e camundongos, apresenta problemas no sistema renal e um princípio de tumor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agrotóxicos; Riscos; Informações.

### RELATIONSHIP BETWEEN AGROCHEMICALS AND CANCER: A GLYPHOSATE ANALYSIS

**ABSTRACT:** In Brazil, the use of agrochemicals has been increasing every year, reflecting the majority of the country's agricultural system being conventional, leading to intense use of these products. With the growing use, many farmers, without adequate access to information, have no idea of the risks of contamination, both to man and the environment. Therefore, this research has as its central objective, which goes beyond the debate about agro-toxins, specifying the link between a widespread herbicide Glyphosate and cancer. Through a bibliographic review, he indicated that there are studies carried out by the largest producer of this herbicide, where these researches made with rats and mice present problems in the renal system and a tumor principle.

**KEYWORDS:** Agrochemicals; Risks; Information.

## INTRODUÇÃO

O uso em massa de agrotóxicos na agricultura começou em meados da década de 1950, nos Estados Unidos, através da chamada 'Revolução Verde', que teria o objetivo de modernizar a agricultura e elevar sua produtividade. No Brasil, esse movimento se inicia na década seguinte, 1960 e, com a implantação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), se impulsiona nos anos seguintes a partir da década 1970. O programa associado com o uso dessas substâncias à concessão de créditos agrícolas, no entanto, o Estado um dos maiores incentivadores dessa prática. (SIQUEIRA, 2013)

O termo agrotóxico foi adotado no nosso país por meio da Lei Federal nº 7.802, de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, e possui o conceito de: Compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção, direta ou indiretamente, de agentes patogênicos para plantas e animais úteis e às pessoas. (SANTANA, 2016)

Estudos apontam que o uso de agrotóxicos sem devida proteção dos Equipamentos de Proteção Individual - EPIs podem ocasionar diversos sintomas como: náuseas, tonturas, dores de cabeça, alergias, lesões renais e hepáticas, cânceres, alterações genéticas, doença de Parkinson, etc, e atinge de forma direta o sistema respiratório com Traqueíte crônica, Pneumofibrose, Enfisema pulmonar, Asma brônquica. Vale ressaltar que essa ação pode ser sentida imediatamente após o contato com o produto (efeitos agudos) ou após semanas/anos (efeitos crônicos). De acordo com Tavares e Correia, "A realidade mostra a falta de conhecimento a respeito do perigo que esses produtos representam para a saúde e o meio ambiente. Tanto é que os agrotóxicos ainda são conhecidos pelo agricultor brasileiro como "remédio das plantas". E muitos ainda resistem ao uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), como luvas, respirador/máscara, viseira, capuz, botas, jaleco e calças impermeáveis, obrigatório na atividade agrícola". (2013, p. 1).

Vale ressaltar que tanto fumaça, quanto poeira em excesso e substâncias químicas leva a um processo inflamatório crônico desde nariz até os alvéolos pulmonares e mau funcionamento, dilatação e destruição dos mesmos. A inalação massiva, por sua vez, pode causar danos sérios imediatos e até letais ao aparelho respiratório, como por exemplo, podendo evoluir até mesmo em um quadro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O Brasil detém, a partir dos anos 1970, leis que regulamentam o registro, a produção, o uso e o comércio destes no Brasil. Sem falar de uma grande falta de fiscalização, que marca esses processos, como por exemplo a liberação de produtos proibidos em muitas áreas do mundo e no Brasil não é diferente, devido a fragilidade não só da fiscalização mas das medidas inseridas para que tais leis sejam cumpridas.

Câncer é definido como um amontoado de patologias, com descontroles em seus desenvolvimentos, invadindo tecidos e órgãos, gerando dor e sofrimentos. Ao longo da história o câncer vem sendo notado de várias maneiras: como uma doença que não tem cura, contagioso, como um problema social e de saúde pública. Na atualidade, há entendimento

quanto ao fato de que a mortalidade por câncer não se deve apenas a fatores biológicos, porém bem como às condições de vida, à competência do sistema de saúde, aos costumes e tipos culturais próprios das diversas sociedades. (TEIXEIRA et al., 2012)

Nesse contexto que abrange desde a produção do agrotóxico, transporte, e até a comercialização a utilização de forma errônea quando aplicado em excesso e em alguns casos sem necessidade, levando em consideração os altos e graves índices de contaminações ambientais, em alimentos e de pessoas. Diante de tal cenário, este estudo pretende compreender os rumos da investigação científica sobre o uso de agrotóxicos e sua relação com a saúde, em especial, com o desenvolvimento de patologias oncológicas.

## **METODOLOGIA**

O presente trabalho realizou uma revisão da literatura do tipo narrativa, sobre o tema agrotóxicos e sua relação com o câncer, especialmente o glifosato.

Para tal pesquisa foram levados em consideração os artigos inseridos nas bases de dados Lilacs, SciELO e Pumed, no período a partir de julho de 2011, como critérios de buscas foram utilizadas as palavras-chaves: agrotóxicos; câncer; glifosato. Também foram feitas buscas em livros e monografias. Dos artigos recuperados nesta pesquisa inicial, foram selecionados apenas aqueles que se enquadraram nos critérios de inclusão com os descritores: 1) relação dos agrotóxicos com câncer; 2) Que está em português e em inglês. Foram selecionados 7 artigos, destes os excluídos foram 2, pois fogem da temática, com os descritores: agrotóxicos sem relação com câncer; Publicações acima de 10 anos.

Com objetivo de ter sustentação teórica para discutir o tema e o problema da pesquisa, com base no quadro teórico e conceitual. Esse trabalho por se tratar de revisão não precisará de aprovação do Comitê de Ética pois se trata de uma revisão da literatura.

## **O CÂNCER**

### **Conceitos e Cenário**

Atualmente o câncer vem tornando-se um problema de saúde pública dada seus progressivos casos que envolvem morbidade e mortalidade em todo mundo. Estima-se que, para o ano de 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões em todo o mundo, e cerca de 60% desses ocorrerão nos países em desenvolvimento. (INCA, 2015)

De acordo com o Instituto Oncoguia 2016, o câncer é o crescimento descontrolado, provocado pela proliferação contínua de células anormais, com capacidade de invasão e destruição de outros tecidos. O câncer, que pode surgir de qualquer tipo de célula e de qualquer tecido do organismo, não é uma doença única, mas um grande número de doenças classificadas de acordo com o tecido e o tipo de célula de origem. Há centenas de formas distintas, sendo três os principais subtipos: os sarcomas originam-se do tecido conjuntivo e dos tecidos de suporte, como osso, cartilagem, músculo, vasos sanguíneos e gordura.

Em muitos aspectos, o câncer é uma obra do acaso, uma infeliz ocorrência de um erro genético com agressão ambiental, porém o fator predominante é, sem dúvida, o comportamento humano como o tabagismo, maus hábitos alimentares, sedentarismo, etc. Por isso sempre devemos nos cuidar e a quaisquer sintomas anormais devemos procurar um médico. Pois o câncer sempre foi palavra assustadora para todos, mesmo para os médicos. Quando recebem este diagnóstico, muitos têm a reação de quem acabou de ser condenado à morte. Apesar das informações e dos grandes avanços terapêuticos obtidos na área, nos últimos anos, a primeira reação ainda é de desespero. (JBG CUNHA 2010)

## Agrotóxicos

A palavra agrotóxico é aplicada pra conceituar uma vasta diversidade de produtos químicos que são usados para aniquilar as ervas daninhas (herbicidas), insetos (inseticidas) e fungos (fungicidas). Tais produtos são muito utilizados na agricultura, horticultura, reflorestamento e no desenvolvimento secundário destes produtos nas indústrias (MCDUFFIE et al., 2011).

Os organoclorados consistem em um grupo de inúmeros produtos químicos sintéticos, muitos deles são expostos no meio ambiente nos últimos anos com o uso de agrotóxicos ou produtos industriais. Estes agrotóxicos abrangem, por exemplo, o dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT), muito utilizados nos Estados Unidos, entre os anos de 1940 até 1960, para o monitoramento de insetos na manipulação de florestas, na agricultura e para a proteção de construções.

A utilização continua de DDT nos EUA aconteceu no começo da década de 60, e foi coibida doze anos depois, em 1972. Os biphenyls polychlorinated (PCBs) também foram bastante usados nos EUA na forma de fluidos dielétricos em transformadores e capacitores elétricos, lubrificantes e na produção tintas e papel, também coibido o uso em 1977. Os PCBs consistem como em uma vasta classe de inúmeros produtos químicos organoclorados que abrangem 209 grupos, uns mais comercializados do que outros (PEREIRA et al., 2017).

As dioxinas também são organoclorados e são resultados da combustão de produtos em processos industriais ou como contaminantes de herbicidas. Outros organoclorados abrangem agrotóxicos que são utilizados em quantidades menores, por exemplo, o lindane e hexachlorobenzene. Apesar da extinção de DDT e PCBs nos EUA desde década de 70, alguns dos seus compostos organoclorados se concentraram e se mantiveram no ambiente. Tais compostos são lipofílicos, degenerando de forma lenta e bioacumulam na cadeia alimentar, e podem ser encontrados no tecido adiposo, sangue e leite humano. Os principais resíduos de organoclorados encontrados nos tecidos humanos são o dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) e os principais metabólitos de DDT e PCBs. (CALLE et al., 2012)

As formulações dos agrotóxicos são compostas complexas que compreende além do mais, elementos ativos, diversos outros compostos como solventes, agentes umidificantes e emulsificantes e aditivos. Além do mais, é comum na agricultura que diversas formulações sejam ao mesmo tempo usados com combinações variadas dependendo da época e do tipo

de cultura. Tornando a exposição ainda mais complexa, e o biomonitoramento de compostos determinados para a análise da exposição se torna mais difícil. (MCDUFFIE et al., 2011).

Os resultados prováveis dos danos dos tóxicos dessas exposições complexas são inúmeros e os dados da toxicidade associados somente aos ingredientes ativos já são capazes para analisar os danos dos agrotóxicos à saúde. No que tange à genotoxicidade, a indicação das mudanças citogenéticas nos sujeitos expostos de modo laboral aos agrotóxicos pode ser usada como marcador de danos biológicos precoce oferecendo um panorama geral da exposição genotóxica aos agrotóxicos (Pereira et al., 2017).

A contaminação pode ser de forma direta, por meio do contato com as substâncias tóxicas, produtos ou local já contaminados, como de forma indireta por meio da proximidade dos locais, ambas formas resultam no desequilíbrio dos ecossistemas (PERES et al., 2015).

### **Contato direto**

A contaminação de forma direta por meio de agrotóxicos acontece quando o contato de algum dos meios de exposição do manipulador. Normalmente os trabalhadores que manipular os agrotóxicos, não utilizam de forma apropriada os Equipamentos de Proteção Individual – EPI's (ANDEF, 2016).

Conforme a Norma Regulamentadora 31 (NR 31), GM n.º 86/2005, “trabalhadores em exposição direta, os que manipulam os agrotóxicos, adjuvantes e produtos afins, em qualquer uma das etapas de armazenamento, transporte, preparo, aplicação, descarte, e descontaminação de equipamentos e vestimentas”.

Algum outro indivíduo pode contaminar-se com agrotóxicos, no entanto, com menor índice de danos do que um trabalhador rural, pois o mesmo encontra-se em contato diretamente, no seu dia a dia, em todo o processo produtivo (VEIGA, 2017).

A aplicação indiscriminada de agrotóxicos afeta tanto a saúde humana quanto ecossistemas naturais. Os impactos na saúde podem atingir tanto os aplicadores dos produtos, os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos, mas sem dúvida, a primeira categoria é a mais afetada por estes (BOWLWS; WEBSTER, 1995 apud SOARES et al., 2003, p. 1118).

De acordo com Monquero et al. (2009), os mais atingidos são os aplicadores, que se expõe diretamente com o produto químico, e a parte mais atingida é a pele, pois o maior membro do corpo, mesmo que a forma mais rápida de absorção seja através da inalação.

### **Contato Indireto**

Ainda conforme a Norma Regulamentadora 31 (NR 31), GM n.º 86/2005, discorre acerca dos trabalhadores que tem sua exposição de forma indireta:

Trabalhadores em exposição indireta, os que não manipulam diretamente os agrotóxicos, adjuvantes e produtos afins, mas circulam e desempenham suas atividade de trabalho em áreas vizinhas aos locais onde se faz a manipulação dos agrotóxicos em qualquer uma das etapas de armazenamento, transporte, preparo, aplicação e descarte,

e descontaminação de equipamentos e vestimentas, e ou ainda os que desempenham atividades de trabalho em áreas recém-tratadas.

Ainda conforme ANDEF (2016), além de trabalhadores, outros indivíduos que não estejam no ato de aplicação nem manipulando os agrotóxicos, porém, entrem em contato com plantas, roupas e alimentos contaminados tem sua exposição indireta.

### **Efeitos do Uso Indiscriminado de Agrotóxicos à Saúde Humana e ao Meio Ambiente**

O começo da utilização de agrotóxicos no Brasil ocorreu nos anos 60 e 70 com o uso para o controle de transmissores nos locais de saúde pública. Na agricultura foram sendo aplicados cada vez mais ao passo que evoluíram os equipamentos e agroquímicos voltados ao processo de produção, época conhecida como revolução verde. (Rangel, Rosa e Sarcinelli, 2011)

Se o uso de agrotóxicos beneficiou a intensa produção de alimentos seus impactos se tornaram mais visível para a saúde humana e ao meio ambiente. A utilização sem critérios e controle que vem ocorrendo nos últimos anos, mesmo com os impactos positivos no que tange a produtividade o mesmo tem ocasionado grandes prejuízos e danos indesejáveis seja para a saúde humana como o meio ambiente. (RANGEL; ROSA; SARCINELLI, 2011).

Ainda conforme esses autores, Rangel, Rosa e Sarcinelli (2011), dois terços de todos agrotóxicos que existem, são direcionados para a agricultura, ou seja, torna os trabalhadores agrícolas mais predisposto a exposição desses danos. Depois da exposição ocupacional as principais fontes de exposição para o homem dos agrotóxicos são as do meio ambiente, considerando que tais produtos se acumular-se no ar, água e solo, e assim, causar danos no com o passar do tempo.

A exposição crônica pode estimular o surgimento de doenças, seja nos trabalhadores como população que é exposta a estes compostos, por meio da alimentação. Normalmente, os danos para a saúde humana ocasionados da exposição a agrotóxicos são, o câncer, mau formação e danos para o sistema nervoso e sistema endócrino (BARBOSA, 2014).

O uso indiscriminado de agrotóxicos na produção agropecuária, e demais uso, tem estimulado diversas complicações e alterações para o ambiente, seja por meio da contaminação ou pelo seu acúmulo nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas. (PERES; MOREIRA, 2007, p. 614).

### **Desenvolvimento da Doença**

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2008 o nosso país está em primeiro lugar na posição mundial de uso de agrotóxicos. Acerca do crescimento do mercado nos últimos dez anos expandiu aproximadamente 93%, já no Brasil, cresceu mais de 190%. No entanto, Rossi (2015), adverte que a utilização de forma indiscriminado de agrotóxicos está intimamente ligada ao surgimento de doenças, entre elas o câncer e eventuais patologias genéticas.

O uso exagerado de agrotóxicos pode favorecer o surgimento de diversos tipos de

câncer. Substâncias que compõem defensivos agrícolas podem atuar como promotor de tumores. Em boa parte dos casos, o câncer surge na forma multifatorial, e os instrumentos que influenciam na carcinogênese são diversos. Entre os fatores, a exposição aos agrotóxicos é vista como uma das principais circunstâncias relacionadas ao desenvolvimento do câncer, devido a sua atuação com substâncias capazes de modificar o DNA de uma célula, podendo posteriormente originar o tumor, ou promotores tumorais, que estimulam a célula alterada a se dividir desorganizadamente.

