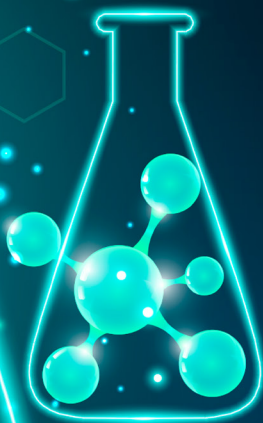


Atena
Editora
Ano 2021

A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

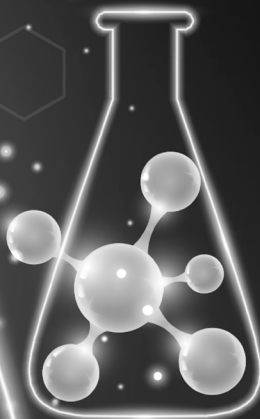
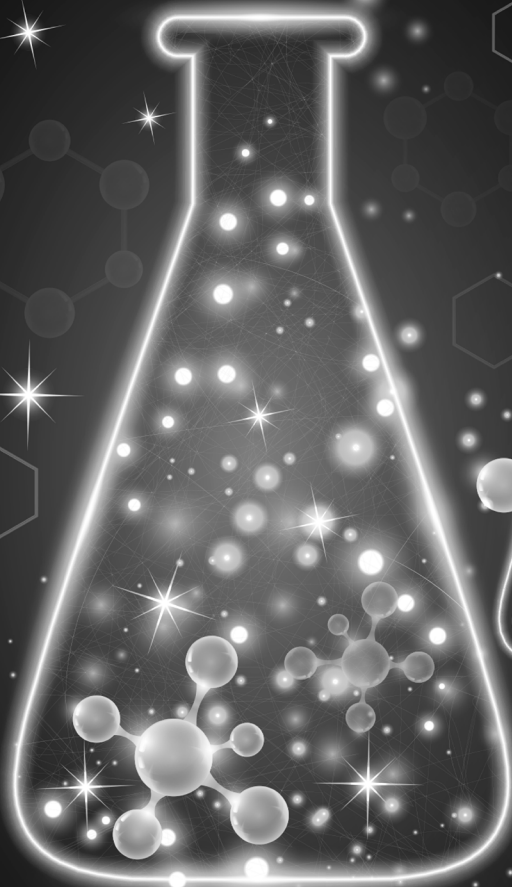
**Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos
(Organizadores)**



Atena
Editora
Ano 2021

A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

**Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos
(Organizadores)**



Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. 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.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

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

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Prof^ª Dr^ª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof^ª Dr^ª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Prof^ª Dr^ª Ivone Goulart Lopes – Instituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^ª Dr^ª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Prof^ª Dr^ª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Prof^ª Dr^ª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof^ª Dr^ª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^ª Dr^ª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^ª Dr^ª 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^ª Dr^ª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^ª Dr^ª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof^ª Dr^ª 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
Prof^ª Dr^ª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof^ª Dr^ª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Prof^ª Dr^ª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof^ª Dr^ª 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

Prof^ª Dr^ª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof^ª Dr^ª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof^ª Dr^ª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Prof^ª Dr^ª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Prof^ª Dr^ª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª Dr^ª 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 Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Prof^ª Dr^ª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Prof^ª Dr^ª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

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

Prof^ª Dr^ª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof^ª Dr^ª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof^ª Dr^ª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Prof^ª Dr^ª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Prof^ª Dr^ª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Prof^ª Dr^ª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª Dr^ª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^ª Dr^ª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Prof^ª Dr^ª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof^ª Dr^ª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof^ª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^ª Dr^ª 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. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^ª Dr^ª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Prof^ª Dr^ª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^ª Dr^ª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Prof^ª Dr^ª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof^ª Dr^ª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Prof^ª Dr^ª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof^ª Dr^ª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
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^ª Dr^ª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Prof^ª Dr^ª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Prof^ª Dr^ª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof^ª Dr^ª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

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. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Me. Aleksandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
Prof^ª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof^ª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
Prof^ª Dr^ª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof^ª Dr^ª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
Prof^ª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
Prof^ª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
Prof^ª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar

Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
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
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
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 Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
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
Prof^ª Ma. Lillian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Prof^ª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Prof^ª Dr^ª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Prof^ª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
Prof^ª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^ª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos
Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
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
Prof^ª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Prof^ª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof^ª Dr^ª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Prof^ª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Prof^ª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Prof^ª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof^ª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof^ª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

A estruturação e reconhecimento das ciências biológicas na contemporaneidade 2

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Maria Alice Pinheiro
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadores: Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E82 A estruturação e reconhecimento das ciências biológicas na contemporaneidade 2 / Organizadores Clécio Danilo Dias da Silva, Daniele Bezerra dos Santos. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-954-7

DOI 10.22533/at.ed.547210104

1 Ciências Biológicas. I. Silva, Clécio Danilo Dias da (Organizador). II. Santos, Daniele Bezerra dos (Organizadora). III. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

A coleção **“A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade”** da Atena Editora é uma obra composta de dois volumes e refere-se a uma série de investigações e contribuições nas áreas das Ciências Biológicas e que se fundamentam na discussão científica e em trabalhos categorizados e interdisciplinares desenvolvidos por autores de vários segmentos, potencializando discussões e abordagens contemporâneas em temas variados das Ciências Biológicas. Assim, a coleção é para todos os profissionais pertencentes às Ciências Biológicas e suas áreas afins, especialmente aqueles com atuação no ambiente acadêmico e/ou profissional. Cada volume foi organizado de modo a permitir que sua leitura seja conduzida de forma simples e com destaque por área da Biologia, onde os capítulos podem ser lidos na ordem que você desejar e de acordo com sua necessidade.

O **Volume I – “Meio Ambiente e Biodiversidade”**, através dos seus 16 capítulos aborda a heterogeneidade e aplicação de conceitos nas áreas de meio ambiente, ecologia, sustentabilidade, botânica, micologia e zoologia, como levantamentos/inventários e discussões sobre a importância da biodiversidade e do conhecimento popular sobre as espécies. As temáticas exploradas neste volume são de grande relevância, pois apesar da preocupação com a biodiversidade e com o estado do meio ambiente não ser recente, sabe-se que foi nas últimas décadas do século XX que essa temática entrou definitivamente no discurso dos cidadãos, na sociedade civil, na agenda dos governos, na imprensa e ganhou as ruas. No entanto, se observa que essa preocupação ainda não se transformou efetivamente em práticas educativas, administrativas e operacionais efetivas, o que coloca em risco todos os seres vivos e recursos naturais. Desta forma, o volume I procura auxiliar a realização de trabalhos nestas áreas e no entendimento e desenvolvimento de práticas que podem ser adotadas no âmbito da educação, em espaços formais e não formais de ensino, para o meio ambiente e manutenção da biodiversidade de forma de compreender, refletir, responder e/ou minimizar os graves problemas ambientais.