De acordo com relatório emitido pelo INCA (2011):

“O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes, em uma dada frequência e período de tempo, e pela interação entre eles. Devem ser consideradas, no entanto, as características individuais, que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular (INCA, 2011, p.22).

Compreende-se que certos pesticidas, como os baseados em organoclorados, têm a capacidade de continuarem acondicionados nos tecidos de animais e vegetais, e isso inclui o homem. Esses pesticidas são lipossolúveis e de grande estabilidade, tornando-os resistentes à danificação biótica ou abiótica, e possibilita dessa forma o aparecimento de células cancerígenas.

De acordo com Jobim (2007) os efeitos dos agrotóxicos são de natureza crônica, e ocorre em três principais formas de absorção: a dérmica, a digestiva e a respiratória. Esse aspecto eleva considerando os agentes químicos expostos nas áreas biológicas. As intoxicações agudas são as comuns, atingindo as pessoas com exposição ocupacional. Essa intoxicação é caracterizada por irritação da pele e olhos, coceira, dores abdominais, vômitos, diarreias, problemas respiratórios e morte.

Ainda conforme o INCA (2015), as intoxicações crônicas podem atingir toda a sociedade, pois reflete da exposição variadas aos agrotóxicos, isto é, desde a existência de resíduos nos alimentos, até a presença no próprio meio ambiente. Para Barros (2010), o principal alerta de contaminação por agrotóxicos é oriundo da manipulação inapropriada dos produtos, especialmente, pelos trabalhadores rurais (BARROS, 2010).

Pode-se identificar que a presença de resíduos de agrotóxicos não acontece apenas nos alimentos in natura, mas em inúmeros produtos alimentícios industrializados, como biscoitos, pães, cereais e outros que tenham na sua composição o trigo, o milho e a soja. Podem estar também nas carnes e leites de animais que se alimentam de ração com presença de agrotóxicos (INCA, 2015).

### **Classificação dos Agrotóxicos**

A seguir, serão listados e discutidos sobre as classificações dos agrotóxicos conforme os critérios de controle, o grupo químico a qual estão inseridos e sobre o nível de toxicidade.

## *Quanto ao controle*

No geral, são três grupos controladores mais utilizados nas lavouras: inseticidas (insetos), herbicidas (plantas daninhas), fungicidas (fungos). No entanto, ainda há os bactericidas (bactérias), nematicidas (vermes), larvicidas (larvas), cupinidas (cupins), formicidas (formigas), pulguicidas (pulgas), piolhidas (piolhos), etc (LEVIGARD, 2011). Os principais autores de intoxicação são os inseticidas intoxicação. Já acordo com Espíndola (2011), o aumento de aplicabilidade nas lavouras é dos herbicidas, número esse que cresce a cada ano.

## *Grupo Químico*

Os inseticidas abrangem os organoclorados, os organofosforados/carbamatos, os carbamatos e os piretróides (PERES, 2017). Os herbicidas consistem nos dinitrofenóis/pentacorofenol, os fenoxiacéticos e os dipiridilos. Já os fungicidas são os ditiocarbamatos ou as fentalamidas (MOREIRA, 2017).

Os inseticidas são elencados, principalmente, em três grupos: os organoclorados; os inibidores da colinesterase (fosforados orgânicos e carbamatos); as piretrinas sintéticas (ANDRADE, 1995).

Os organoclorados possuem uma maior resistência pois são lipossolúveis cumulativos. Ou seja, acumulam-se em células de gordurosas nos animais e também no homem (PERES; MOREIRA, 2017).

Os organofosforados e os carbamatos resultam as intoxicações agudas e inibem uma enzima chamada de acetilcolinesterase, ocasionando danos na transmissão de impulsos nervosos. Alterando também as glândulas, músculos e o sistema nervoso central e periférico. Além disso, está ligado a um alto número de óbitos.

As piretrinas sintéticas (piretróides) possuem um elevado nível de toxicidade aguda para os mamíferos, e absorvem tal substâncias por meio de todas as vias do organismo (LEVIGARD, 2011)

## *Toxicidade*

Toxicidade consiste na capacidade de substância desenvolver manifestações contrário à saúde (ANDEF, 2016). E é aplicado pra identificar o grau de risco que o agrotóxico dispõe. De acordo com Levigard (2011, p. 26):

Ela é baseada na dose letal 50 (DL 50) que é um valor estatístico que determina a quantidade de veneno em mg/kg de peso corporal necessária para matar 50% da amostra populacional em estudo por intoxicações agudas. Os valores são determinados em cobaias e extrapolados para humanos a partir do peso.

Os agrotóxicos possuem classificados em classes de I a IV, e consideram uma escala de cores: que oscilam entre o mais tóxico ao menos tóxico. Tais riscos são diferenciados no

relacionamento entre o homem e ao meio ambiente, e são dependentes do tipo do produto. Sobre a dose letal, em classe, podemos analisar a tabela a seguir.

CLASSE	DL <sub>50</sub> para ratos (mg/kg de peso vivo)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
I – Extremamente Tóxico	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
II – Altamente Tóxico	5 – 50	20-200	10 – 100	40 – 400
III – Medianamente Tóxico	50 – 500	200- 2000	100 – 1000	400 – 4000
IV – Pouco Tóxico	Acima 500	Acima 2000	Acima 1000	Acima 4000

Tabela 1: Dose Letal para ratos (mg/kg de peso vivo).

Fonte: Levigard (2001, p. 26)

Para poder identificar os riscos que um agrotóxico provoca, é feito o uso de cores nos rótulos de conforme a Tabela 2.

CLASSE I	
CLASSE II	
CLASSE III	
CLASSE IV	

Tabela 2: Cores das classes dos Agrotóxicos.

Fonte: Levigard (2001)

### *Herbicida Glifosato*

O herbicida glifosato possui como principal metabólico o ácido aminometilfosfônico (AMPA), compreendendo a sua toxicidade e reação no meio ambiente detalhadamente em várias circunstâncias ainda são requeridas, com o intuito de reduzir os danos a natureza e ao homem, seja pelo solo, contaminação da água, pelo ar e também nos alimentos (ANDRÉA et al., 2014).

O glifosato é um herbicida bastante utilizado e tornou-se muito relevante nas lavouras, pois o mesmo apresentar (conforme seus fabricantes) uma imensa efetividade de translocação nos plantios (SHANER, 2009) e eficiente controle, rápida inativação no solo, uma toxicidade menor para os animais e a quem manipula o produto (FRANZ et al., 1997; AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

A abaixo será realizado uma tabela sobre o comportamento desse herbicida no meio ambiente, considerando a sua o solo, água e ar.

MEIO	COMPORTAMENTO	IMPACTO
Solo	A metabolização do glifosato pelos microorganismos é de grande degradação no solo, são decorrentes de condições aeróbicas e anaeróbicas do solo (VEIGA et al., 2011).	Observa-se a diminuição da vida biológica, aumento da velocidade de degradação química retardamento do movimento de lixiviação (TONI et al., 2016).
Água	A grande solubilidade do glifosato e seus sais na água, consiste em elevada mobilidade na água, forte e rápida dos sedimentos e partículas do herbicida, onde removem o glifosato da solução do solo. (SOLOMOM e THOMPSON, 2013).	O glifosato é adsorvido pelos sedimentos e degradado por microorganismos (PATERSON, 2017). Em outro observou as mostras de baixos níveis de glifosato foi encontrado na urina de trabalhadores rurais após sua aplicação (ACQUAVELLA et al., 2014)
Ar	A presença de glifosato no ar é escassa, já que seus sais não têm pressão de vapor significativa (BATTAGLIN et al., 2015).	Gotículas podem estar presentes no ar, devido ao uso em conjunto do glifosato junto com outros agrotóxicos, (QUAGHEBEUR et al., 2014).

Tabela 3: Comportamento do Glifosato.

Fonte: Adaptado pelo autor, 2020.

### *Glifosato e o Câncer*

Em um recente estudo presente pela Agência Internacional da OMS para Pesquisa sobre Câncer (IARC) afirmou que o glifosato é classificado como um possível cancerígeno para homens e considerando genotoxicidade em animais (KATHRYN et al, 2015).

Nesse estudo, teve o acesso aos arquivos da grande indústria Bio/dinâmica Inc. para Monsanto, onde havia muitas experiências com animais (ratos, camundongos e cães) destinados a testar a toxicidade aguda e crônica de glifosato entre os anos de 1978 a 1986, em seus laboratórios. (MONSANTO, 1981<sup>a</sup>)

Os estudos apresentados demonstram expressivos danos no sistema renal dos ratos que foram estudados e em suas 3 seguintes gerações, além da dilatação tubular no rim observou-se a nefrose e a fibrose intersticial em todos os grupos analisados, outros observou a presença dos lúmens, material amorfo e restos celulares. As mudanças na mucosa da bexiga são bastante presentes pois os metabolitos, tem concentração nos rins, ocasionando a hiperplasia, que é tida a princípio como um precoce tumor. (ANTONIOU et al., 2012)

Outros efeitos abrangem a hipertrofia centrolobular e necrose de hepatócitos, nefrite intersticial crônica, e basophilia células epiteliais dos túbulos proximais e hipertrofia nas fêmeas. (KATHRYN et al, 2015).

## CONCLUSÃO

Os danos do glifosato podem variar considerando não apenas as características imediatista dos produtos, mas também com um contato de maior prolongamento, seja no solo, água, ar e no próprio homem. Mesmo sendo pouca as alternativas usadas na agricultura, deve-se prezar pela saúde e evitar contato direto com os agrotóxicos. Também se ressalta um maior aprofundamento nos estudos sobre a ligação entre o glifosato e o desenvolvimento de câncer.

## REFERÊNCIAS

ALMUSSA, A.; SCHMIDT, M. L. G. O contato com agrotóxicos e os possíveis agravos à saúde de trabalhadores rurais. *Revista de Psicologia da UNESP, [S.l.]*, v. 8, n. 2, p.184-188, 2009.

AMÉRICO, J. Brasil utiliza 1 milhão de toneladas de agrotóxicos. Montevideo, Uruguay: Secretaria Regional Latinoamericana. Disponível em: Acesso em: 14 fev. 2012.

ÁVILA, R. A. de et al. Trabalho rural e agrotóxicos: estudo de caso na microbacia do córrego Água Limpa, município de Campos Altos, Minas Gerais. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 73-80, 2009.

CQUAVELLA, J. F.; ALEXANDERS, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the form family exposure study. *Environmental Health Perspective*, Morrisville, v.112, n.3, p.321-326, 2014.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glyphosate: breve revisão. *Química Nova*, São Paulo, v.25, n.3, p. 420-428, 2012.

ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate in its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.11, p.1329-1335, 2013.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M. B. Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. *Planta Daninha*, Viçosa, v.22, n.1, p.95-100, 2014.

ESPÍNDOLA, E. A. Análise da percepção de risco do uso de agrotóxicos em áreas rurais: um estudo junto aos agricultores no município de Bom Repouso (MG). 155 f. Tese (Doutorado em ciências da engenharia ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

LEVIGARD, Y. E. A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de nervoso no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. 91 f. Dissertação (Mestrado em saúde do trabalhador e ecologia humana) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, [S. l.] v. 10, p. 27-37, 2005.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. *Ciência e Saúde Coletiva*. Rio de Janeiro, v. 12, n. 1,

p. 105-114, 2007.

SCARSO, A. Mais agrotóxico: menos saúde. Montevideo, Uruguay: Secretaria Regional Latinoamericana.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel, 2016.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. Ciência e Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2017.

VEIGA, M. M. et al. A contaminação por agrotóxicos e os equipamentos de proteção individual (EPIs). Revista Brasileira Saúde Ocupacional. São Paulo, v. 32, n. 116, p. 57-68, 2017.

## ESTUDO DAS ALTERAÇÕES TÍMICAS RELACIONADAS COM A IDADE DURANTE A INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Data de aceite: 18/06/2020

### **Rafaela Pravato Colato**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto (FCFRP–USP) – Universidade de  
São Paulo, Departamento de Análises Clínicas  
Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto-  
SP.

### **Vânia Brazão**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto (FCFRP–USP) – Universidade de  
São Paulo, Departamento de Análises Clínicas  
Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto-  
SP.

### **Fabricia Helena Santello**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto (FCFRP–USP) – Universidade de  
São Paulo, Departamento de Análises Clínicas  
Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto-  
SP.

### **Andressa Duarte**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto (FCFRP–USP) – Universidade de  
São Paulo, Departamento de Análises Clínicas  
Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto-  
SP.

### **José Clóvis do Prado Jr.**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto (FCFRP–USP) – Universidade de  
São Paulo, Departamento de Análises Clínicas  
Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto-  
SP.

Nota: este trabalho é parte da Tese de Doutorado de Rafaela Pravato Colato, sob orientação de José Clóvis do Prado Jr.

**RESUMO:** Apesar de todo o avanço científico nas últimas décadas no sentido de desvendar os processos imunes do hospedeiro e a forma de evasão do parasita, a doença de Chagas ainda é um importante problema em saúde pública. A expectativa de vida no Brasil tem aumentado a cada ano e esse crescimento permite o surgimento de uma população idosa em risco de contrair a doença de Chagas. A resposta imunológica, assim como a maior parte das funções fisiológicas, diminui com a idade, sendo a explicação teórica do processo de envelhecimento um fator importante que envolve o processo de imunosenescência e maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) entre outros, que por sua vez podem estar relacionados com a progressão da doença de Chagas. Sabe-se que níveis elevados destes nos tecidos contribuem para o estresse oxidativo gerando danos teciduais que refletem na severidade da doença de Chagas. Portanto, o objetivo desta revisão foi discorrer sobre a literatura científica disponível, descrevendo os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas alterações da resposta imune ao longo da vida e seus reflexos frente à doença de Chagas.

Durante a evolução fisiopatológica da doença de Chagas no hospedeiro, além da resposta imune ineficiente e aumento do estresse oxidativo, ocorre uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e comprometimento no processo de maturação celular intratímica, os quais afetam etapas essenciais no desenvolvimento dos timócitos e exportação de células T para a periferia. Além disso, destacam-se mudanças no perfil da produção de citocinas, como IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, e IL-10, que promovem implicações diretas na competência imunológica do organismo. Os resultados deste trabalho são de grande importância na elaboração de futuras intervenções imunoterapêuticas que visem proporcionar ao hospedeiro senescente um direcionamento eficiente da resposta imune durante a infecção. Portanto, estratégias que visem a promoção da longevidade e o envelhecimento saudável são fundamentais diante do progressivo envelhecimento populacional e nítida inversão da pirâmide etária.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imunossenescência, *Trypanosoma cruzi*, Timo

**ABSTRACT:** In spite of all the scientific advances in the last decades in order to unveil the host's immune processes and the ways of parasite evasion, Chagas disease is still an important public health problem. In recent years, life expectancy in Brazil has increased and this growth allows the emergence of an elderly population at risk of contracting Chagas disease. The immune response, as well as most physiological functions, decreases with age, being the theoretical explanation of the aging process an important factor that involves immunosenescence and enhanced production of Reactive Oxygen Species (ROS), among others, which in turn, may be related to the progression of Chagas disease. It is known that high levels of ROS in the tissues contribute to oxidative stress, generating cell architecture damage that reflects on the severity of Chagas disease. Therefore, the aim of this review was to discuss the available scientific literature, describing the cellular and molecular mechanisms involved in altering the immune response throughout life and its reflexes facing Chagas disease. During the pathophysiological evolution of host's Chagas disease, besides the inefficient immune response and increased oxidative stress, there is a decrease in the activity of antioxidant enzymes and impairment in the process of intrathymic cell maturation, which affects essential stages in the development of thymocytes as well as the export of T cells to the periphery. In addition, changes in the profile of cytokine production are highlighted, such as IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, and IL-10, which display direct implications for the body's immune competence. The results of this work are of great importance in the elaboration of future immununo-therapeutic interventions that aim to provide the senescent host with an efficient targeting of the immune response during infection. Therefore, strategies aimed at promoting longevity and healthy aging are fundamental facing a progressive population aging and a sharp inversion of the age pyramid.

**KEYWORDS:** Immunosenescence, *Trypanosoma cruzi*, Thymus

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas o Sistema Imune

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o flagelado digenético *Trypanosom cruzi* (*T. cruzi*), e é considerada uma das mais sérias doenças parasitárias. Dados recentes indicam que entre 6 e 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, e cerca de 65 milhões de pessoas correm o risco de contraírem essa parasitose (CHAO et al., 2020; WHO - Chagas disease (American trypanosomiasis). O médico Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1909) foi o responsável pela descrição completa da doença parasitária, incluindo seu agente etiológico, vetor, reservatórios e animais de laboratório suscetíveis à infecção (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; URBINA, 2009).

O protozoário flagelado *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, e possui como formas evolutivas os tripomastigotas metacíclicos (formas infectantes para o homem), epimastigotas (formas de multiplicação no vetor e em culturas de células), tripomastigotas sanguícolas e amastigotas (formas imóveis e de multiplicação nas células do hospedeiro) (NUNES et al., 2013). O ciclo vetorial, do tipo heteroxênico, tem início quando o inseto ingere as formas tripomastigotas circulantes, no momento da hematofagia em mamíferos infectados. Após multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo destes, tripomastigotas metacíclicos são eliminados em suas fezes podendo infectar novos hospedeiros vertebrados (BERN, 2015). Embora o Brasil tenha obtido o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo inseto *Triatoma infestans*, conferida pela Organização PanAmericana da Saúde (FERREIRA; SILVA, 2006), existem descrições da capacidade de repovoamento deste vetor, com identificação da espécie em países da América do Sul como Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (COURA, 2013). Além disso, existem outras espécies que se destacam como vetores do parasito, merecendo atenção especial *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012; RODRIGUES COURA, 2014). Outros mecanismos secundários de transmissão da doença, incluem: transfusão sanguínea, via congênita (em qualquer momento da gestação), transplante de órgãos, secreções, acidentes em laboratórios ou ainda através da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com o parasita (CHATELAIN; KONAR, 2015; PEDRA et al., 2011). Nas últimas décadas, em virtude da migração de indivíduos infectados, destaca-se a disseminação da doença para outros continentes e países não endêmicos (DIAS; COURA, 1997), com casos notificados da doença na Espanha, Estados Unidos e Austrália.

Durante a infecção aguda por *T. cruzi*, a maioria dos pacientes encontram-se assintomáticos, fato este que dificulta o diagnóstico neste período. Apresenta ainda poli-sintomatologia inespecífica na fase inicial da doença, tais como febre, mal estar geral, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica (BERN, 2015). A taxa de mortalidade durante a fase aguda da infecção geralmente é baixa, em torno de 2-8%, atingindo em maior número crianças e pacientes imuno-comprometidos (CHATELAIN; KONAR, 2015; URBINA,

2015). No entanto, quando a forma de contágio acontece através da via oral, observam-se altas taxas de mortalidade (BERN, 2015; YOSHIDA; TYLER; LLEWELLYN, 2011). Os indivíduos chagásicos podem permanecer assintomáticos por vários anos, em um período de latência, denominado forma indeterminada da doença. Nessa fase, a sorologia e os testes parasitológicos são positivos, eletrocardiograma normal e coração, esôfago e cólon sem alterações anatomopatológicas (CHATELAIN; KONAR, 2015; MARIN-NETO; RASSI, 2009). Após este período de latência, dependendo do tipo de cepa e estado imunológico do hospedeiro, dentre outros fatores, cerca de 20 a 30% dos pacientes infectados irão desenvolver as manifestações clínicas da doença de Chagas na fase crônica, podendo apresentar alterações cardíacas e/ou digestivas (TEIXEIRA *et al.*, 2012; URBINA, 2015), sendo o acometimento cardíaco o mais prevalente no Brasil (PEDRA *et al.*, 2011).

Embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos sugerem que a resistência do hospedeiro, bem como os diferentes graus de severidade da doença de Chagas, são dependentes da eficiência da resposta imune do hospedeiro dirigida ao parasita. Portanto, a ação do sistema imunológico durante a fase aguda da infecção é essencial, a fim de controlar a replicação parasitária e limitar os danos teciduais durante a fase crônica. Componentes da imunidade inata e adquirida, juntamente com as células como macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a síntese de anticorpos por células B, conferem tal resistência durante a infecção por *T. cruzi*. (MARTINS *et al.*, 2004). A mobilização efetiva da resposta imune durante a fase aguda da doença de Chagas contribui para a redução significativa da carga parasitária sanguínea e diminuição dos ninhos teciduais. Entretanto, tal resposta não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro, contribuindo para o aparecimento das manifestações da fase crônica da infecção (BUSTAMANTE *et al.*, 2007).

## 1.2 Senescência, Imunossenescência e Doença de Chagas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), no período de 2015 a 2050, a previsão é de que a população de indivíduos com mais de 60 anos duplicará de 12 para 22%. Tais modificações populacionais, aceleradas nos últimos 10 anos, também resultam em implicações econômicas, visto que grande parte destes idosos necessitará de atendimento médico constante (WICK *et al.*, 2000). De acordo com Christensen e colaboradores (1996), para indivíduos nascidos no século 21, a expectativa de vida deverá ultrapassar os 100 anos. No Brasil, as projeções indicam que, no período entre 2000 e 2050, a população de idosos deverá subir de 5,1% para 14,2%. Desta forma, em 2025, o país ocupará o sexto lugar entre os países com maior número de idosos (acima dos 60 anos), possuindo mais de 30 milhões de indivíduos nessa faixa etária (CHAIMOWICZ, 1997).

Dentre as bases teóricas propostas para explicar o processo de envelhecimento destacam-se importantes reduções tanto da atividade do sistema imune bem como das funções fisiológicas (AGOSTINHO, 2004). A terminologia imunossenescência descreve as disfunções do sistema imune que ocorrem com a progressão da idade, contribuindo para uma

maior prevalência de doenças infecciosas, parasitárias, autoimunes e crônico-degenerativas (SANSONI *et al.*, 2008; TARAZONA *et al.*, 2002). Esse processo é caracterizado por alterações quantitativas e/ou qualitativas nos componentes celulares e moleculares, os quais resultam em uma reduzida atividade do sistema imune (AW; SILVA; PALMER, 2007). Em oposição, outros estudos indicam que a imunossenescência é resultante de remodelamento contínuo, em que várias funções estão reduzidas, e outras permanecem inalteradas ou até mesmo aumentadas (FRANCESCHI *et al.*, 1996). Embora os mecanismos envolvidos nas complexas alterações que ocorrem com o progressivo envelhecimento ainda não estejam completamente esclarecidos, alguns autores destacam que a manutenção do estado pró-inflamatório crônico (FRANCESCHI *et al.*, 1996) tem importante participação neste processo. Portanto, o aumento na produção de citocinas, como IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$  e outros fatores solúveis da inflamação, podem ser considerados prognósticos de morbidade e mortalidade no idoso (SANSONI *et al.*, 2008). Em nossos experimentos, observamos que o envelhecimento ocasionou um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  nos animais senis.

Com a progressão da idade, ocorrem importantes modificações nas funções dos neutrófilos, com alterações na quimiotaxia, apoptose e na sinalização de receptores, desencadeando declínios nas atividades fagocíticas e bactericidas destas células no local da infecção (PAWELEC, 2007). A morte celular programada de neutrófilos e macrófagos pode ocorrer de forma prematura, contribuindo para a reduzida atividade fagocitária observada no idoso (CRIGHTON; PUPPIONE, 2006). Além disso, os macrófagos apresentam menor capacidade de quimiotaxia e de produção de agentes oxidantes, bem como, diminuição da quantidade de precursores macrofágicos/monocíticos na medula óssea e a produção de moléculas de sinalização oriundas dessas células (SOLANA; PAWELEC; TARAZONA, 2006). De forma interessante, observamos uma supressão na população de macrófagos nos animais senis e infectados por *T. cruzi*, quando comparado aos animais pertencentes ao grupo jovem e infectado.

À medida que envelhecemos, ocorre um aumento da quantidade de células NK embora sua atividade esteja diminuída. A resposta de células NK às citocinas, por exemplo, se encontra reduzida, o que resulta no declínio da citotoxicidade celular e da síntese de citocinas e quimiocinas (KOCH *et al.*, 2006). Os resultados obtidos em nossos experimentos demonstraram que a senescência provocou uma tendência no declínio na população de células NK, porém não significativa, quando comparado aos animais do grupo jovem não infectado. Entretanto, nos animais senis infectados ou não, observamos uma diminuição significativa no percentual de células NKT, quando comparados aos animais jovens.

A inibição da linfopoiese B em indivíduos idosos tem sido descrita em vários estágios de desenvolvimento, desde as células hematopoiéticas até os estágios tardios da nova geração de células B. Sugere-se que as alterações da medula óssea que ocorrem a senescência contribuem para as anormalidades na geração dessas células, afetando não apenas a homeostase, mas também as suas funções (CANCRO *et al.*, 2009). As alterações nos linfócitos B ocasionadas pela idade incluem a redução de moléculas coestimulatórias, deficiências na sinalização do seu receptor e a diminuição da afinidade de imunoglobulinas

(AW; SILVA; PALMER, 2007).

A importância dos linfócitos B no mecanismo de resistência à infecção por *T. cruzi* foi mostrada no trabalho de Cardillo e colaboradores (2007), que ao infectarem animais geneticamente deficientes desse tipo celular, constataram que estes apresentaram maior suscetibilidade à infecção, com redução do infiltrado inflamatório e do número de linfócitos T de memória (CARDILLO *et al.*, 2007). O direcionamento da imunidade humoral é essencial no controle da infecção e a depleção de células B resulta no aumento da parasitemia, tornando os animais infectados menos resistentes à doença (PASCUTTI *et al.*, 2003). Nossos estudos confirmaram que o processo de envelhecimento afetou o percentual de linfócitos B quando comparados aos animais jovens.

Com relação às células dendríticas, consideradas elo importante entre a imunidade inata e a adaptativa, embora estudos apontem que as resposta destas células às citocinas não sofram alterações significantes com o envelhecimento, as células dos idosos produzem maiores proporções de IL-6 e TNF- $\alpha$  (PAWELEC, 2007). Por outro lado, há relatos de que as células dendríticas apresentem falha na geração da resposta antiinflamatória, o que pode justificar o paradoxo existente entre o aumento da inflamação e o envelhecimento humano (VASTO; MALAVOLTA; PAWELEC, 2006).

Uma das principais alterações do sistema imune diante da senescência é a redução do número de células T *naive*, resultado da progressiva involução tímica e subsequente redução na concentração dos hormônios envolvidos na maturação de células T (DORIA; FRASCA; COVELLI, 1992), bem como da modulação das populações leucocitárias. Nesse contexto, a alteração na homeostasia das células T é evento central crítico para as demais modificações observadas na imunidade adquirida em decorrência do envelhecimento. Tal processo ocorre paralelamente às alterações na capacidade de ativação, proliferação e diferenciação das células T *naive* em células T efetoras (BORASCHI *et al.*, 2013), as quais desempenham funções especializadas, tais como, a secreção de citocinas, reconhecimento e eliminação de patógenos, ativação de macrófagos e células B (SIMPSON, 2011). Isso contribui para uma maior incidência de doenças infecciosas, parasitárias, autoimunes e crônico-degenerativas (SANSONI *et al.*, 2008). Corroborando o trabalho acima descrito, evidenciamos em nossos estudos um declínio no percentual de células TCD4<sup>+</sup> nos animais senis infectados ou não, quando comparado aos animais do grupo jovem infectado e não infectado.

A resposta imune adaptativa, comandada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> que promovem e direcionam os mecanismos de defesa efetores, como produção de interleucinas, ativação de fagócitos, proliferação de linfócitos B e T CD8<sup>+</sup> também é essencial para o controle da replicação intracelular do parasita (BRENER; GAZZINELLI, 1997). As células T CD8<sup>+</sup> quando ativadas, desenvolvem uma atividade citotóxica e específica que resulta na morte das células do hospedeiro que se encontram infectadas por *T. cruzi* (MARTIN; TARLETON, 2004). Ferraz e colegas (2009) demonstraram que camundongos *knockout* deficientes em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são mais suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, apresentando parasitemia elevada e altas taxas de mortalidade.

A severa atrofia tímica, presente na fase aguda da doença de Chagas, é caracterizada,

principalmente, pela intensa depleção de timócitos corticais imaturos, estando diretamente relacionada com altos níveis plasmáticos de glicocorticóides. De acordo com estudos em humanos, embora ocorra um declínio gradual dos timócitos ao longo da vida, essa redução nos espaços epiteliais tímicos é evidenciada já no primeiro ano de vida do indivíduo, atingindo o nível de 75% de redução na meia-idade (STEINMANN; KLAUS; MÜLLER-HERMELINK, 1985). Além da perda de timócitos e massa linfocitária, as alterações que ocorrem com o processo de envelhecimento, incluem mudanças na arquitetura e tamanho do órgão (PALMER, 2013), com deposição de quantidades crescentes de tecido adiposo no parênquima do timo (DIXIT, 2010), contribuindo para uma maior incidência de doenças infecciosas, parasitárias, autoimunes e crônico-degenerativas (SANSONI *et al.*, 2008). De acordo com o descrito, observamos no presente estudo, que os animais senis (com ou sem infecção) apresentaram uma redução acentuada no peso do timo, bem como no número de timócitos, quando comparados aos animais jovens.

Além da involução do timo, a alteração no processo de diferenciação de timócitos é um fator importante que pode também estar envolvido com as disfunções do sistema imune relacionadas com a idade. Estudos destacam que o processo de envelhecimento é acompanhado por um bloqueio idade-dependente nos precursores de linfócitos T, afetando principalmente os timócitos imaturos duplo-negativos (DN) (PHILLIPS *et al.*, 2004), ou seja, regula negativamente a transição DN1-DN2, promovendo um aumento na proporção das subpopulações de timócitos DN1, com conseqüente redução nas subpopulações de timócitos DN2 e DN3 (HENG *et al.*, 2005). De forma interessante, foi relatada por alguns autores que a expressão de CD3, dentro do compartimento de células DN, aumenta com a idade. Tais alterações neste importante órgão linfóide podem afetar diretamente a geração de timócitos duplo positivos (DP), induzindo alterações nas fases seguintes da timopoese, bem como na exportação de células T para a periferia do sistema imune. Corroborando com os estudos previamente citados, demonstramos em nossos experimentos que os animais senis, infectados ou não, apresentaram um aumento nas subpopulações de timócitos DN1, que foi associado a uma importante redução nas subpopulações de timócitos DN3, DN4 e DP, quando comparado aos animais pertencentes aos grupos jovens. Adicionalmente, uma significativa expansão de timócitos CD3<sup>+</sup>DN foi observada nos animais senis, em comparação aos animais jovens não infectados, confirmando que a senescência por si resulta em alteração na população de timócitos DN.