O **Volume II – “Saúde e Biotecnologia”**, reúne 18 capítulos que apresenta de forma categorizada discussões e estudos desenvolvidos em diversas instituições de ensino e pesquisa do país, que apresentam resultados bem fundamentados de trabalhos de experimentos laboratoriais, de campo e de revisão de literatura realizados por diversos professores, pesquisadores, graduandos, e pós-graduandos, cujas pesquisas serão apresentadas de maneira objetiva e didática. A produção científica no campo da Saúde e da Biotecnologia é ampla, complexa e interdisciplinar. Portanto, os capítulos que compõem este volume refletem essa diversidade de olhares.

Assim, o resultado dessa experiência, que se traduz nos dois volumes organizados, objetiva apresentar ao leitor a complexidade e a diversidade de questões e dimensões inerentes as áreas de Meio Ambiente, Biodiversidade, Saúde e Biotecnologia, como pilares

estruturantes das Ciências Biológicas na contemporaneidade. Por fim, esperamos que a leitura aqui proposta possa disseminar e apoiar a construção novos estudos, saberes e práticas pautadas no reconhecimento da importância dos seres vivos e dos recursos naturais, com uma visão multidimensional para a saúde planetária e para o enriquecimento de novas atitudes e práticas multiprofissionais nas Ciências Biológicas.

Boa leitura!

Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos

SAÚDE E BIOTECNOLOGIA

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

AVALIAÇÃO DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO *ASPERGILLUS ACULEATUS*

Amanda Farias de Vasconcelos
Michel Nasser Corrêa Lima Chamy
Ana Beatriz Pereira Lelis da Costa
Bianca Kynseng Barbosa da Silva Costa
Uatyla de Oliveira Lima
Alexandre Coli Dal Prá
Renato dos Santos Reis
Ricardo Gomes de Brito

DOI 10.22533/at.ed.5472101041

CAPÍTULO 2..... 14

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SOLVENTE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE LARVAS DE *TOXOCARA CANIS*

Débora Carvalho Rodrigues
Débora Liliane Walcher
Carolina Neto Oliveira da Cunha
Gabriela Torres Mattos
Nicholas Frota Gonçalves Correia de Souza
Luciana Farias da Costa de Avila
Daniela Fernandes Ramos
Carlos James Scaini

DOI 10.22533/at.ed.5472101042

CAPÍTULO 3..... 19

AÇÕES DA EXPOSIÇÃO AO BISFENOL-A SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS NA PÓS-MENOPAUSA ALIMENTADAS COM DIETA NORMO OU HIPERLIPÍDICA

Janaina de Oliveira Chaves
Kênia Moreno de Oliveira
Letícia de Souza Figueiredo
Gésily de Souza Aguiar
Israelle Netto Freitas
Cremilda do Amaral Roso de Oliveira
Vanessa Kiill Rios
Rosane Aparecida Ribeiro
Helene Nara Henriques Blanc

DOI 10.22533/at.ed.5472101043

CAPÍTULO 4.....33

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE VITEX AGNUS-CASTUS L. (LAMIACEAE)

Regiane Gonçalves
Vanessa Farias dos Santos Ayres
Carlos Eduardo de Carvalho
Maria Gorete Mendes de Souza
Anderson Cavalcante Guimarães
Geone Maia Corrêa
Carlos Henrique Gomes Martins
Renata Takeara
Eliane de Oliveira Silva
Antônio Eduardo Miller Crotti

DOI 10.22533/at.ed.5472101044

CAPÍTULO 5.....44

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Salmonella* spp. NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva
Vanessa Silva Miranda
Nayane Lopes Ferreira
Laressa Dacle Tomaz
Vitor Simão da Silva
Karina Santos Silva

DOI 10.22533/at.ed.5472101045

CAPÍTULO 6.....55

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO *CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING* NA CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

Nicole Dalonso

DOI 10.22533/at.ed.5472101046

CAPÍTULO 7.....67

ANÁLISE DA CITOGENOTOXICIDADE DAS INFUSÕES DE *ARTEMISIA VULGARIS* L. UTILIZANDO O BIOENSAIO *ALLIUM* CEPA

Claudia de Faria Leal
Lília Rosário Ribeiro
Daiane Maria de Almeida

DOI 10.22533/at.ed.5472101047

CAPÍTULO 8.....74

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *PSEUDOBOMBAX MARGINATUM* (A.ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS

Nathália Amorim Madeiro dos Santos
Juciana Freitas da Silva
Tiago Pinheiro de Souza
Heryka Myrna Maia Ramalho

DOI 10.22533/at.ed.5472101048

CAPÍTULO 9..... 84

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HIF-1 α EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL

Beatriz da Silva Vimercati
Sara de Oliveira Evaristo
Maria Eliza Soares Queiroz
Mayara Mota de Oliveira
Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis
Aline Ribeiro Borçoi
Rafael Pereira de Souza
Anderson Barros Archanjo
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

DOI 10.22533/at.ed.5472101049

CAPÍTULO 10..... 93

ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE NOVOS ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AHR), COM POTENCIAL EFICÁCIA ATEROPROTETORA EM FUMANTES

Isaque Antonio Galindo Francischini
Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

DOI 10.22533/at.ed.54721010410

CAPÍTULO 11..... 109

IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM GEL DE ALGINATO E PECTINA

Layla de Fátima Gonçalves
Sabrina de Ávila Rodrigues

DOI 10.22533/at.ed.54721010411

CAPÍTULO 12..... 115

CONTRACEPTIVOS ORAIS COMBINADOS E A BIOLOGIA DA INSULINA

Janaina de Oliveira Chaves
Cremilda do Amaral Roso de Oliveira
Helene Nara Henriques Blanc
Rosane Aparecida Ribeiro

DOI 10.22533/at.ed.54721010412

CAPÍTULO 13..... 133

CONDIÇÕES TÉRMICAS E SANITÁRIAS EM ILHAS DE REFRIGERAÇÃO DE SUPERMERCADOS E O RISCO DE TRANSMISSÃO DE SALMONELOSE

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva
Daniely Souza Paz
Kimberly Soares Brito Bratífich
Letícia das Graças Silva
Rogério Alves Rodrigues