Pesquisas demonstraram que o envelhecimento também está associado com as reações deletérias que ocorrem continuamente nas células e nos tecidos provocadas pelo aumento dos radicais livres, e estes contribuem para a progressão da senescência (HARMAN, 1981). As EROs podem ativar as vias de sinalização inflamatória intracelular, promovendo a migração de células inflamatórias através da barreira endotelial, levando à liberação de mediadores inflamatórios em vários tecidos (MARTINON, 2010), incluindo citocinas produzidas pela ativação de fatores de transcrição regulados por redox, como fator Nuclear kappa B (NF-κB) (CRISTOFANON *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2008). Além disso, as EROs estão envolvidas aos danos associados a idade e a macromoléculas, tais como, proteínas,

lípidos e ácidos nucleicos, levando à peroxidação lipídica e mutações no DNA (VALKO *et al.*, 2007), resultando em estresse e desencadeamento de diversas doenças. A infecção por *T. cruzi* também induz um aumento da produção de EROs (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016), que pode reagir com o ácido araquidônico excessivo. Nossos resultados mostraram que os animais senis e infectados apresentaram níveis aumentados das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quando comparados aos seus controles, evidenciado o aumento na peroxidação lipídica.

A senescência desencadeou alterações no compartimento tímico, afetando etapas essenciais no desenvolvimento dos timócitos e exportação de células T para a periferia, com consequentes implicações diretas na competência imunológica do organismo.

## CONCLUSÃO

Com o presente estudo, conseguimos avançar na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas modificações da imunidade ao longo da vida e seus reflexos frente à doença de Chagas. Inúmeras alterações foram observadas, incluindo resposta imune ineficiente, aumento do estresse oxidativo e comprometimento no processo de maturação celular intratímica, os quais afetam etapas essenciais no desenvolvimento dos timócitos e exportação de células T para a periferia. Além disso, foram observadas mudanças no perfil da produção de citocinas, como TGF- $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-17 e TNF- $\alpha$ , que promoveram implicações diretas na competência imunológica do organismo. Os resultados deste trabalho são de grande importância na elaboração de futuras intervenções imunoterapêuticas que visem proporcionar ao hospedeiro um direcionamento eficiente da resposta imune durante a infecção. Portanto, estratégias que proporcionem a promoção da longevidade e o envelhecimento saudável são fundamentais diante do progressivo envelhecimento populacional e nítida inversão da pirâmide etária.

## AGRADECIMENTOS

À Amanda Goulart, Carlos Tirapelli, Cristiana Gonzalez, Fabiana Rossetto, Gabriel Tavares, Georgius, José Antunes, Natália Gonzaga e Pedro Sampaio pelas contribuições neste estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o processo de número 2014/ 00303-6 pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, P. Perspectiva psicossomática do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 6, n. 1, 2004.

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1961–1967, jun. 1996.

- AW, D.; SILVA, A. B.; PALMER, D. B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. **Immunology**, v. 120, n. 4, p. 435–446, 1 abr. 2007.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.
- BORASCHI, D. et al. The gracefully aging immune system. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 185ps8, 15 maio 2013.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, out. 1997.
- BUSTAMANTE, J. M. et al. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1407–1410, maio 2007.
- CANCRO, M. P. et al. B cells and aging: molecules and mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 7, p. 313–318, jul. 2009.
- CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584–595, dez. 2007.
- CHAIMOWICZ, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 184–200, abr. 1997.
- CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 27 jan. 2020.
- CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4807–4823, 19 ago. 2015.
- CHRISTENSEN, K.; VAUPEL, J. W. Determinants of longevity: genetic, environmental and medical factors. **Journal of Internal Medicine**, v. 240, n. 6, p. 333–341, 1996.
- COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, dez. 2013.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, jun. 2012.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, [s.d.].
- CRIGHTON, M. H.; PUPPIONE, A. A. Geriatric neutrophils: implications for older adults. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 22, n. 1, p. 3–9, fev. 2006.
- CRISTOFANON, S. et al. Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF-kappaB pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 1, p. 45–57, jan. 2009.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 1997.
- DIXIT, V. D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 4, p. 521–528, ago. 2010.
- DORIA, G.; FRASCA, D.; COVELLI, V. An Immunological Approach to Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 673, n. 1, p. 226–230, 1 dez. 1992.

FERREIRA, I. DE L. M.; SILVA, T. P. T. E. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507–509, out. 2006.

FRANCESCHI, C. et al. Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 11 Suppl 9, p. 18–25, 1996.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 7124–7128, nov. 1981.

HENG, T. S. P. et al. Effects of Castration on Thymocyte Development in Two Different Models of Thymic Involution. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 2982–2993, 1 set. 2005.

KIM, H. et al. TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 40, n. 2, p. 167–175, 30 abr. 2008.

KOCH, S. et al. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 6, p. 538–543, jun. 2006.

MACHADO-SILVA, A. et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 8–22, mar. 2016.

MAMELAK, M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 9, p. 1340–1360, set. 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. **Revista Espanola De Cardiologia**, v. 62, n. 11, p. 1211–1216, nov. 2009.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 304–317, 1 out. 2004.

MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 616–619, mar. 2010.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 13, p. 1133–1144, nov. 2004.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 477–481, dez. 1997.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–776, 27 ago. 2013.

OLIVERA, M. J. et al. Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185033, 26 set. 2017.

PALMER, D. B. The effect of age on thymic function. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 316, 7 out. 2013.

PASCUTTI, M. F. et al. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 58, n. 2, p. 173–179, ago. 2003.

PAWELEC, G. Immunosenescence comes of age. Symposium on Aging Research in Immunology: The Impact

of Genomics. **EMBO Reports**, v. 8, n. 3, p. 220–223, mar. 2007.

PEDRA, R. DE A. et al. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 13, n. 2, p. 5–9, 27 jun. 2011.

PHILLIPS, J. A. et al. IL-7 Gene Therapy in Aging Restores Early Thymopoiesis without Reversing Involution. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 8, p. 4867–4874, 15 out. 2004.

RODRIGUES COURA, J. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 0, 2 dez. 2014.

SANSONI, P. et al. The immune system in extreme longevity. **Experimental Gerontology**, Centenarians in Italy. v. 43, n. 2, p. 61–65, 1 fev. 2008.

SIMPSON, R. J. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise “make space”? **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 39, n. 1, p. 23–33, jan. 2011.

SOLANA, R.; PAWELEC, G.; TARAZONA, R. Aging and innate immunity. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 491–494, maio 2006.

STEINMANN, G. G.; KLAUS, B.; MÜLLER-HERMELINK, H.-K. The Involution of the Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 22, n. 5, p. 563–575, 1 nov. 1985.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, jan. 2005.

TARAZONA, R. et al. Basic biology and clinical impact of immunosenescence. **Experimental Gerontology**, v. 37, n. 2–3, p. 183–189, mar. 2002.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 28 ago. 2012.

URBINA, J. A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 1 jan. 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007.

VASTO, S.; MALAVOLTA, M.; PAWELEC, G. Age and immunity. **Immunity & Ageing: I & A**, v. 3, p. 2, 24 fev. 2006.

**WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 2 maio. 2018.

WICK, G. et al. Diseases of aging. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1567–1583, 25 fev. 2000.

**WHO | Ageing and health**. Disponível em: <<http://www.who.int/ageing-and-health/>>. Acesso em: 2 março. 2020.

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; LLEWELLYN, M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 459–466, out. 2011.

## O POLIMORFISMO DO GENE *GSTM1* EM PACIENTES COM ATEROSCLEROSE

Data de submissão: 05/03/2020

Data de aceite: 19/06/2020

### Isabela Barros Lima

Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC  
GOIÁS <http://lattes.cnpq.br/0004950121384212>

### Andreia Marcelino Barbosa

Universidade Federal de Goiás - UFG  
<http://lattes.cnpq.br/9545179392610539>

### Iasmim Ribeiro da Costa

Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC  
GOIÁS  
<http://lattes.cnpq.br/6222079384633182>

### Ulisses dos Santos Vilarinho

Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC  
GOIÁS  
<http://lattes.cnpq.br/6434981247292821>

### Lilian Castilho de Araújo Gianotti

Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC  
GOIÁS  
<http://lattes.cnpq.br/1620910829513276>

### Débora Acyole Rodrigues de Moraes

Universidade Federal de Goiás - UFG  
<http://lattes.cnpq.br/3417139129636566>

### Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC  
GOIÁS <http://lattes.cnpq.br/0087299570422353>

**RESUMO:** A aterosclerose é um problema de saúde pública no Brasil. É uma doença inflamatória, lenta e progressiva caracterizada

pela formação de uma placa de lipídio na parede da artéria (camada íntima). Técnicas moleculares estão sendo desenvolvidas nas últimas décadas para investigações biológicas. A superfamília da Glutathione S-Transferase (GST) são enzimas antioxidantes de fase II, responsáveis pela desintoxicação celular e na desintoxicação de xenobióticos tóxicos. Polimorfismos no gene *GSTM1*, pode levar a alterações nos níveis de hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol. As amostras a testes moleculares (PCR-AE), no Laboratório Replicon da PUC Goiás, para verificar presença de polimorfismo no gene *GSTM1*. Foi feita a extração do DNA e a amplificação das amostras. O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose e visualizado em seguida no VDS. Foi analisado a presença e a ausência do genótipo *GSTM1* em pacientes do grupo caso, que faziam o uso de estatina (n=80) e do grupo controle (n=100). Detectou-se no grupo caso que, 63,74% dos pacientes apresentavam o genótipo *GSTM1* e 36,25% apresentavam com o genótipo nulo. Assim como no grupo controle, no qual 60% dos pacientes tinham o gene presente e 40% o genótipo nulo, sendo o  $p=0,6171$ . Apesar desses achados, o estudo não mostrou significância entre a aterosclerose com o gene *GSTM1* e os sexos feminino e masculino.

**PALAVRAS-CHAVE:** aterosclerose, gene,

*GSTM1*, dislipidemia, estatina.

## THE POLYMORPHISM OF THE *GSTM1* GENE IN PATIENTS WITH AEROSCLEROSIS

**ABSTRACT:** Atherosclerosis is a public health problem in Brazil, an inflammatory disease, slow and progressive, characterized by the formation of a lipid plaque on the artery wall (intimate layer). Molecular techniques are being developed in recent decades for biological investigations. The superfamily of Glutathione S-Transferase (GST) are antioxidant enzymes of phase II, responsible for cellular detoxification and detoxification of toxic xenobiotics. Polymorphisms in the *GSTM1* gene, can lead to changes in the levels of hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol. Molecular test samples (PCR-AE), at the Replicon Laboratory at PUC Goiás, to check for the presence of polymorphism in the *GSTM1* gene. DNA extraction and sample amplification were performed. The product obtained was submitted to electrophoresis on an agarose gel and then visualized on the VDS. The presence and absence of the *GSTM1* genotype in patients in the case group, who used statins (n = 80) and in the control group (n = 100), was analyzed. In the case group, 63.74% of the patients had the *GSTM1* genotype and 36.25% had the null genotype. As in the control group, in which 60% of patients had the gene present and 40% the null genotype, with  $p=0.6171$ . Despite these findings, the study showed no significance between atherosclerosis with the *GSTM1* gene and the female and male sex. **KEYWORDS:** atherosclerosis, gene, *GSTM1*, dyslipidemia, statin.

## 1 | INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma enfermidade que se inicia por uma inflamação de forma lenta e progressiva, levando a cronificação. É definida por uma placa de lipídio que se acumula na parede da artéria, mais precisamente na camada íntima. É denominada como placa de ateroma ou placa aterosclerótica sendo diretamente proporcional a concentração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma. Este acontecimento, tem como consequência o impedimento ou bloqueio do fluxo sanguíneo (NAVARO E CONEGERO, 2002).

A placa aterosclerótica se estabelece por fatores associados e/ou exposições prolongadas dos mesmos. Se inicia por uma lesão no endotélio, levando a um aumento do fluxo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no local. Por conta desse grande fluxo de LDL, uma inflamação acontece no local e moléculas de adesão são produzidas. Macrófagos e monócitos deslocam-se para este local e envolvem as lipoproteínas (normalmente a LDL encontrada na parede do vaso) que liberam mediadores inflamatórios. A placa aterosclerótica é formada, estreitando o vaso e comprometendo o fluxo sanguíneo (GIROLDO, et al., 2007).

As consequências decorrentes da formação da placa de ateroma envolve doenças cardiovasculares que vão da doença coronariana, infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) até a insuficiência renal pela diminuição do fluxo sanguíneo (GOTTLIEB, et al., 2005).

A LDL é uma das lipoproteínas encontrados no plasma, juntamente com os quilomícrons

(de origem intestinal), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), de origem hepática e a lipoproteína de alta densidade (HDL). Em sua constituição observa-se pouca concentração de triglicérides, muito colesterol e apenas apoproteína B100. É uma lipoproteína retida pelos hepatócitos que estratificam o colesterol pela atuação da enzima acil-CoA colesteril aciltransferase (ACAT) (SIMÃO, et al., 2013).

A dislipidemia se caracteriza pela alteração dos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), LDL, HDL e triglicérides. Ela pode ser caracterizada como hipercolesterolemia isolada quando há aumento dos níveis de LDL ( $\geq 160$  mg/dL), hipertrigliceridemia isolada quando se aumenta os níveis de triglicérides ( $\geq 150$ mg/dL) e em hiperlipidemia mista quando ambos níveis estão elevados (SIMÃO, et al., 2013).

A aterosclerose pode ser tratada por medicamentos, sendo a estatina a mais prescrita. Ela se caracteriza por ser um inibidor competitivo da enzima 3-hidroxi-3- metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que age bloqueando a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, afetando a principal etapa da biossíntese do colesterol ocasionando o aumento da produção de receptores para o LDL e a depuração de lipoproteínas. Todos esses eventos geram a diminuição da concentração plasmática de LDL, de colesterol total, de triglicérides e aumenta a de HDL (NASSIF, et al., 2005; CAMPO E CARVALHO, 2007).

É vasto o número de genes que se envolvem com a aterosclerose e que desempenham diversas funções como a regulação da função endotelial, coagulação, inflamação, metabolismo dos aminoácidos, lipídios e hidratos de carbono (MARINKOVIĆ, et al., 2013; SÁ, 2011).

A superfamília da Glutationa S-Transferase (GST) são enzimas antioxidantes de fase II, que fazem o papel de desintoxicação celular e de xenobióticos tóxicos, metabolitos e produtos reativos de processos intracelulares (PINHEIRO, 2013; SAFARINEJAD, et al., 2010).

A superfamília  $\mu$  (GSTM) é composta por *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*. A *GSTM1*, se encontra no cromossomo 1p.13.3. Polimorfismos nela, pode acarretar alterações nos níveis de hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol e, quando se encontra nula, por uma ausência do gene e da sua função, gera alteração na atividade enzimática (MACIEL, et al., 2009; RODRIGUES, 2017; LOSI- GUEMBAROVSKI, et al., 2001).

## 2 | MATERIAS E MÉTODOS

Coletou-se sangue periférico de 80 paciente, entre outubro de 2014 a fevereiro de 2015, que eram assistidos pelo serviço de cardiologia e cirurgia vascular periférica, de Hospitais privados do município de Goiânia que tinham convênio com pacientes da rede privada e do Sistema Único de Saúde (SUS). Os pacientes já tinham diagnóstico de doença aterosclerótica e dislipidemia e faziam uso de estatinas. No grupo controle, analisou-se amostra de 100 pacientes sem doença e que não faziam uso de estatina.

O trabalho foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC GOIÁS,

número 35321614.3.0000.0037.