DOI 10.22533/at.ed.54721010413

CAPÍTULO 14..... 143

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS EM COSMÉTICOS

Giovanna Amaral Filipe

Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

DOI 10.22533/at.ed.54721010414

CAPÍTULO 15..... 154

A RELEVÂNCIA E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA COMO TERAPÊUTICA ESTÉTICA

Lília Maria Nobre Mendonça de Aguiar

Lulucha de Fátima Lima da Silva

Silvia Sousa da Silva

Gicilene Meneses dos Santos

Domingas Machado da Silva

Antenor Matos de Carvalho Junior

Rodrigo Ruan Costa de Matos

Joyce Freitas Barbosa Monteiro

Jocireudo de Jesus Carneiro de Aguiar

DOI 10.22533/at.ed.54721010415

CAPÍTULO 16..... 166

UTILIZAÇÃO DE VETORES VIRAIS NA TERAPIA GÊNICA

Edmilson Pereira Barroso

Synara Suellen Lebre Félix

Anna Júlia Lebre Félix

Maria Júlia Enes Lebre Félix

Gustavo Henrique Sinhoin

Ylêdo Fernandes de Menezes Júnior

Abigail Gonçalves da Silva

Joscleildo Pereira Ferreira

Eder Ferreira de Arruda

Adem Nagibe dos Santos Geber Filho

DOI 10.22533/at.ed.54721010416

CAPÍTULO 17..... 177

EXPANSION OF SCHISTOSOMIASIS IN A LOCALITY IN SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRAZIL

Aline de Jesus Lustosa Nogueira

Renato Juvino de Aragão Mendes

Adalberto Alves Pereira Filho

Leandro Schalcher Aguiar

Iramar Borba de Carvalho Nogueira

Alexandre Nava Fabri

Halana Tereza Marques de Jesus Ambrósio

Karla Regina Freitas Araújo

Ivone Garros Rosa

DOI 10.22533/at.ed.54721010417

CAPÍTULO 18.....	188
MONITORAMENTO MICROCONTROLADO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO DE <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i>	
Letícia Pinto	
Andréia Anschau	
DOI 10.22533/at.ed.54721010418	
SOBRE OS ORGANIZADORES	198
ÍNDICE REMISSIVO.....	199

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE AMILASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO *ASPERGILLUS ACULEATUS*

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 05/12/2020

Ricardo Gomes de Brito

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/13259435792447286>

Amanda Farias de Vasconcelos

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/0565393443201519>

Michel Nasser Corrêa Lima Chamy

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/5334792132991651>

Ana Beatriz Pereira Lelis da Costa

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFA

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/7475489082085362>

Bianca Kynseng Barbosa da Silva Costa

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/6168405801088199>

Uatyla de Oliveira Lima

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/1246580095630807>

Alexandre Coli Dal Prá

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/4991052979468474>

Renato dos Santos Reis

Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB-UFAM

Coari-AM

<http://lattes.cnpq.br/2547554276214581>

RESUMO: Os fungos são considerados uma excelente fonte biológica produtor de amilases, enzimas que atuam transformando a cadeia longa de amido em polímeros menores, facilitando a obtenção de energia para funções metabólicas desses organismos. Destacam-se entre eles os fungos do gênero *Aspergillus*, não promissores na produção de biocompostos de grande importância econômica, utilizados em processos industriais. Os fungos da espécie *Aspergillus aculeatus*, tem sido citado na literatura como um bom produtor de enzimas com características específicas, responsáveis pela degradação de material celulósico e hemicelulósico. Contudo, nota-se a escassez dos trabalhos referentes à produção de amilase por esta espécie. Desse modo, a pesquisa objetivou avaliar a produção da enzima amilases a partir do fungo *Aspergillus aculeatus*. Obteve-se o fungo da coleção de culturas fúngicas do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB – UFAM, onde foi reativado em meio de cultivo Dextrose Sabouraud Ágar para crescimento micelial, em seguida realizou-se a etapa fermentativa utilizando o meio líquido Manachini suplementado com amido a 0,5% como substrato para indução da produção de amilases e obtenção de extrato bruto. A atividade enzimática foi determinada através do método sacarificante DNS que foi analisado por leituras

de absorvâncias em espectrofotômetro, onde fez-se a conversão dos valores obtidos a partir da absorvância em valores de concentração de glicose ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) por meio de interpolação na curva padrão. Os resultados obtidos da reativação mostraram eficiência quanto ao crescimento fúngico, obteve-se o extrato bruto por fermentação submersa, o qual foi utilizado na análise sacarificante que apresentou concentração de glicose 5,6 UI/mL-1 produzida a partir do fungo *Aspergillus aculeatus* durante os ensaios. Como não há trabalhos referentes a sacarificação de amido utilizando esta espécie de fungo, os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que a produção de amilases entre os parâmetros posto pelo método utilizado apresentou eficiência durante este estudo.

PALAVRAS - CHAVE: Fungos Filamentosos, Amilases, Atividade Sacarificante, Produção Enzimática

EVALUATION OF AMYLASES BY SUBMERSAL FERMENTATION OF THE FUNGUS *ASPERGILLUS ACULEATUS*

ABSTRACT: Fungies are considered an excellent producer source of biological amylase enzymes, which act by transforming the long chain of starch into smaller polymers, facilitating the obtaining of energy for the metabolic functions of these organisms. Among them, the *Aspergillus* fungi stand out, which are promising in the biocomposites of great economic importance production, used in industrial processes. Fungi of the species *Aspergillus aculeatus*, has been mentioned in literature as a good enzymes producers with specific characteristics, responsible for the degradation of cellulosic and hemicellulosic material. However, there is a scarcity of studies on the amylase production by this species. Thus, this research aimed at evaluateling the production of the enzymes amylases from the fungus *Aspergillus aculeatus*. The fungus was obtained from the collection of fungal cultures of the Institute of Health and Biotechnology laboratory (ISB), where it was reactivated in a culture medium Dextrose Sabouraud Agar for mycelial growth. Then, the fermentation step was performed using the liquid medium Manachini supplemented with 0.5% starch as a substrate for inducing the production of amylases and obtaining crude extract. The enzymatic activity was determined by using the DNS saccharifying method, which was analyzed by absorbance readings in a spectrophotometer, where the values obtained from the absorbance were converted into glucose concentration values ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) by means of interpolation on the standard curve. The results obtained from the reactivation showed efficiency in relation to fungal growth, the crude extract was obtained by submerged fermentation, which was used in the saccharifying analysis that showed a concentration of glucose 5.6 IU / mL-1 produced from the fungus *Aspergillus aculeatus* during the tests. As there are no studies on starch saccharification using this species of fungus, the results obtained in this research demonstrate that the production of amylases among the parameters used by the method used showed efficiency during this study.

KEYWORDS: Filamentous Fungi; Amylases; Saccharifying Activity; Enzyme Production.

1 | INTRODUÇÃO

As enzimas são consideradas proteínas biocatalisadoras na natureza capazes de realizar reações químicas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos

vivos, e desempenha um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos. Em comparação com outros catalisadores as enzimas possuem aspectos que as tornam utilizável a fim de gerar produtos naturais biológicos e biodegradáveis (SANTOS, 2018).

Existe uma variedade de micro-organismos produtores de enzimas amilases encontradas na natureza, porém, somente alguns deles como fungos e bactérias são capazes de fazer a degradação do amido natural. As amilases atuam na quebra das ligações glicosídicas que unem os resíduos de glucose das macromoléculas de amido, a qual transforma a cadeia longa de amido em polímeros menores o que facilita a obtenção de energia para as funções metabólicas desses organismos (SOARES *et al.*, 2010; ANDRADES, 2014).