As amostras foram submetidas a testes moleculares, no Laboratório Replicon da PUC Goiás, para verificar presença do polimorfismo do gene *GSTM1*. Os critérios de inclusão foram: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos à procedimentos e vasculares intervencionistas, que aceitaram responder ao questionário e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). E os de exclusão foram: os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitaram participar da pesquisa.

Após a coleta, extraiu-se o DNA e iniciou a purificação das amostras, prosseguindo com as instruções do Kit GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, amostras foram submetidas à quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus, tendo relevância apenas os pacientes cujo os resultados da quantificação em relação a concentração de DNA foram superior a 5ng/μl.

Em seguida amplificou-se as amostras, para a detecção dos polimorfismos do gene *GSTM1*. Por fim, as reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 μl. O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose em um campo elétrico de 100 V/cm e corado com brometo de etídio (5mg/mL) sendo visualizado em seguida no Fotodocumentador BIORAD.

### 3 | RESULTADOS

Na tabela I, foi analisado a presença e a ausência do genótipo *GSTM1* em pacientes do grupo caso, que faziam o uso de estatina (n=80) e do grupo controle (n=100). Detectou-se no grupo caso que, 63,74% (n=51) dos pacientes apresentavam o genótipo *GSTM1* e 36,25% (n=29) apresentavam com o genótipo nulo. Assim como no grupo controle, no qual 60% (n=60) dos pacientes tinham o gene presente e 40% (n=40) o genótipo nulo, sendo o  $p=0,6171$ .

	GSTM1 PRESENTE		GSTM1 AUSENTE		TOTAL		p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>CASO</b>	51	63,74	29	36,25	80	100	
<b>CONTROLE</b>	60	60	40	40	100	100	0,6171

TABELA I - Distribuição do gene *GSTM1* nos grupos caso e controle

A tabela II, analisou-se a presença do gene *GSTM1* em relação ao sexo do paciente. No sexo masculino, houve uma prevalência maior em pacientes com o genótipo presente, sendo 71,43% (n=30) no grupo caso e 58,49% (n=31) no grupo controle. Em contrapartida, 28,57% (n=12) no grupo caso e 41,50% (n=22) no grupo controle apresentaram o genótipo nulo, com um  $p=0,1914$ .

Ainda na tabela II, no grupo caso e controle o genótipo presente apresentou

respectivamente, uma prevalência de 55,26% (n=21) e de 61,70% (n=29) em pacientes do sexo feminino. E, 44,73% (n=17) do grupo caso e 38,29% (n=18) do grupo controle, possuem o genótipo nulo para *GSTM1*, com um  $p=0,5487$ .

SEXO	GSTM1 PRESENTE		GSTM1 AUSENTE		TOTAL		p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>MASCULINO</b>							
<b>CASO</b>	30	71,43	12	28,57	42	52,5	
<b>CONTROLE</b>	31	58,49	22	41,5	53	53	0,1914
<b>FEMININO</b>							
<b>CASO</b>	21	55,26	17	44,73	38	47,5	
<b>CONTROLE</b>	29	61,7	18	38,29	47	47	0,5487

TABELA II - Distribuição do polimorfismo *GSTM1* em relação ao sexo nos grupos caso e controle caso e controle.

#### 4 | DISCUSSÃO

Para Girisha e colaboradores (2004) em um estudo feito com a população indiana analisando o gene *GSTM1* com a doença coronariana, também mostrou maior predomínio da presença deste gene com um  $p=0,6084$ . Assim como um estudo feito na Turquia por Taspinar e colaboradores (2012) o qual 58,2% (71/132) dos casos e 53,5% (76/151) dos controles possuíam *GSTM1*/presente e  $p=0,4460$ . Ambos corroborando com nosso estudo.

Em estudo sobre o polimorfismo do gene *GSTM1* em pacientes com aterosclerose (RODRIGUES, 2017), também houve um domínio da presença do gene no sexo masculino com 75,8% (69/91) nos casos e 60,4% (32/53) nos controles. Assim como no sexo feminino, 70,6% (77/109) nos casos e 59,6% (28/47) nos controles ambos não foram significativos com o  $p=0,5080$  e  $0,1763$  respectivamente, corroborando com este estudo. Da mesma forma, Maciel e colaboradores (2009), em um estudo realizado em Vitória-ES, encontraram 50,5% de presença do gene *GSTM1* em homens e 49,4% em mulheres. Na ausência do gene foi encontrado 49,5% em homens e 50,6% em mulheres com um  $p=0,685$ .

Wang (2012) em uma análise sobre a associação dos polimorfismos do gene *GSTM1* com risco de AVC isquêmico na população chinesa, observou-se resultados com maior prevalência do genótipo nulo no sexo masculino para os grupos caso (48,5%). Já no sexo feminino, foi observado um resultado contrário: maior prevalência no grupo controle (45,6%). Esse estudo não teve significância entre a relação do gene *GSTM1* em relação ao sexo ( $p=0,209$ ) corroborando com o nosso resultado.

Apesar de o estudo de Rodrigues (2017) apresentar uma maior prevalência de *GSTM1* presente, nos grupos caso e controle, com 72,5% (145/200) e 60% (60/100) respectivamente, se distanciou do nosso resultado, pois apresentou um  $p$  significativo de 0,0284. Turkanoglu e colaboradores (2010), em um estudo com uma população da Turquia que teve AVC isquêmico, apresentou maior prevalência de *GSTM1* nulo, com 50,6% (87/172) para caso e 56,2% (59/105) para controle. Em análise feita com nadadores da elite portuguesa,

observou-se maior prevalência do genótipo ausente, no grupo caso com 72% (24/33) e com  $p=0,010$  (DIAS, 2011). Todos os estudos não corroboraram com o presente estudo, que não apresentou significância em relação a presença do gene e o desenvolvimento da aterosclerose ( $p=0,6171$ ).

Em relação a prevalência do genótipo no sexo masculino Schreiber e colaboradores (2013) obtiveram predomínio de *GSTM1* presente em 49,3% (316/640) e ausente em 47,3% (316/668), corroborando com o estudo atual. Porém, no sexo feminino, obtiveram presença de 50,62% (324/640) e ausência de 52,6% (352/668), não respaldando nosso trabalho.

## 5 | CONCLUSÃO

Na análise da presença ou ausência do gene *GSTM1*, verificou-se nas tabelas que tanto o grupo caso quanto o grupo controle apresentaram maior porcentagem da presença do gene e, a diferença entre os dois grupos foi pequena. Apesar desses achados, o estudo não mostrou significância entre a aterosclerose com o gene *GSTM1* e os sexos feminino e masculino. Com isso, conclui-se também a necessidade de mais estudos e publicações para maior esclarecimento sobre o assunto.

## REFERÊNCIAS

CAMPO, Vanessa Leiria; CARVALHO, Ivone. **Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

DA LUZ GIROLDO, Marcieli; ALVES, Arienne Serrano; BAPTISTA, Francielle. **Doença aterosclerótica: uma patologia multi-fatorial**. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 2, n. 1, 2007.

DIAS, Ana Filipa Rebordão dos Santos. **Estudo da associação dos polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 null em nadadores de elite portugueses**. 2011. Tese de Doutorado.

GIRISHA, K. M. et al. **T1 and M1 polymorphism in glutathione S-transferase gene and coronary artery disease in North Indian population**. 2004.

GOTTLIEB, Maria GV; BONARDI, Gislaine; MORIGUCHI, EMÍLO H. **Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose**. Scientia Medica, v. 15, n. 3, p. 203-7, 2005.

LOSI-GUEMBAROVSKI, Roberta; MARA, I.; CÓLUS, D. S. **Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): distribuição étnica e relação com câncer [Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): ethnic distribution and relation with cancer]**. Semin Ci Biol Saúde, v. 22, p. 3-9, 2001.

MACIEL, Simone S. et al. **Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL-cholesterol**. Atherosclerosis, v. 206, n. 1, p. 204-208, 2009.

MARINKOVIĆ, Natalija; PAŠALIĆ, Daria; POTOČKI, Slavica. **Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis**. Biochemia medica: Biochemia medica, v. 23, n. 3, p. 255-265, 2013.

NASSIF, Melissa Calegario; HOPPE, Juliana; SALBEGO, Christianne Gazzana. **Colesterol, apoeε4 e estatinas: Implicações na doença de alzheimer**. Infarma-Ciências Farmacêuticas, v. 17, n. 5/6, p. 46-49,

2005.

NAVARRO, Siléa Calefi; CONEGERO, Celso Ivan. **Os fatores de risco da doença aterosclerótica.** *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 6, n. 3, 2002.

PINHEIRO, Denise da Silva et al. **Avaliação do polimorfismo de deleção de GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 2.** 2013.

RODRIGUES, D. A. et al. **GSTM1 polymorphism in patients with clinical manifestations of atherosclerosis.** *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017

ROSENDO, Alexandre B. et al. **Farmacogenética e efeito antiinflamatório dos inibidores da HMG-CoA redutase.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, n. 4, p. 520-525, 2007.

SÁ, Ana Carolina Marques. **O Papel dos Polimorfismos Genéticos na Doença Cardíaca Isquêmica.** 2011.

SAFARINEJAD, M. R.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. **The association of glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic male infertility.** *Journal of Human Genetics* (2010) 55, 565–570.

Schreiber, R.; Mill, J.G.; Krieger, J.E.; Pereira, A.C.; Jr., W.N. **Association Between Glutathione S-Transferase M1 Polymorphism and Urinary Sodium Excretion in a Brazilian Population.** *American Journal of Hypertension* 26(8) August 2013.

SIMÃO, Antônio Felipe et al. **I Diretriz brasileira de prevenção cardiovascular.** *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 101, n. 6, p. 1-63, 2013.

SIMONI M.; BAKKER AND KRAUSZ C. **EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions.** *State of the art 2004. international journal of andrology.* 2004; 27:240–249.

Taspinar et al. **Impact of Genetic Variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 Genes on the Risk of Coronary Artery Disease.** *DNA AND CELL BIOLOGY* Volume 31, Number 2, 2012.

TÜRKANOĞLU et al.. **Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk.** *Neurol Sci* (2010) 31:727–734.

VARGAS, Thayane Castelan; LIMBERGER, Jane Beatriz. **Tratamento farmacológico com estatinas: uma revisão sistemática.** *Disciplinarum Scientia Saúde*, v. 14, n. 2, p. 175-187, 2016.

Wang R, et al. **Association of glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms with ischemic stroke risk in the Chinese Han population.** *Neural Regeneration Research.* 2012;7(18):1420-1427.

## SÍFILIS GESTACIONAL: DESAFIOS ENFRENTADOS POR ENFERMEIROS E AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE DA ATENÇÃO PRIMÁRIA

Data de submissão: 20/05/2020

Data de aceite: 19/06/2020

**Viviane de Souza Brandão Lima**

Faculdade Integrada do Sertão, Serra Talhada,  
Brasil.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-2841-9028>

**Mary Kathleen Marques Xavier**

Faculdade Integrada do Sertão, Serra Talhada -  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0001-6149-2350>

**Tarciana Alves Menezes**

Faculdade Integrada do Sertão, Serra Talhada,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-1951-8363>

**Daniela de Aquino Freire**

Universidade de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-6708-5139>

**Thaís da Silva Oliveira**

Universidade de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-6461-201X>

**Juliana da Rocha Cabral**

Universidade de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-3827-996X>

**Andreza Cavalcanti Vasconcelos**

Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-2433-6997>

**Martha Sthefanie Borba Costa**

Universidade de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco.

Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-0918-3483>

**RESUMO: Introdução:** a sífilis é uma infecção causada pela bactéria (*Treponema pallidum*), que acomete todos os órgãos e sistemas. Mesmo com a eficácia do antibiótico para tratamento, a sífilis vem persistindo, sendo declarada como epidemia no Brasil. **Objetivo:** analisar os desafios enfrentados pelos profissionais de saúde na atenção primária. **Métodos:** Trata-se de uma pesquisa descritiva, transversal, com abordagem quantitativa realizada em Setembro de 2019. Utilizou-se um questionário com 12 questões objetivas que foram respondidas por 39 profissionais de saúde. **Resultados:** do total dos participantes, 69% afirmaram não existir grupo de gestante nas unidades de saúde, 72% das marcações para o pré-natal eram realizadas pelos ACS. 87% afirmaram fazer abordagem do parceiro, 69% disseram existir testes rápidos na unidade e orientação do uso de preservativos. Em relação a conduta do aconselhamento do pré-teste 100% afirmaram realizar e 85% afirmaram palestrar sobre infecções sexualmente transmissíveis. Dos 39 participantes, 79% relataram fazer encaminhamento dos pacientes para um centro de referência, 95% dos profissionais relataram

que a unidade não aplica a Penicilina, 51% desses afirmaram que a não realização era devido ao encaminhamento. Quanto ao manejo da sífilis, 41% relataram que a principal dificuldade é a resistência do parceiro na adesão ao tratamento. **Conclusão:** os profissionais seguem desempenhando suas atribuições, entretanto, a população apresenta resistência à procura dos serviços de saúde e tratamento, além de existir um déficit no manejo dos pacientes quando o teste rápido é positivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Gestação. Sífilis. Pré-natal. Tratamento.

## GESTATIONAL SYPHILIS: CHALLENGES FACED BY NURSES AND COMMUNITY HEALTH WORKERS IN PRIMARY CARE

**ABSTRACT: Introduction:** a type of infection caused by the bacteria (*Treponema pallidum*), which accommodates all organs and systems. Even with the efficacy of the antibiotic for treatment, syphilis has persisted, being declared an epidemic in Brazil. **Objective:** to analyze the challenges faced by health professionals in primary care. **Methods:** This is a descriptive, cross-sectional survey with a quantitative approach conducted in September 2019. Use a questionnaire with 12 objective questions that were answered by 39 health professionals. **Results:** total of participants, 69% declared that there was no group of pregnant women in the health units, 72% of the appointments for prenatal care were performed by the CHA. 87% said they approach the partner, 69% said they test quickly at the unit and use condoms. Regarding the conduct of pre-test counseling, 100% declare to perform and 85% declare to speak about sexually transmitted infections. Of the 39 participants, 79% reported referring patients to a referral center, 95% of professionals related to units not applied in Penicillin, 51% reported that they did not perform due to referral. As for the management of syphilis, 41% refer to the main difficulty and resistance to the partner in adhering to treatment. **Conclusion:** the professionals who perform their duties, however, have a population that is resistant to seeking health and treatment services, in addition to a deficit in the treatment of patients when the rapid test is positive.

**KEYWORDS:** Gestation. Syphilis. Prenatal. Treatment.

## INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção causada pela bactéria *treponema pallidum*, que acomete todos os órgãos e sistemas, progressivamente (CAVALCANTE, PEREIRA, CASTRO, 2017). A forma de contágio ocorre de diversas formas, com por via hematogênica, saliva contaminada, contato direto com a mucosa e com as lesões exantemáticas causadas pelo *treponema* e contato sexual desprotegido com pessoas contaminadas. Pode ser identificada como sífilis adquirida ou sífilis congênita, essa quando transmitida da mãe para o feto por via placentária. Sua progressão é dividida em três fases: primária, secundária e terciária (LAFETÁ et al, 2016).

Os meios mais utilizados para diagnosticar a sífilis são clínicos, laboratoriais e testes imunológicos. Todavia, os mais usados na prática são os testes treponêmicos e não

treponêmicos<sup>3</sup>. Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), a sífilis é um grave problema de saúde pública no Brasil. Em 2018, em comparação com o ano de 2017, observou-se um aumento de 25,7% na taxa de detecção em gestantes e de 5,2% na incidência de sífilis congênita, e em 2018 foram notificados no sistema de informações de agravos de notificação (SINAN) 62.599 casos de sífilis em gestante (BRASIL 2016; BRASIL 2019).

A sífilis gestacional (SG) tornou-se uma doença de notificação obrigatória no SINAN desde 2005, tendo em vista o aumento de sífilis congênita, que é responsável por 40% dos óbitos perinatais, além de causar aborto, parto prematuro e natimorto (BRASIL, 2016; COFEN, 2017; COELHO et al, 2018). Visto a esse cenário, o MS lançou campanhas destinadas à prevenção, diagnóstico e tratamento precoce da sífilis visando também alcançar as gestantes no pré-natal. Dessa forma, o profissional enfermeiro é fundamental para o êxito da eliminação dessa infecção através do rastreamento das gestantes, em conjunto com o agente comunitário de saúde (BRASIL, 2015; MIRAKIAN, et al; 2015).

No que se refere ao papel do enfermeiro no tratamento, a administração da penicilina benzatina pode ser realizada pelo mesmo na unidade básica de saúde segundo a portaria nº 3.161, de 27 de dezembro de 2011, além de sua prescrição ser uma das competências do enfermeiro, que dentre outras atribuições regulamenta a prescrição da penicilina benzatina pelo enfermeiro, conforme protocolos estabelecidos pelo MS (COFEN, 2017).

Dessa forma, tendo em vista a negligência dos pacientes e de suas parcerias sexuais com a infecção, faz-se necessário observar as ações dos profissionais de saúde no atendimento às gestantes, visto que a sífilis é uma infecção curável e seu tratamento é de fácil acessibilidade, porém, ainda existe uma alta incidência de sífilis no período gestacional e conseqüentemente a sífilis congênita.

Diante desse cenário, o objetivo do estudo foi analisar os desafios, frente à sífilis gestacional, enfrentados pelos profissionais de saúde na atenção primária. Espera-se, portanto, que o estudo possa contribuir cientificamente para profissionais de saúde, ou até mesmo a população em geral, mostrando como se dá o diagnóstico da sífilis, o esquema de tratamento, e servindo como forma de sensibilização sobre a problemática.

## MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa do tipo descritiva, transversal, com abordagem quantitativa. O estudo foi realizado na Cidade de Serra Talhada. A população foi composta por 8 enfermeiros e 31 agentes comunitários de Saúde que foram selecionadas pelo processo de amostragem aleatória simples, respeitando os critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos 8 enfermeiros e 31 ACS das unidades de Saúde, segundo os cálculos e excluídos 19 ACS por encontrarem-se de férias, licença, ou não responderam o questionário. As variáveis categóricas foram os profissionais, grupo de gestantes, captação das gestantes para o pré-natal, manejo da sífilis, acessibilidade de exames laboratoriais, uso de preservativos. A coleta de dados ocorreu em outubro de 2019, através de um questionário composta por 12

perguntas objetivas que abordaram questões a respeito das dificuldades encontradas pelos enfermeiros e agentes comunitários de saúde nas unidades básicas de saúde no tratamento da sífilis. Os dados obtidos foram tabulados e apresentados em forma de tabelas. A análise estatística foi feita de forma descritiva por meio de porcentagem, com gráficos e tabelas. Os aspectos éticos legais foram obedecidos de acordo com a Resolução N° 466/2012, 510/2016. O projeto foi aprovado através do parecer 3.604.349.

## RESULTADOS

Quando se fala em grupos de gestantes nas Unidades Básicas de Saúde, foi verificado que 100% dos enfermeiros entrevistados afirmaram possuir grupos do público alvo em sua unidade de saúde, contra apenas 19% dos Agentes Comunitários de Saúde.

Em relação a forma de captação das gestantes foi observado que 72% das marcações para as consultas de pré-natal das gestantes são realizadas pelos ACS, enquanto que 23% é a própria gestante que procura a unidade. Em relação à abordagem aos parceiros 87% dos profissionais afirmaram existir essa conduta, enquanto 13% não souberam informar sobre o assunto.

No que concerne à disposição de testes rápidos de sífilis para gestantes e parceiros, 69% dos profissionais afirmaram possuir testes rápidos em sua unidade, enquanto 31% às vezes. Em relação aos aconselhamentos pré-teste sobre o risco de sífilis na gestação, 100% dos profissionais entrevistados afirmaram realizar essa conduta na unidade de saúde.

Observamos na tabela 1 a descrição das condutas mais comuns adotadas pelos profissionais da atenção primária à saúde após teste positivo para sífilis, 79% destes afirmaram que as gestantes são encaminhadas a uma unidade de referência do município.

VARIÁVEL	N°	%
Inicia o tratamento sem solicitação do VDRL	2	5%
Solicita VDRL para definir tratamento	3	8%
Encaminha para outro profissional da própria unidade de saúde.	3	8%
Encaminha para uma unidade de referência.	31	79%
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>100%</b>

Tabela 1-Descrição das condutas adotadas se teste rápido positivo para sífilis nas Unidades Básicas de Saúde do Município de Serra Talhada PE, 2019

Na tabela 2 é possível observar informações sobre as práticas de educação em saúde realizadas na atenção primária do município em estudo, nota-se que 69% das unidades básicas de saúde prestam orientações sobre o uso de preservativos e 85% realizam palestras sobre as Infecções Sexualmente Transmissíveis.

VARIÁVEL	N	%
<b>Orientação quanto ao uso de preservativos para gestantes</b>		
Sim	27	69%
Não	3	8%
Não sei informar	9	23%
<b>Realização de palestras sobre infecções sexualmente transmissíveis</b>		
Sim	33	85%
Não	3	8%
Anualmente	2	5%
Semanalmente	1	2%
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>100%</b>

Tabela 2-Descrição das orientações quanto ao uso de preservativos pelas gestantes e realizações de palestras sobre Infecções Sexualmente Transmissíveis nas Unidades Básicas de Saúde do Município de Serra Talhada-PE, 2019

A tabela 3 apresenta dados referentes à distribuição e administração da penicilina benzatina na unidades de saúde. Foi observado que das unidades entrevistadas 95% referiram não realizar o tratamento para sífilis nas dependências da UBS. Destas, 51% afirmaram que o motivo para não administração da penicilina justifica-se pelo encaminhamento da gestante para uma unidade de referência.

VARIÁVEL	Nº	%
<b>A unidade aplica penicilina em suas dependências.</b>		
Não	37	95%
Não sei informar	2	5%
<b>Motivo pelo qual a UBS não prescreve o tratamento para sífilis.</b>		
Encaminha a gestante para unidade de referência.	20	51%
Não dispomos de penicilina Benzatina.	19	49%
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>100%</b>

Tabela 3- Descrição referente a distribuição e administração da penicilina benzatina nas unidades de saúde do Município de Serra Talhada- PE, 2019

O estudo revela ainda que das unidades entrevistadas nenhuma possuía no momento da entrevista a Penicilina benzatina utilizada para o tratamento da sífilis nas dependências da unidade de saúde. Segundo os profissionais, a ausência do medicamento justifica-se pela transferência dos casos para setores de referência no tratamento da sífilis do município.

Quando questionados sobre as principais dificuldades enfrentadas pelos profissionais no que diz respeito ao manejo da sífilis, 41% mencionou a dificuldade de adesão do parceiro ao tratamento como o principal obstáculo apresentado para o sucesso do tratamento. Outro impasse apresentado por 28% dos profissionais é a falta de Penicilina Benzatina nas unidades, enquanto 18% dos profissionais afirmaram não ter dificuldade com o manejo da

sífilis e apenas 10% expuseram que encontram dificuldades nas gestantes com início tardio do pré-natal.

Na experiência profissional dos entrevistados, ocorreu uma conformidade entre o percentual de profissionais que citam a resistência do parceiro ao tratamento de sífilis e a falta de penicilina como principais dificuldades para o tratamento da sífilis gestacional.

## DISCUSSÃO

Os grupos de gestante são significativas técnicas para promoção da saúde, reduzem as irregularidades durante a gestação, aumentam as probabilidades de maior êxito na amamentação, além de amenizar as inseguranças e dúvidas relacionadas à IST's, gestação e puerpério (RAMALHO, 2016). Contudo, observou-se no estudo uma divergência entre os percentis apresentados sobre a existência de grupos de gestantes nas UBS, segundo os enfermeiros e agentes comunitários de saúde. Ressalta-se a importância de uma equipe multiprofissional atuante e ativa na atenção primária no que diz respeito a educação em saúde nos diferentes grupos.

Uma pesquisa realizou um comparativo de resultados em estudos que abordavam a educação em saúde através de grupos de gestantes no pré-natal, foi possível observar que 80% dos estudos mostraram que os grupos de mães que receberam intervenções educativas apresentaram recém nascidos com menores prevalências de baixo peso ao nascer e prematuridade, além do início mais rápido e maior duração da prática do aleitamento materno exclusivo, reduzindo possíveis infecções (SILVA, 2016).

Observou no estudo que a maioria das consultas marcadas para as gestantes eram realizadas pelos ACS, esses possuem papel de suma importância nas ações realizadas na estratégia de saúde da família, pois através das visitas domiciliares realizadas é possível a realização de um mapa de saúde daquele território.

Diante disso, o ACS tem um papel fundamental na estratégia de saúde da família, são responsáveis pelo cadastramento de toda a população descrita naquela área e realizam o acompanhamento permanente das famílias. Dentre outras atribuições do ACS, destaca-se a responsabilidade com os moradores da sua microárea, acompanhamento do estado de saúde dos indivíduos, avaliação da vulnerabilidade social de algumas famílias, busca ativa dos faltosos, estabelecimento de vínculo da comunidade com a unidade básica de saúde. Entretanto, vale ressaltar que o dever do estado com a saúde não exclui o dever da comunidade em procurar os serviços de saúde disponibilizados através do Sistema Único de Saúde – SUS (BOVIOT, 2016).

O tratamento para Sífilis é disponibilizado pelo Ministério da Saúde e deve ser realizado por ambos parceiros. Pode-se observar no estudo uma grande dificuldade em relação ao tratamento dos parceiros das gestantes acompanhadas nas unidades de saúde analisada. Salienta-se a importância de se buscar, trazer esses indivíduos para a UBS, através de atividades voltadas à promoção da saúde.

Estudo realizado por Macêdo (2015) destaca a indispensável importância da abordagem das parcerias sexuais para o tratamento e a educação permanente em saúde. Nesta pesquisa, 87% dos profissionais enfermeiros e ACS afirmaram ser executada a abordagem do parceiro sexual da gestante com sífilis, todavia, um estudo realizado em Recife, detectou falhas na realização do tratamento devido negligência das gestantes e parcerias sexuais em procurar a unidade, o que pode possibilitar a reinfecção da gestante (RAMALHO, 2016).

Diante dessa resistência apresentada pelos homens em aderir aos tratamentos de saúde como se observou no presente estudo, outro estudo destaca que a cultura machista ainda é um fator culposo, neste aspecto, por alimentar a ideia de que os homens não adoecem e são “duros na queda”, essa cultura afeta diretamente a baixa procura dos homens aos serviços de saúde (ROCHA, 2014).

Na pesquisa em questão, 69% dos profissionais afirmou existir teste rápido nas unidades, um ponto muito positivo para o combate contra essa infecção e segundo dados do Ministério da Saúde (2016), o teste rápido de sífilis institui um importante instrumento para acelerar o rastreamento da infecção sífilítica. A introdução dos testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV e triagem de sífilis na Atenção Básica do Sistema Único de Saúde configura o conjunto de estratégias do Ministério da Saúde, que tem como objetivo a excelência e aumento do acesso da população brasileira ao diagnóstico do HIV e detecção da sífilis (BRASIL, 2016). Vale salientar que o diagnóstico da sífilis durante o período gestacional é de total importância para a minimização da transmissão vertical.

Nos resultados desse estudo, o encaminhamento das gestantes era adotado devido resistência dos profissionais, falta de penicilina nas unidades, e inexistência de um protocolo municipal para a realização do tratamento nas UBS. Em uma pesquisa realizada no Rio Grande do Norte, também acontecia o encaminhamento das gestantes com testes rápidos positivos para um centro de referência (CABRAL, 2017). Um estudo realizado evidenciou que existe resistência das gestantes em serem encaminhadas para os Centros de Testagem e Aconselhamentos-CTA, e isso dificultou em 55% a eficácia do tratamento (MORA, 2015).

Em se tratando de promoção à saúde, a educação em saúde se dá através de palestras de sensibilização e é de fundamental importância para que a comunidade possa ser informada sobre os riscos e maneiras de preveni-los no que diz respeito às infecções sexualmente transmissíveis, uma vez que as unidades básicas de saúde através dos profissionais têm um papel indispensável nesse fator visando o ensinamento das formas de contágio, a prevenção e tratamento. Esses devem começar na atenção primária e perpetuar-se por todo nível de complexidade de atendimento do SUS (PIEDRAHITA, et al, 2017).

A presente pesquisa mostrou que 69% das gestantes afirmaram receber orientações relacionadas ao uso do preservativo. Com isso, é necessário que seja orientado o uso de preservativo a todas as gestantes, principalmente àquelas portadoras da infecção durante e após o tratamento para evitar reinfecção (NASSER, et al., 2017).

Quando se fala da aplicabilidade da penicilina benzatina na unidade básica, o Ministério da Saúde regulamenta e recomenda a administração pela enfermagem em todas as unidades básicas de saúde da atenção primária (BRASIL, 2016). Porém, um estudo

realizado evidenciou que é rotina em diversas Unidades Básicas de Saúde não realizarem a administração da droga, e encaminharem os pacientes para receber assistência em outro serviço de referência de maior complexidade e com uma demanda de pacientes maior, isso representou uma limitação no tratamento e acompanhamento dos profissionais que faziam o pré-natal das gestantes, pois as taxas de abandono do tratamento foram de 81%, transferindo a gestante para outro local fora da unidade que já era realizado seu pré-natal, corroborando o estudo em questão (MASCARENHAS, 2016).

Em se tratando de adesão ao tratamento, um estudo com nove enfermeiras da Estratégia Saúde da Família do município de Sobral, Ceará, foi possível descrever as principais dificuldades encontradas na adesão dos parceiros das gestantes ao tratamento, as enfermeiras mencionaram o desconhecimento da doença, baixa condição socioeconômica, riscos e vulnerabilidades, terapia medicamentosa e seguimento do tratamento como fatores que prejudicam uma boa aceitação dos parceiros ao tratamento (VASCONCELOS, 2017).

Referente às marcações das consultas de pré-natal as marcações são realizadas em grande parte pelos ACS, mas vale salientar que o baixo percentual da demanda espontânea das gestantes, pode está relacionados a diversos fatores, dentre eles: distanciamento entre a UBS e moradia, comorbidades, mobilidade prejudicada, assim como acredita-se na existência de uma equipe de ACS extremamente ativa que se dispõe a realizar essas atividades àqueles que apresentam alguma limitação/dificuldade.

Outro fator que deve ser salientado é o não tratamento da sífilis nas gestantes e nos parceiros nas unidades. Os profissionais, diante da positivação do teste rápido de sífilis, possuem como rotina encaminhar todas as gestantes e parceiros para o Centro de referência CTA (Centro de Testagem e Aconselhamento) dificultando assim a adesão e conclusão ao tratamento. Barreira essa, reconhecida pelos profissionais durante a pesquisa. A operacionalização da proposta do Ministério da Saúde é realizar o tratamento da infecção nas unidades básicas de saúde, facilitando a adesão ao tratamento, ao acesso, e também tentando diligenciar o próprio estigma que é imposto aos centros de referência. Visto que a resistência dos parceiros ao tratamento foi uma das dificuldades expressadas pelos profissionais, entretanto, a atual dinâmica utilizada no manejo da sífilis dificulta o tratamento.