O amido pode ser sacarificado pelas enzimas α -amilase, β -amilase, glicoamilases ou amiloglicosidades, pululanases e isoamilases e, dependendo dos biocatalisadores amilolíticos utilizados e das condições dos processos, pode-se obter maltodextrinas e xaropes de glucose, maltose e misto. (PASTORE *et al.*, 2013).

Pesquisas atuais apontam que diferentes tipos de amilases produzidas por fungos apresentam preferência no mercado de enzimas nacional, por serem enzimas específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, além da sua alta seletividade para determinados substratos, ampla faixa de atuação de temperatura e pH, e por serem biodegradáveis, desta forma, as tornando desejáveis tanto pela indústria quanto para a integridade do meio ambiente (SPIER, 2005; POLETTTO, 2011; SANTANA *et al.*, 2012).

Nesse sentido, as fontes biológicas produtoras de enzimas em destaque são os fungos filamentosos, por ser uma excelente fonte de enzimas de interesse industrial como, por exemplo, os do gênero *Aspergillus*, que são os mais promissores na produção de biocompostos de grande importância econômica utilizados em processos industriais responsáveis pela deterioração de alimentos e fabricação de compostos hidrolíticos e oxidativos (SILVA, 2009; SILVA *et al.*, 2017).

O fungo filamentoso da espécie *Aspergillus aculeatus*, em particular têm sido descritos na literatura como um bom produtor de enzimas com características específicas responsáveis pela degradação de material celulósico e hemicelulósico (BABA *et al.*, 2015).

Orlandelli *et al.* (2012) afirma que já existem duas enzimas comerciais obtidas a partir do fungo *A. aculeatus*: β -glucanase e pectinase. A primeira é responsável por hidrolisar ligações β -D-glicosídicas de β -glucanos. A segunda atua na hidrólise do polissacarídeo pectina, um dos constituintes da parede celular de plantas. Essas enzimas possuem utilidades em diversos processos industriais, como por exemplo, na fabricação de cerveja, sucos e vinhos, no preparo de rações animais e na indústria de papel e tecidos.

Com base no levantamento bibliográfico deste projeto, nota-se a escassez dos trabalhos referentes à produção de amilase por *Aspergillus aculeatus*. Deste modo, a pesquisa objetivou avaliar a produção da enzima amilases a partir do fungo *Aspergillus*

aculeatus.

2 | MATERIAL E MÉTODO

2.1 Cultivo do Micro-Organismo

O fungo *Aspergillus aculeatus* foi disponibilizado pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas, Campus médio Solimões, onde encontravam-se em estado inativo submerso em solução Castellani. Para reativá-los seguiu-se a metodologia de Teixeira *et al.*, 2011 e Soares *et al.*, 2010. Realizou-se o processo de inoculação em meio de cultivo *Dextrose Sabouraud Ágar* (sólido), preparou-se 250mL do meio, os inoculo permaneceram em estufa incubadora a temperatura de 37°C para o crescimento micéial durante cinco dias.

2.2 Fermentação Submersa

Para indução da produção extracelular de amilases por *Aspergillus aculeatus* seguiu-se a metodologia de Teixeira *et al.* (2011), onde utilizou-se o meio líquido Manachini (MANACHINI *et al.*, 1987) sendo suplementado com substrato indutor. O meio de cultura Manachini foi preparado contendo pequenas quantidades de sais para o desenvolvimento do micro-organismo que são: Fosfato de Potássio 2g; Sulfato de Amônia 1g; Sulfato de Magnésio 0,1g; Fosfato de Sódio 0,9g; Extrato de Levedura 1g, e o substrato indutor utilizado foi o amido 0,5% (p/v (ALPHATEC)) 3g, sendo estas quantidades para 1000mL, foram utilizado 300mL. Após o preparo do meio enriquecido, transferiu-se um inoculo do fungo *Aspergillus aculeatus* em Erlenmeyer de 100mL contendo 50mL de meio nutriente, em triplicata, os Erlenmeyer foram submetidos à incubadora Shaker SI222 (SOLAB), onde permaneceram em homogeneização constante sob agitação de 180^orpm a 37°C por 72 horas, os parâmetros de temperatura e pH foram aferidos de acordo com a metodologia. As cepas foram filtradas por sistema de filtração, utilizando-se seringas com filtrilo. O extrator líquido obtido foi armazenado em uma estufa de refrigeração a 16°C (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

2.3 Determinação de Açúcares Redutores Através do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

Aplicou-se a determinação de açúcares totais por meio da metodologia apresentado por Miller (1959), através do ácido dinitrosalicílico (DNS) com algumas modificações adaptáveis a fim de estabelecer uma curva padrão de glicose, para assim, fazer a interpolação da marcha analítica do fungo *Aspergillus aculeatus*. A determinação de açúcares redutores posta por Miller trata-se de um método baseado a parti da construção de uma curva de calibração de glicose e no comparativo do hidrolisado com os valores obtidos na curva, sendo assim, muito utilizado em diferentes laboratórios de pesquisa.

Por meio da relação luz absorvida em espectrofotômetro a 450nm pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico é possível determinar a concentração de açúcares redutores presente na solução, baseando-se na lei de Lambert-Beer, por essa técnica ser simples e robusta, facilita a quantificação de um grande número de amostras em um dia de trabalho (AHMED, 2013; BARROS, 2005).

2.4 Curva Padrão

Para realizar a curva padrão de glicose, preparou-se o reagente DNS com volume final de 500mL, para o preparo da solução foram pesados 5g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e adicionado a 100mL de hidróxido de sódio a 2M recém-preparada, fez-se também uma segunda solução em paralelo, 150g de Tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 250mL de água destilada sob agitação e aquecimento em uma chapa magnética.

Após a diluição do tartarato duplo de sódio e potássio sob agitação e aquecimento, adicionou-se a solução de hidróxido de sódio com ácido 3,5-dinitrosalicílico para completar a dissolução do DNS. Assim que ocorreu o resfriamento, aferiu-se a solução com água destilada até que completasse 500mL em uma proveta de 1000mL, logo, transferiu-se a mistura para um vidro de âmbar com as devidas identificações para poder ser armazenado.