Em relação aos fatores positivos, observou-se a existência de palestras educativas sobre infecções sexualmente transmissíveis, orientações e incentivo quanto ao uso de preservativos e aconselhamentos sobre os riscos de sífilis na gestação antes da realização dos testes rápidos.

## CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo apontam as fragilidades e potencialidades da assistência pré-natal na Estratégia de Saúde da Família para a prevenção, diagnóstico, manejo e acompanhamento da sífilis gestacional no município de Serra Talhada. Contudo, verificou-se que as dificuldades atingem não somente os aspectos relativos à doença, mas também a

assistência pré-natal como um todo.

Como limitação do estudo está a realização em um único município, pois a abrangência pode mostrar resultados mais complexo diante do cenário que o Brasil vem vivenciando em relação a sífilis e medidas mais abrangentes possam ser realizadas, assim como reflexões acerca da importância do tema em questão.

Sugere-se a realização de mais avaliações da assistência pré-natal que contemplem a observação de consultas de pré-natal, análise dos registros nos cartões e/ou prontuários de gestantes atendidas na UBS e entrevista com as mulheres assistidas para verificar se as respostas fornecidas pelos enfermeiros e Agentes comunitários de saúde são de fato implementadas, além de rever o risco benefício do protocolo no Município de Serra Talhada em referenciar as gestantes e parceiros com testes positivo de sífilis ao centro de referência, pois já existe certo estigma em relação às infecções sexualmente transmissíveis, tornando uma barreira ainda maior para a adesão ao tratamento, uma vez que redirecionam os pacientes das unidades em que os mesmos já são acompanhados e os encaminham para um local com uma maior demanda e que se encontram mais distantes das suas rotinas.

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse relacionado a esse trabalho.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual técnico para diagnóstico da sífilis**. Brasília –DF, 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. **Boletim epidemiológico**. Brasília- DF, 2019. BOVIOT, A.B. A importância do agente comunitário de saúde para a Estratégia Saúde da Família: a Unidade Básica de Saúde com Saúde da Família de Saturnino Braga, em Campos dos Goytacazes, (RJ). 2016.

CABRAL, B.T.V; JANMILLI, C.D; SILVA, J.A; OLIVEIRA, D.A. Sífilis em gestante e sífilis congênita: um estudo retrospectivo. **Revista Ciência Plural**, v. 3, n. 3, p. 32-44, 2017.

CAVALCANTE, P.A.M; PEREIRA, R.B.L; CASTRO, J.G.D. Sífilis gestacional e congênita em Palmas, Tocantins, 2007-2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, p. 255-264, 2017.

COFEN- Conselho Federal de Enfermagem. Nota técnica cofen/ctln nº 03/2017 de 14 de junho 2017. Dispõe sobre administração de penicilina.

COELHO, J.M.R; DANTAS, F.C.S; PENA, T.G, BARBOSA, J.J; COSTA, C.M; FERREIRA, L.I; MEIRE, F.B. Sífilis:um panorama epidemiológico do Brasil e do município de Volta Redonda/RJ. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 1, n. 1, p. 128-147, 2018.

LAFETÁ, K.R.G; JUNIOR, H.M; SILVEIRA, M.F; PARANAÍBAL, L.M.R. Maternal and congenital syphilis, underreported and difficult to control. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 19, n. 1, p. 63-74, 2016.

MACÊDO, V.C. Sífilis gestacional:fatores de risco sociodemográficos, comportamentais e assistenciais [Tese]. Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal de Pernambuco; Recife, (PE). Brasil 2015.

MASCARENHAS, L.E.F; ARAÚJO, M.S.S; GRAMACHO, R.C.C.V. Desafios no tratamento da sífilis gestacional. (BA). Brasil. 2016.

- MIRAKIAN, R.; LEECH, S.C; KRISHNA, M.T; RICHTER, A.G; HUBER, P.A; FAROOQUE, S. et al. Clark1andS.of allergy to penicillins and other beta-lactams. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 2, p. 300-327, 2015.
- MORA, C.; MONTEIRO, S.; MOREIRA, C.O.F. Training, practices and paths of counselors at HIV testing centers in Rio de Janeiro, **Brazil. Interface (Botucatu) [online]**. v. 19, n. 55, p. 1145-56, 2015.
- NASSER, M.A; NEMES, M.I.B.; ANDRADE, M.C; PRADO, R.R; CASTANHEIRA, E.R.L. Avaliação na atenção primária paulista: ações incipientes em saúde sexual e reprodutiva. **Revista de Saúde Pública**. v. 5, p. 1-12, 2017.
- PIEDRAHITA, L.B; MOYA, P.; ZAPATA, I.C.P.; ROMÁN, V.B. Concepto sociocultural del VIH y su impacto en la recepción de campañas de promoción de la salud en Medellín. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 15, n. 1, p. 59-70, 2017.
- RAMALHO, M.O.A. Avaliação da assistência pré-natal com ênfase na sífilis gestacional na estratégia de saúde da família do Recife. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. (PE). Brasil, 2016.
- ROCHA, A.F.B. Aspectos que dificultam o tratamento do parceiro sexual de gestantes com sífilis em Fortaleza, Ceará [Dissertação]. Mestrado em Saúde Coletiva, Universidade de Fortaleza; (CE) 2014.
- SILVA, E.P.; LIMA, R.T.; OSÓRIO, M.M. Impacto de estratégias educacionais no pré-natal de baixo risco: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 2935-2948, 2016.
- VASCONCELOS, M.I.O.; OLIVEIRA, K.M.C.; MAGALHÃES, A.H.R.; GUIMARÃES, R.X; LINHARES, M.S.C; QUEIROZ, M.V.O; ALBURQUERQUE, I.M.N. Sífilis na gestação: estratégias e desafios dos enfermeiros da atenção básica para o tratamento simultâneo do casal. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, p. 85-92, 2017.

## OCORRÊNCIA DE FORAMINIFERA (PROTOCTISTA, GRANULORETICULOSA) NA PRAIA DE ITAGUÁ, UBATUBA, SP

Data de submissão: 06/03/2020

Data de aceite: 19/06/2020

### Paulo Sergio de Sena

Centro Universitário Teresa D'Ávila – Unifatea.  
Mestrado Profissional Design, Tecnologia e  
Inovação; Licenciatura em Biologia. C.Lattes -  
<http://lattes.cnpq.br/9437851648445646>, ORCID  
- <https://orcid.org/0000-0003-1258-7112>

### Ana Paula Barros de Jesus

Centro Universitário Teresa D'Ávila – Unifatea.  
Licenciatura em Biologia. C.Lattes - <http://lattes.cnpq.br/7153648729175663>

**RESUMO:** Inúmeros são os fatores que condicionam a distribuição geográfica dos foraminíferos. O trabalho objetivou avaliar a ocorrência destes protozoários na praia de Itaguá, Ubatuba, São Paulo, tendo em vista a sua balneabilidade, conferindo a esta praia o status de imprópria para banho e recreação durante o ano todo. Foram realizadas trinta coletas de sedimentos de praia, em dez dias diferentes, em três pontos distintos; balizadas pela linha da maré e horário fixo diário. Foram triados oito exemplares. Essa baixa quantidade e diversidade de Foraminíferos podem estar relacionadas a fatores antrópicos como influxo dos rios locais que recebem esgotos não tratados dos bairros próximos e o uso da praia para atividades de ancoragem de pequenas

embarcações.

**PALAVRAS-CHAVE:** Foraminíferos, Ubatuba, Itaguá.

### OCCURRENCE OF FORAMINIFERA (PROTOCTIST, GRANULORETICULOSA) AT THE BEACH OF ITAGUÁ, UBATUBA, SP

**ABSTRACT:** Numerous factors that condition the geographical distribution of foraminifera. The work aimed to evaluate the occurrence of these protozoa on Itaguá beach, Ubatuba, São Paulo, Brazil, in view of its bathing, giving this beach the status of unsuitable for bathing and recreation throughout the year. Thirty collections of beach sediments were carried out, on ten different days, at three different points; marked by the tide line and fixed daily schedule. Eight specimens were screened. This low quantity and diversity of Foraminifera may be related to anthropic factors such as influx of local rivers that receive untreated sewage from nearby neighborhoods and the use of the beach for anchoring small boats.

**KEYWORDS:** Foraminifers, Ubatuba, Itaguá.

## 1 | INTRODUÇÃO

A Classe Foraminiferida pertence atualmente ao Filo Granuloreticulosa e ao Reino

Protoctista (CARVALHO, 2004; BATISTA et al. 2007; PIANNA et al. 2011), é constituída por indivíduos unicelulares, eucariontes, heterótrofos e em geral microscópicos (SEMENSATTO JR e DIAS-BRITO, 2000; CAMACHO, 2004) se locomovem por pseudópodes (reticulópodes, especificamente) formados por microtúbulos (STORER et al., 1979; RUPPERT et al., 2005). Em geral, são organismos de vida livre, alguns parasitas e outros com hábitos alimentares variados: detritívoros, suspensívoros, bacteriófagos, onívoros, mutualistas ou comensalistas, estes dois últimos ocorrem por associação com organismos fotossintetizantes (ZERFASS e ANDRADE, 2008; YAMAGAMI, 2013).

Eichler et al (2007) (apud Gonçalves, 2013), evidenciou que para os estudos ecológicos esse grupo passou a ter grande importância devido à sua abundância, alta sensibilidade às mudanças ambientais e boa preservação das tecas. A autora declarou também que por meio de análises quantitativas é possível monitorar e reconhecer mudanças na interface água-sedimento.

O estudo da poluição marinha tem como primeira etapa a avaliação ou caracterização da qualidade ambiental, etapa que é fundamental também para monitoramento e recuperação ambiental (BONETTI, 2000 apud MORAIS e MACHADO, 2003). Araújo e Machado (2008) ressaltaram a importância do estudo destes organismos em vários âmbitos das Ciências Ambientais, sendo evidente a sua valia como indicadores ecológicos, geológicos e paleoceanográficos.

Outro elemento importante para este trabalho foi o conceito de balneabilidade, que segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (2017), “...é a qualidade das águas destinadas à recreação de contato primário”. Para se classificar a praia quanto sua balneabilidade, em termos sanitários, usa-se como parâmetro indicador básico a densidade de coliformes fecais. Uma praia constantemente considerada imprópria para banho é a Praia do Itaguá, localizada na baía de Ubatuba, SP. O município é conhecido por suas belezas naturais e por possuir muitas casas de veraneio, de segunda moradia. Estima-se uma população flutuante de cerca de 100.000 pessoas durante as férias escolares (INSTITUTO-PÓLIS, 2013). Para Rocha (2009) 88% da população do município não é atendida por rede geral de esgoto, o que implica diretamente na balneabilidade das praias. Diante dessa perspectiva, buscou-se avaliar quantitativamente a ocorrência de Foraminifera na Praia de Itaguá, avaliando possíveis impactos ambientais na região, como subsídio para Programas de Monitoramento Ambientais.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Durante dez dias, em três pontos diferentes, equidistantes por aproximadamente vinte metros, foram recolhidos dez gramas de sedimento. As amostras foram recolhidas observando-se a linha da maré, em cada dia, no mesmo horário (07h e 20 minutos) e armazenadas em frascos plásticos de 100 ml. Os pontos de amostragem estão demonstrados na Tabela 1.

Pontos	Latitude	Longitude
1	23° 27' 3,16" S	45° 3' 53,98" W
2	23° 27' 3,73" S	45° 3' 53,55" W
3	23° 27' 4,38" S	45° 3' 53,05" W

Tabela 1 - Localização dos pontos de referências de amostragem

Fonte: dos autores, 2018

Após a coleta, foi adicionado formol 10% às amostras até que fossem totalmente permeadas pelo líquido. No laboratório cada amostra foi passu por procedimentos de triagem, realizada com a utilização de uma lupa binocular BIOFOCUS modelo LM300B.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 60 gramas triadas, em dez coletas e em três pontos de amostragem foram encontrados oito exemplares, correspondendo à abundância de 0,13 (Tabela 2 e Figura 1).

Data	Coeficiente de Maré	Altura maré	Balneabilidade	Quantidade pontos Amostragem			por de
				1	2	3	
21/12/16	45	0,7	Imprópria	0	0	0	
22/12/16	45	0,7	Imprópria	0	0	0	
23/12/16	49	0,6	Imprópria	0	0	0	
28/12/16	78	0,3	Imprópria	0	0	0	
29/12/16	81	0,3	Imprópria	0	0	0	
30/12/16	82	0,4	Imprópria	1	5	0	
31/12/16	80	0,5	Imprópria	0	1	0	
01/12/17	78	0,5	Imprópria	0	0	0	
02/12/17	73	0,6	Imprópria	0	0	0	
03/12/17	68	0,6	Imprópria	0	1	0	

Quantidade de Foraminíferos encontrados em relação ao coeficiente de maré, altura da aproximada da maré no horário da coleta e à balneabilidade

Fonte: dos autores, 2018

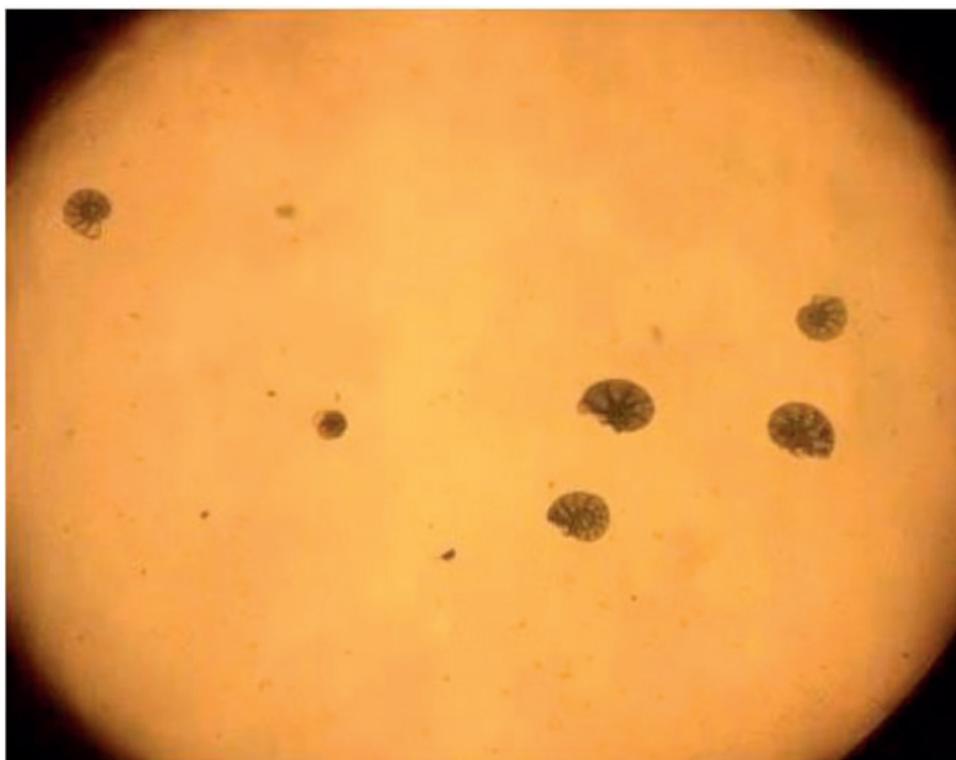


Figura 2 - Exemplares de Foraminíferos encontrados na Praia do Itaguá, SP, sob lupa binocular modelo LM300B, 50X

Fonte: dos autores, 2018.

Burone e Vanin (2006) estudaram a baía de Ubatuba, SP e encontraram, na parte interna, mais próxima à foz dos rios, uma comunidade predominantemente constituída por *Ammonia tepida*. Esse sub-ambiente demonstrou estar sob condições ambientais instáveis, segundo os mesmos autores, consequência do influxo dos rios locais. A entrada de nutrientes, provenientes desses rios, provavelmente, favorece o crescimento de microalgas que são alimento de foraminíferos como *Ammonia tepida*, considerados oportunistas. O domínio desta espécie está relacionado com baixos níveis de diversidade. *Ammonia tepida* possui alta adaptabilidade para sobreviver em ambiente instável. Dessa forma, ratificou-se a presença de foraminíferos na região de estudo e validou a pesquisa de ocorrência na área.

Henriques et al. (2012) ao estudarem os foraminíferos atuais do litoral de Benguela (Angola) não obtiveram qualquer carapaça em duas das cinco amostras coletadas, relacionando esta ausência a fatores antrópicos como a contaminação das águas por resíduos urbanos, poluentes provenientes de adubos agrícolas, ou mesmo as correntes costeiras que levam estes sedimentos de uma praia a outra. Essa constatação antrópica se mostrou semelhante ao local de amostragem desse trabalho, bem como a ausência de espécies. Acrescenta-se ainda a semelhança da taxa de ocorrência quando esses mesmos autores apresentaram, em quantidades de amostras muito semelhantes ao trabalhado aqui, e encontraram nas três primeiras amostras a abundância de 1,3; 0,2 e 5,7 de foraminíferos por grama triada.

Martins et al. (2010) mostraram que o elevado índice de matéria orgânica produz condições tóxicas e causa a redução do pH, que, respectivamente, limitam a ocorrência de

muitas espécies e pode causar a dissolução de tecas carbonatadas. Esses fatores acrescidos de misturas de contaminantes acarretam, por tornar o ambiente como de risco, estados de stress, causando anormalidades e baixa diversidade entre os foraminíferos. Fatos estes que corroboram para pensar a ausência de foraminíferos na Praia do Itaguá, Ubatuba, SP, tratado por este trabalho.

## 4 | CONCLUSÃO

A baixa quantidade de foraminíferos encontrada nesta praia pode ser um indicativo de um ambiente instável e que demanda preocupação quanto à balneabilidade e usos do produto turístico praia. Na sequência do trabalho, há o esforço para a identificação das espécies encontradas, contribuindo para traçar a dinâmica populacional de foraminíferos na baía de Ubatuba. Este trabalho também contribui, como subsídio, em programas de recuperação de balneabilidade de praias urbanas, bem com para a região e seu ecossistema marinho.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, T. M. F., MACHADO, A. J. M. Eventos bioestratigráficos, paleoclimáticos e paleobatimétricos do talude continental superior da Bahia, evidenciados através do estudo da fauna dos Foraminíferos. **Gravel**, v.6, p. 27- 45, 2008.
- BATISTA, D. S., VILELA, C. G.; KOUTSOUKOS, E. A. Influência dos fatores ambientais na preservação da microfauna de foraminíferos bentônicos no ambiente recifal dos Parrachos de Maracajaú, RN, Brasil. **Anuário do Instituto de Geociências**. v. 30, p. 92-103, 2007.
- BURONE, L., VANIN, A. M. S. P. Foraminiferal assemblages in Ubatuba Bay, south-eastern Brazilian coast. **Scientia Marina**, v. 70, n. 2, p. 203-217, 2006.
- CARVALHO, I. S. Microfósseis Calcários. **Interciência**, v. 2, p. 388-391, 2004.
- CAMACHO, S. **Evolução paleoambiental holocénica dos estuários dos rios Guadiana e Arade com base nas associações fósseis de foraminíferos bentônicos**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Algarve, Portugal, p.131, 2004.
- CETESB. Mapa de qualidade das praias. Disponível em: <http://qualipraia.cetesb.sp.gov.br/qualidade-da-praia/ubatuba.phtml>. Acessado em: 21/02/2017.
- GONÇALVES, R. F. **Foraminíferos em testemunho do manguezal do Canal de Bertioga (SP): padrões de estrutura de comunidades aplicáveis em reconstruções paleoambientais**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, p. 25, 2013.
- HENRIQUES, M. H., CANALES, M. L., MBADU, E. Foraminíferos atuais do litoral de Benguela (Angola): diversidade e implicações ecológicas. In: \_\_\_\_\_ **Para conhecer a Terra: memórias e notícias de Geociências no espaço lusófono**, Coimbra, p. 199-208, 2012.
- INSTITUTO-PÓLIS. Resumo Executivo de Ubatuba. **Litoral Sustentável**, 1-23, 2013.
- MARTINS, V., DA SILVA, E. F., SEQUEIRA, C., ROCHA, F., DUARTE, A. C. Evaluation of the ecological effects of heavy metals on the assemblages of benthic foraminifera of the canals of Aveiro

(Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, V. 87, n. 2, p. 293-304, 2010.

PIANNA, B. R., ARAÚJO, T. M. F., & MACHADO, A. J. Bioestratigrafia e eventos paleoclimáticos do talude continental inferior localizado em frente à Praia do Forte, Bahia, Brasil. **Gravel**, V. 9, n. 1, p. 25-40, 2011.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S. BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed. Editora Roca, São Paulo, p. 10-100, 2005.

ROCHA, T. D. C. F. **Mapeamento da sensibilidade ambiental do litoral de Ubatuba-SP a vazamentos de petróleo**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, p.184, 2009.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S. BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed. Editora Roca, São Paulo, p. 10-100, 2005.

SEMENSATTO JR, D. L. **O sistema estuarino do delta do São Francisco-SE: análise ambiental com base no estudo de foraminíferos e tecamebas**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, p. 223, 2006.

SEMENSATTO JR, D. L., DIAS-BRITO, D. Foraminíferos recentes do delta do Rio São Francisco, Sergipe (Brasil): uma proposta de modelo ecológico e de diagnóstico ambiental. **Congresso Brasileiro De P&D Em Petróleo & Gás**, n. 2, p. 1-6, 2000.

STORER, T. I, USINGER, R. L., STEBBINS, R. C. **Zoologia geral**, p. 10-100, 1979.

ZERFASS G.S.A., ANDRADE E.J. Foraminíferos e Bioestratigrafia: uma abordagem didática. **Terrae Didatica**, V. 3, n. 1, p. 18-35, 2008.

## INTERAÇÃO DE LECTINAS DE TOXOPLASMA GONDII COM RECEPTORES DO TIPO TOLL DE CÉLULAS NATURAL KILLER

Data de aceite: 19/06/2020

**Irislene Simões Brigo**  
**Cássia Aparecida Sebastião**  
**Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**  
**Maria Cristina Roque Antunes Barreira**  
**Camila Figueiredo Pinzan**

**RESUMO:** A toxoplasmose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), infecta as células do hospedeiro de maneira ativa, a partir de um processo que envolve necessariamente a liberação de lectinas, denominadas proteínas de micronema de *T.gondii* (TgMICs). Dentre essas proteínas, TgMIC1, TgMIC4 e TgMIC6 são responsáveis por formar um complexo na superfície de *T. gondii*, que permite a adesão do parasito à célula hospedeira, via domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs), uma vez que TgMIC1 liga-se à ácido siálico terminal e TgMIC4 à galactose terminal. A presença de glicanos associados a receptores do tipo *Toll* (TLRs) motivou a hipótese de que eles correspondessem a alvos de reconhecimento pelos CRDs das TgMICs. Essa hipótese se confirmou através de estudos recentes, nos quais constatou-se que TgMIC1 e TgMIC4 ativam TLR2 e TLR4, em presença ou ausência de co-receptores e moléculas acessórias. Adicionalmente, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos,

estimulados com as TgMICs, mostraram-se capazes de produzir elevados níveis da citocina 12 (IL-12), produção esta, dependente de TLR2 e TLR4. A produção de IL-12 é crítica durante a infecção por *T. gondii*, porque induz células T e *natural killer* (NK) a produzir outras citocinas, tais como *interferon-gama* (IFN-g) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que desempenham um papel crucial na proteção do hospedeiro. Células NK são grandes produtoras de IFN-g, embora o mecanismo pelo qual elas são ativadas durante a infecção por *T. gondii* não seja totalmente esclarecido. Sabe-se também, que células NK possuem receptores da família *Toll-Like*, tais como, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR6. Sendo assim, o objetivo central desse trabalho foi avaliar se as TgMICs interagem, através de seus CDRs, com receptores Toll-Like na superfície de células NK, levando a sua ativação e produção de citocinas essenciais para a resistência ao parasito. Nossos resultados demonstram que as formas nativas das proteínas de micronema TgMIC1 e TgMIC4 preservaram sua atividade lectínica, bem como as proteínas com CDRs mutados reduziram a ligação às glicoproteínas específicas. Além disso, as TgMICs foram capazes de interagir com receptores superfície das células NK via CDRs, induzindo produção de IFN-g e TNF- $\alpha$ , conhecidamente importantes na proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii*.

Demostramos também, através de ensaios de transwell, que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos quando ativados com as TgMICs produzem fatores solúveis (principalmente IL-12) que potencializam a ativação e produção de citocinas por células NK. Além disso, demonstramos que a ativação e produção de IFN-g e TNF- $\alpha$  por células NK induzidas pelas proteínas de micronema é dependente da ativação dos receptores do tipo Toll 2 e 4. Portanto nosso trabalho trás informações adicionais para o melhor entendimento do processo de infecção parasitária e da resposta imunológica gerada por antígenos de *T. gondii*.

**ABSTRACT:** Toxoplasmosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), infects host cells actively, a process that necessarily involves a release of lectins, called *Toxoplasma* microneme proteins (TgMICs). TgMIC1, TgMIC4, and TgMIC6 form a complex on the *T. gondii* surface, which allows adhesion of the parasite to the host cell, through recognition of carbohydrates, since TgMIC1 binds to terminal sialic acid and TgMIC4 to terminal galactose. The occurrence of glycans associated with Toll-like receptors motivated the hypothesis that they could be targets for the Carbohydrate Recognition Domains (CRDs) of TgMICs. This hypothesis was confirmed by recent studies, in which TgMIC1 and TgMIC4 activate TLR2 and TLR4 in the presence or absence of co-receptors and accessory molecules. Additionally, TgMIC1 and TgMIC4 also induces IL-12 production, in TLR2 and TLR4 dependent way. IL-12 production is critical during *T. gondii* infection because induces T and natural killer (NK) cells to produce interferon-gamma (IFN-g) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), which plays a crucial role in host protection. NK cells are an essential source of IFN-g, although the mechanism by which they are activated during *T. gondii* infection is partially known. Besides, studies demonstrate that NK cells can encode members of the Toll-like receptor family, such as TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6. Therefore, the main objective of this work was to evaluate if the TgMICs interact through their lectin domains with Toll-Like receptors of NK cells, leading to their activation and production of cytokines for *T. gondii* resistance. Thus, our results show that the native forms of the microneme proteins (TgMIC1 and TgMIC4) purified by us preserved their lectin activity, as well as proteins with mutated CDRs, reduced their rate of binding to specific glycoproteins. Also, TgMICs were able to interact with NK cell surface receptors, through CRDs, and inducing the production of IFN-g and TNF- $\alpha$  cytokines. We have also demonstrated through transwell assays that bone marrow-derived macrophages from WT mice when activated with TgMICs, produce soluble factors (mainly IL-12) that enhance the activation and production of cytokines by NK cells. Furthermore, we demonstrated that the production of IFN-g and TNF- $\alpha$  by NK cells induced by microneme proteins is dependent on the activation of Toll-Like 2 and 4 receptors. So, in summary, our work brings some light for a better understanding of the parasite infection and the immune response generated by *T. gondii* antigens.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**Jesus Rodrigues Lemos:** Possui Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí, Mestrado em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Pernambuco, Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica) pela Universidade de São Paulo e Pós-Doutorado no Royal Botanic Gardens, Kew, Londres. Desenvolve pesquisas na área de Botânica, com ênfase em Florística, Fitossociologia, Fitogeografia e Etnobotânica com a vegetação do semiárido brasileiro. Atualmente é Professor Associado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba-UFDPAr/Campus Ministro Reis Velloso, onde ingressou em março de 2007.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Aedes Aegypti 111, 112, 113, 114, 115

Agrotóxicos 60, 95, 97, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260

Anatomia foliar 16, 26

Antifúngicos 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 107, 108

Antimicrobiana 52, 54, 108, 192, 195, 197, 198, 199, 200, 203, 205, 206

Aprendizagem 29, 39, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 142, 150

Aterosclerose 272, 273, 274, 275, 276, 277

Atta 1, 2, 4, 5, 14, 15

### B

Besouro 60, 61, 90

Botânica 26, 28, 30, 38, 40, 47, 58, 111, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 297

### C

Caatinga 45, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 75, 77, 81, 83, 84, 85, 92, 95, 111, 112

Câncer 154, 170, 185, 188, 190, 211, 219, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 258, 259, 277

Cárie dentária 192, 193, 194

Comunidade rural 55, 81, 83, 85

Conhecimento tradicional 9, 83, 84, 85, 90

Croton sp. 111, 112, 113

### D

Diabetes 174, 175, 181, 182, 183, 235, 236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 278

### E

Educação básica 119, 127, 129, 139

Educação não formal 28

Endometriose 184, 185, 186, 190

Ensino de biologia 10, 116, 132, 139

Envelhecimento 153, 154, 155, 160, 161, 184, 190, 261, 262, 264, 265, 266, 267, 268

Estreptozotocina 235, 236, 237, 238, 241, 245

### F

Foraminíferos 289, 291, 292, 293, 294

Formiga 5, 7, 89, 94

## G

Gene 14, 55, 82, 165, 166, 167, 168, 172, 182, 224, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278

Germoplasma 41, 42, 43, 44, 45, 52, 53, 54, 55

Gestação 211, 237, 238, 241, 245, 263, 280, 282, 284, 286, 288

## L

Lectinas 295

Lentinula edodes 235, 236, 237, 238, 239, 241, 242, 243, 244, 245, 246

Leucemia 166

## M

Material didático 42, 127, 135, 138, 139

Meio ambiente 26, 44, 60, 85, 97, 112, 141, 142, 143, 145, 146, 147, 148, 150, 196, 212, 219, 250, 252, 254, 255, 257, 259

Mutação 165, 166, 167, 168, 170, 171, 189, 224, 227, 228

## O

Obesidade 181, 230, 231, 232, 233, 234

Óleos essenciais 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 112

## P

Pesticida 68

Pilosocereus gounellei 75, 76

Planta hospedeira 56, 59

Plataforma vibratória 230, 231, 232, 233, 234

Proteínas 152, 157, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 184, 185, 186, 188, 189, 194, 195, 196, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 228, 237, 239, 267, 295, 296

Protoctista 289, 290

## Q

Qualidade da água 114

## S

Saúde humana 97, 112, 253, 254

Saúde pública 211, 212, 219, 237, 250, 251, 254, 261, 269, 271, 272, 281, 288

Sementes 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 134

Sífilis 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288

Sistema imune 98, 100, 154, 263, 264, 265, 266, 267

Sustentabilidade 141, 142, 143, 144, 146, 149

## T

Telômeros 155, 156, 157, 160, 185, 186, 188, 189, 190

Tolueno 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219

Toxoplasma gondii 295, 296

Trypanosoma cruzi 261, 262, 268, 269, 270, 271

## U

Uncaria tomentosa 173, 175, 176, 177, 178, 180, 181

## V

Vigna unguiculata 68

 **Atena**  
Editora

**2 0 2 0**