Posteriormente preparou-se a solução estoque de glicose $1,0\text{g L}^{-1}$, pesou-se 0,06g de Dextrose para 60mL de água destilada para realizar o ensaio. Assim que fez-se a solução estoque, preparou-se soluções com concentrações de diluições entre $0,1\text{g L}^{-1}$ a $0,9\text{g L}^{-1}$ de glicose, como descrito na Tabela 1. Transferiu-se uma alíquota de 0,5mL das soluções com as concentrações de 0,1 a $0,9\text{g L}^{-1}$ para os tubos de ensaio, em triplicata para cada concentração, incluindo a solução estoque de glicose e adicionando-se 0,5mL de reagente DNS em cada tubo. Realizou-se uma solução branco, na qual substituiu-se o volume equivalente do substrato, glicose, por água destilada para a calibração do equipamento. Os tubos foram agitados com auxílio de um vortex e submersos a banho-maria a 100°C por 10 minutos (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Solução de Glicose (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (g L^{-1})
1	9	0,1
2	8	0,2
3	7	0,3
4	6	0,4
5	5	0,5
6	4	0,6
7	3	0,7
8	2	0,8
9	1	0,9

Tabela 1 - Dados do preparo das soluções diluídas de glicose por meio da solução estoque de glicose a 1g L^{-1} utilizadas na elaboração da curva- Padrão.

Fonte: VASCONCELOS *et al.*, 2013

Após o resfriamento dos tubos a temperatura ambiente, fez-se a diluição das soluções com 3,5mL de água destilada, as amostras contidas nos tubos após a fervura em banho-maria consistiram uma coloração vermelho-tijolo, indicando a presença de glicose, como exposto na figura 2, a partir disto, fez-se a homogeneização das amostras com as concentrações diluídas de glicose para a leitura da absorbância em espectrofotômetro (KASUAKI) a 450nm, os valores obtidos na leitura estão descritos na Tabela 2.

Os dados obtidos foram analisados por meio de uma planilha no LibreOffice versão: 5.1.6.2, no qual fez-se a média dos valores das absorbâncias geradas na leitura espectrométrica permitiu construir um gráfico comparativo de absorbância versus concentração da substância para obter um gráfico (Figura 3) e o valor do R². De acordo com as literaturas considera-se o R² apropriado para a curva padrão o quão próximo seu valor estiver de 1, através deste gráfico obteve-se a equação da reta, a qual foi feita a partir da média adquirida pela absorbância, por meio desta equação fez-se a determinação do produto da reação enzimática (AHMED, 2013).

2.5 Atividade Amilolítica Sacarificante

Para os ensaios do extrator líquido obtido no ensaio, realizou-se o procedimento do item 3.4, no entanto, para esse ensaio preparou-se o Tampão Fosfato de Potássio 50mM com pH 6, pois diluiu-se o amido a 0,5% (p/v (ALPHATEC)) no mesmo, e o submergiu em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Assim que a solução estava pré-cozida, fez-se alíquotas de 0,5mL desta para os tubos de ensaio contendo 0,5mL de extrato enzimático do fungo. A reação controle foi preparada substituindo-se o extrato enzimático pelo o volume equivalente em água destilada, feita em triplicata. As amostras ficaram incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos (FERNANDES et al., 2007).

Ao encerrar o período no banho-maria, interrompeu-se a reação pela adição de 0,5 mL do reagente de DNS. Todos os tubos de ensaios contendo a solução foram submetidos novamente ao banho-maria por 5 minutos, e em seguida resfriados a temperatura ambiente. A coloração desenvolvida foi homogeneizada e aferida em espectrofotômetro (KASUAKI) a 540nm. Através da interação da luz absorvida pelo 3,5-nitrosalicilato, obteve-se os valores das absorbâncias descritas na tabela 3, estes resultados foram somados e divididos por três (número total de amostras) dessa forma obteve-se a absorbância média.

Os valores obtidos a partir das leituras de absorbância no espectrofotômetro foram convertidos a valores de concentração de glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) por meio de interpolação na curva padrão (FERNANDES et al., 2007; SILVEIRA et al., 2005). Para isso, utilizou-se a equação:

$$[\text{Enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (t_{\text{reação}})^{-1}$$

Onde:

$$[\text{AR}] = \text{Concentração de açúcar produzido (umol. mL}^{-1}\text{)}$$

$$V = \text{Volume da mistura reacional (mL)}$$

t reação = Tempo de reação enzimática (min).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Reativação e Crescimento Micelial do Fungo *Aspergillus aculeatus*

A reativação por inoculação realizada do fungo *Aspergillus aculeatus* mostrou eficiência em relação a metodologia de Teixeira *et al.*, 2011 e Soares *et al.*, 2010. A taxa de crescimento do micélio foi analisada por meio da superfície de resposta, através da estimativa da taxa instantânea de crescimento de seus micélios em meio sólido, como mostra a figura 1, ou seja, as características morfológicas observadas após o período de reativação do fungo. As características cor e textura são dependências subjetivas a perspectiva do observador de acordo com a descrição da metodologia (Teixeira *et al.*, 2011).



Figura 1- Imagem do macro micélios do fungo filamentososo *Aspergillus aculeatus*.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

3.2 Fermentação Submersa

Durante a fermentação do meio de cultivo Manachini com o substrato indutor, amido, observou-se a presença de biomassa do fungo presentes sob a superfície do meio durante o período de incubação sob agitação. Como descrito no protocolo a obtenção do extrato bruto do fungo foi facilitada, pois foi possível separar a biomassa do extrator líquido. Segundo Teixeira *et al.*, 2011 para melhor desempenho de amilases sob o substrato amido a temperatura ideal são de 37°C com o pH 6, aferido com um indicador de pH, esses parâmetros foram considerados adequados para a produção de amilases por fermentação submersa. Com base no método tanto a fermentação e a obtenção do extrato bruto

coincidem com a literatura apresentando resultados satisfatória para o estudo.

3.3 Curva Padrão

Ao realizar a curva padrão de glicose as amostras obtiveram a coloração vermelho-tijolo ao ser retiradas do banho-maria a 100°C logo após 10 minutos durante o ensaio, o que indica a presença de açúcar no meio como descrito no protocolo e exposto na figura 2.

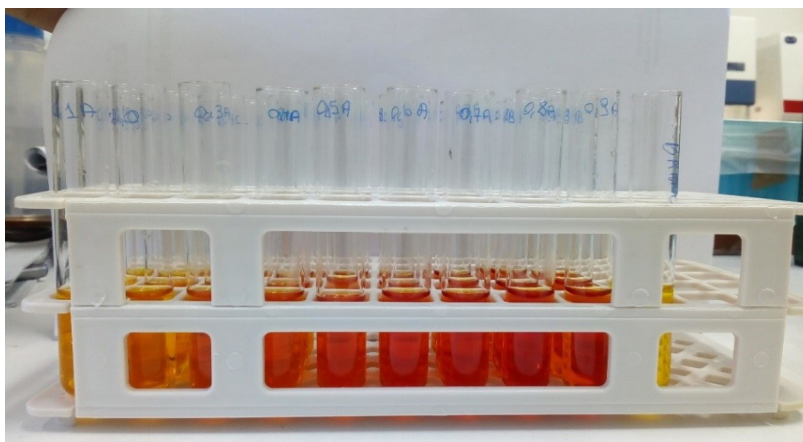


Figura 2 - Amostras que obtiveram coloração vermelho-tijolo ao ser retirada do banho-maria a 100°C por 10 minutos.

Fonte: Acervo pessoal (2019).

Através da reação de glicose fez-se a leitura em espectrofotômetro e obtiveram-se os dados descritos na tabela 2, por meio desses resultados adquiridos pela leitura espectrométrica, construiu-se um gráfico comparativo de absorbância versus concentração da substância como mostra a figura 3, e o valor do R^2 , através deste gráfico obteve-se a equação da reta, a qual foi feita a partir da média dos resultados da leitura em espectrofotômetro, e por meio da equação obtida fez-se a determinação do produto da reação enzimática.

[Glicose g.L-1]	Abs A	Abs B	Abs C	ABS (Média)
0,1	0,053	0,051	0,049	0,051
0,2	0,12	0,118	0,118	0,11866667
0,3	0,188	0,192	0,19	0,190
0,4	0,234	0,226	0,231	0,23033333
0,5	0,328	0,29	0,295	0,30433333
0,6	0,396	0,394	0,403	0,39766667
0,7	0,459	0,456	0,45	0,455
0,8	0,545	0,56	0,535	0,54666667
0,9	0,621	0,618	0,622	0,62033333

Tabela 2 - Concentrações de glicose de 0,1 a 0,9g L⁻¹ com os valores obtidos a partir da leitura por espectrofotômetro e o valor da média calculada no LibreOffice versão: 5.1.6.2.

Fonte: Elaborado pela autora.

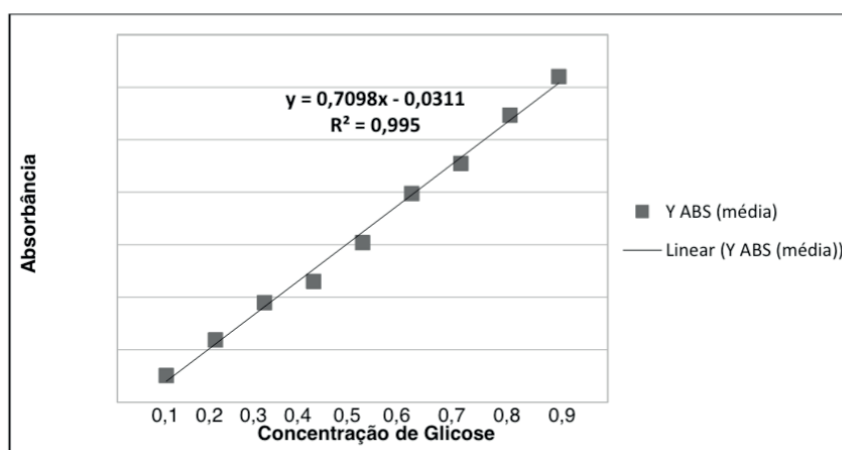


Figura 3 - Gráfico da curva padrão de glicose desenvolvida a partir da absorbância média por meio do LibreOffice versão: 5.1.6.2, utilizando os valores de concentrações de glicose no eixo X, mostrando o R²=0,995 e a equação da reta: $y=0,7098x - 0,0311$.

Fonte: Elaborado pela autora.

Como descrito por Vasconcelos e colaboradores (2013), as análises realizadas em espectrofotômetro constituiu um gráfico que pode mostrar quantitativamente a equação ($y=0,7098x - 0,0311$) e o R²(0,995) a partir dos dados obtidos foi efetuado a marcha analítica do fungo *Aspergillus aculeatus*, os valores da equação somente se aplicam ao intervalo testado.

3.4 Atividade Amilolítica Sacarificante

A partir desses dados obtidos da curva padrão de glicose realizou-se o processo de reação com o extrator líquido do fungo *Aspergillus aculeatus*, para a interpolação da curva padrão para assim avaliar se produziu ou não atividade sacarificante por meio da interpolação da curva padrão realizada. Desta forma obtiveram-se os valores pela leitura

em espectrofotômetro a 450nm descritos na tabela 3.

Amostra	Abs A	Abs B	Abs C	Média
<i>Aspergillus aculeatus</i>	0,811	0,636	0,623	0,69

Tabela 3 - Valores das absorvâncias obtidas do extrator líquido do fungo *Aspergillus aculeatus* por espectrofotômetro e o resultado do cálculo feito para obter a absorvância média.

Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo a “Enzyme Commission” da “International Union of Biochemistry And Molecular Biology (IUBMB)”, juntamente com a “International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)”, uma Unidade Internacional (U.I.) de atividade é a quantidade de enzima capaz de catalisar a transformação de umol.mL^{-1} do substrato ou produzir umol.mL^{-1} de produto, por um determinado período de tempo em condições padrões.

Desta forma, por meio dos valores adquiridos fez-se o cálculo da concentração de açúcar produzido por meio da equação da reta adquirida na figura 3 ($Y= 0,709 x - 0,031$) com o valor obtido da absorvância média (0,69) do fungo *Aspergillus aculeatus* descrito na tabela 3.

$$Y= 0,709 x - 0,031$$

$$0,69= 0,709x - 0,031$$

$$0,69 + 0,031= 0,709 x$$

$$0,721= 0,709 x$$

$$0,721$$

$$0,709 = x$$

$$X= 1,01\text{gL}^{-1}$$

Ao encontrar o valor da concentração de açúcar produzido fez-se a conversão de $1,01\text{gL}^{-1}$ de gramas para mol. Onde fez-se a regra de três simples para converter: Valor do Peso Molar da glicose (Dextrose) utilizada = 180,16.

$$1 _ 180,16 \text{ g/mol}$$

$$X _ 1,01 \text{ g/L}$$

$$X= 0,0056 \text{ mol/L}$$

$$\text{Logo } X= 0,0056 \text{ mol/L}^{-1} \times 1000$$

$$\text{Desta forma, } y= 5,60 \mu\text{mol. mL}^{-1}$$

Com o valor da concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol. L}^{-1}$) fez-se a equação:

$$[\text{Enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (\text{treação})^{-1}$$

$$[\text{E}] = 5,60 \times 5 \times (5)^{-1}$$

$$[\text{E}] = 5,6 \text{ UI/mL}^{-1}$$

O extrato enzimático produzido por esta espécie utilizando amido 0,5% no período de 72 horas de fermentação submersa apresentou valores de atividade amilolítica sacarificante de 5,6 UI/mL⁻¹ de glicose por minuto de reação, ou seja, sua reação metabólica em relação a produção de glicose liberada pela hidrólise do amido é satisfatória ao ponto de vista biotecnológico como descreve Fernandes e colaboradores (2007), e Chamy (2017), apontando a presença significativa de enzimas amilases produzidas pelo fungo *Aspergillus aculeatus*.

4 | CONCLUSÃO

O estudo realizado e os dados obtidos permitiram verificar de forma quantitativa a aptidão da espécie *Aspergillus aculeatus* em produzir enzimas amilases extracelular. Mediante a lacuna de informações referente ao trabalho desenvolvido, existe a necessidade de estudos para avaliar de forma quali-quantitativa a produção enzimática de amilases por esta espécie em diferentes fatores físico-químicos, podendo assim verificar o seu desempenho produtivo que pode ser explorado via industrial e biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- Andrades, D. 2014. **Hidrolases de Fungos isolados da Mata Atlântica cultivados em resíduos agroindustriais: Produção, Purificação e Caracterização Enzimática**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Conversão e Manejo de Produtos Naturais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- Ahmed, R. C. M. 2013. **Quantificação de açúcares redutores da casca de arroz após diferentes tipos de pré-tratamento seguido da hidrólise enzimática**. Trabalho de conclusão de curso II (Engenharia de energias renováveis e ambiente) - Universidade Federal do Pampa, Bagé.
- Baba, Y.; Sumitani J.; Tani, S.; Kawaguchi, T. 2015. **Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma cellulase* system**. *Amb Express*, [s.l.], v. 5, n. 1, p.01-09.
- Barros, O. S. 2005. **Determinação a baixo custo de açúcares redutores totais em caldo-de-cana, empregando sistemas de análise por injeção em fluxo com o uso de DNS**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Chamy, M. N. C. L. 2017. **Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Coari, AM. p. 12-59.
- Fernandes, L. P.; Ulhoa, C. J.; Asquieri, E. R. 2007. Monteiro, V. N. **Produção de amilases pelo fungo *macrophomina phaseolina***. REF - ISSN 1808-0804 Vol. IV (1), 43-51.
- Manachini, P. L.; Fortina, M. G.; Parini, C. 1987. **Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer***. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 3, p. 219-224.

Miller, G.L. 1959. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry. v.31, p. 426-428.

Orlandelli, R. C.; Specian, V.; Felber, A. C.; Pamphile, J. A. 2012. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** ISSN:1980-0002, SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109.

Pastore, M. G.; Bicas, L. J.; Junior, M. R. M. 2013. **Biotecnologia de Alimentos.** Editora Atheneu, São Paulo V.12, ISBN: 978-85-388-0371-3. p. 343-367.

Poletto, C.M. 2011. **Microrganismos: agentes de transformação de biomassa em insumos energéticos.** Artigo em Hypertexto. Disponível em: (www.infobibos.com/Artigos/2011_4/microorganismos/index.htm). Acesso em: 5/8/2019

Santana, R. S. M. de; Gonçalves, Z. S.; Franco, M. 2012. **Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo do cacau.** Enciclopédia Biosfera, Ilheus - Ba, v. 8, n. 14, p.1981-1987.

Santos, M.F. 2018. **Prospecção de Bactérias Produtoras de Amilases para Sacarificação de Microalgas.** Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo. p. 21-73.

Silva, D. M. 2009. **Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero / Daiani Maria da Silva.** – Lavras: UFLA. 76 p.: il.

Silva, K.C.; Silva, T.M.; Silva JR., W.F.; Cerri, M.O.; Da Silva, S.L.; Cavalho, B.M.A. 2013. **Otimização das variáveis, pH, força iônica e meio nutricional na descoloração de corante industrial têxtil pelo fungo *Aspergillus aculeatus*.** ISSN: 2316-5200, IV Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica e I Semana Científica de Biotecnologia. BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports. Edição Especial, v. 2; n. 2, jun., p. 1-4.

Silva, L. A. F.; Carvalho, S. A.; Filho, D. F.; Alves, M. F.; Silva, N. L.T.; Gomes, J. R.; Santos, K. S. 2017. **Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa.** ISSN 2447-6218, Cad. Ciênc. Agrá. v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49–53.

Silveira, S. M.; Vainstein, M. H.; Schrank, A. 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Ufrgs (br/rs). **Processo de produção de amilase termoestável e composições para limpeza.** BR nº P10401027-22, p. 01-21.

Slivinski, C. T. 2007. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 129 f. p. 18-103.

Soares, I. A. Flores, A. C.; Zanettin, L.; Pin, H. K.; Mendonça, M. M.; Barcelos, R. P. et al., 2010. **Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, [s.l.], v. 30, n. 3, p.700-705.

Spier, M. R. 2005. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amilogucosidase por fermentação no estado sólido.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) -Universidade Federal do Paraná -Curitiba 28 (2).

Teixeira, S. F. M.; Silva, A.T.; Palheta, A. R.; Carneiro, B. L. A.; Atayde, M. H. 2011. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)**, Editora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus. ISBN: 978-85-7401-580-4.

Vasconcelos, N. M.; Pinto, G. A. S.; Aragão, F. A.S. 2013. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: **Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 88. p. 4-23.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SOLVENTE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE LARVAS DE *TOXOCARA CANIS*

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 03/01/2021

Débora Carvalho Rodrigues

Universidade Federal de Pelotas – Pelotas
<http://lattes.cnpq.br/7649449397234049>

Débora Liliane Walcher

Universidade Federal de Pelotas – Pelotas
<http://lattes.cnpq.br/7591606331138618>

Carolina Neto Oliveira da Cunha

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/2663844612006800>

Gabriela Torres Mattos

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/6037855682278478>

Nicholas Frota Gonçalves Correia de Souza

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/1142784600790784>

Luciana Farias de Costa Avila

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/8361097962013098>

Daniela Fernandes Ramos

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/799975185416235>

Carlos James Scaini

Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande
<http://lattes.cnpq.br/6274475036894377>

RESUMO: A toxocaríase humana é uma zoonose parasitária negligenciada e distribuída mundialmente. Essa parasitose tecidual tem como principal agente etiológico o nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães. O tratamento baseado no emprego de anti-helmínticos apresenta eficácia baixa a moderada (40-70%), sendo importante a realização de pesquisas que visam a avaliação de candidatos a novos fármacos. O objetivo deste estudo foi conhecer a possível interferência do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), em diferentes concentrações, sobre a viabilidade de larvas de *T. canis*. Ovos coletados diretamente dos tubos uterinos do nematódeo *T. canis* foram incubados em formalina 2%, durante 30 dias. Após, foi realizada a extração e a incubação de larvas de *T. canis* em meio RPMI-1640, a 37°C, tensão de 5% de CO₂. Os testes *in vitro* foram realizados em placa de microcultivo, em triplicata. Em cada orifício da placa de microcultivo, contendo 100 larvas de *T. canis* em meio RPMI-1640, foi adicionado DMSO em diferentes concentrações (15%, 7,5%, 3,75%, 1,87%, 0,93%, 0,46%). Como controle foram utilizados os anti-helmínticos tiabendazol e o mebendazol. Também foram empregados o controle de larvas vivas e controle de larvas mortas. Somente nas concentrações mais baixas do solvente DMSO (0,46-1,87%) as taxas de viabilidade de larvas (87,8-95%) foram semelhantes ao grupo controle de larvas vivas (92,4%) (p>0,05). O estudo comprova que nas concentrações mais elevadas do DMSO (7,5-15%) há consequências para a viabilidade das larvas, demonstrando a importância da correta diluição de compostos químicos para a validade

de testes *in vitro* realizados com larvas de helmintos.

PALAVRAS - CHAVE: *Toxocara canis*; Dimetilsulfóxido; Tiabendazol; Mebendazol.

EVALUATION IN VITRO OF DIFFERENTS CONCENTRATIONS OF SOLVENT DIMETHYLSULFOXIDE AGAINST *TOXOCARA CANIS* LARVAE

ABSTRACT: Human toxocariasis is a neglected parasitic zoonose distributed all over the world. This tissue parasitosis has as principal etiological agent the nematode *Toxocara canis*, intestinal parasite of dogs. The treatment based on administration of anthelmintic shows low to moderate efficacy (40-70%), so, it is important the development of studies that aim to evaluate candidates to new drugs. The objected of this study was to know the possible interference of the solvent dimethylsulfoxide (DMSO) in diferents concentrations, against the viability of *Toxocara canis* larvae. Eggs collected directly of the uterine tubes of the nematode *T.canis* were incubated in 2% formalin, for 30 days. After, the extraction was performed and the *T.canis* larvae were incubated in RPMI-1640 medium, at 37°C, 5% CO₂ tension. *In vitro* tests were performed in microculture plate, in triplicate. In each hole of the microculture plate, containing 100 *T.canis* larvae in RPMI -1640 medium, was added dimethylsulfoxide in diferents concentrations (15%, 7,5%, 3,75%, 1,87%, 0,93%, 0,46%). As control were used the anthelmintic Tiabendazole and Mebendazole. Control with live and dead larvae were also used. Just in the low concentrations of the solvent DMSO (0,46-1,87%) the larvae viability rate (87,8-95%) were similar to the live control group (92,4%) ($p>0,05$). The study has proved that at the highest concentrations of DMSO (7,5-15%) there are consequences to larvae viability, which shows us the importance of correct dilution of chemical compounds for the validity of *in vitro* tests performed with helminth larvae.

KEYWORDS: *Toxocara canis*; Dimethylsulfoxide; Tiabendazole; Mebendazole.

INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma antropozoonose negligenciada, causada principalmente pelo nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães-QUATTROCCHI et. al, 2012). Essa parasitose tecidual é decorrente da persistência de larvas de *Toxocara* spp. no fígado, pulmões, encéfalo, coração, rins, medula óssea e musculatura estriada esquelética (MACPHERSON, 2013). As manifestações clínicas variam conforme a intensidade de infecção, padrão de migração e distribuição das larvas e resposta imune do hospedeiro. A severidade dos sintomas depende da localização das larvas e do número de larvas alojadas nos tecidos, o que induz a danos mecânicos e, por sua vez, resulta em reação inflamatória imunomediada (MAIZELS, 2013).

O tratamento dessa parasitose consiste no emprego de anti-helmínticos benzimidazólicos (albendazole – ABZ; tiabendazole – TBZ; mebendazole - MBZ), os quais apresentam eficácia baixa a moderada (47-70%), devido a difícil ação dos fármacos em nível tecidual (MAGNAVAL et al., 2001). A baixa solubilidade em água dos benzimidazois (ABZ e MBZ) parece colaborar para a ínfima disponibilidade desses compostos nos tecidos

(TORRADO et al., 1996). Assim, torna-se importante a realização de estudos que visem o desenvolvimento de novos fármacos.

O solvente polar aprótico dimetilssulfóxido (DMSO) tem sido frequentemente utilizado para diluir compostos químicos candidatos a novos fármacos (MATA et al., 2015), porém não há dados científicos relatados que avaliem a sua atividade sobre larvas de helmintos em ensaios *in vitro*, por esse motivo, o objetivo deste estudo foi conhecer a possível interferência do DMSO, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade de larvas de *Toxocara canis*.

METODOLOGIA

Cães jovens naturalmente infectados foram tratados com pamoato de pirantel (12,5 mg/kg), por via oral, para obtenção de formas adultas de *T. canis*. Após, foi realizada a identificação específica e coleta de ovos diretamente dos tubos uterinos das fêmeas. Os ovos foram incubados em solução de formalina 2%, a 28°C, umidade superior a 90% e oxigenação, durante 30 dias (AVILA et al., 2013). A seguir, foi realizada a extração (SAVIGNY, 1975) e incubação das larvas infectantes de *T. canis* em meio RPMI-1640 (Gibco®) (suplementado com HEPES 25mM, glicose a 1%, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100µg/mL, fungizona 50 µg/mL e ofloxacina 0,4 µg/mL) em 5% de CO₂, a 37°C (AVILA et al., 2013).

Os testes *in vitro* foram realizados em placa de microcultivo (96 orifícios, fundo chato - Cral®), em triplicata. Em cada orifício da placa de microcultivo foram adicionados 100µL de DMSO (Sigma®) 15%, 7,5%, 3,75%, 1,87%, 0,93% e 0,46% e 100 larvas de *T. canis* em 100µL de meio RPMI-1640 (Gibco®). Foram utilizados os controles de anti-helmíntico, TBZ (200 µg/mL) e MBZ (200 µg/mL) (MASSARA et al., 2001), controle de larvas vivas e controle de larvas mortas (congelamento a -20°C durante 10 dias, seguido de choque térmico a 60°C).

Após, foi realizada incubação do material, por 48 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. A seguir, em todos os orifícios foi adicionado o indicador de viabilidade celular Azul de Tripán (Vetec®), deixando o material incubado por mais 30 minutos (MATA et al., 2015).

A avaliação do efeito larvicida foi realizada em microscópio óptico (aumentos de 100x e 400x), sendo avaliada a integridade morfológica, a motilidade e a impregnação pelo indicador de viabilidade celular azul de Tripán (Vetec®) (AVILA et al. 2013; MATA et al., 2015; WALCHER et al. 2018). Assim, foram consideradas larvas inviáveis, aquelas sem motilidade e com impregnação pelo azul de Tripán; e larvas viáveis, aquelas com motilidade e sem impregnação pelo azul de Tripán.

A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste *in vitro* podem ser observados na Tabela 1. O DMSO nas concentrações mais elevadas (15% e 7,5%) foi nocivo para as larvas, com taxa de inviabilidade de 100% e 95,2%, respectivamente. Na concentração de 3,75%, houve redução da toxicidade sobre as larvas de *T. canis*, quando a taxa de viabilidade média foi de 45,3%. Somente nas concentrações mais baixas (1,87%, 0,93% e 0,46%) o DMSO apresentou taxas de viabilidade de larvas (87,8% a 95%) semelhante ao grupo controle de larvas vivas (92,4%) ($p>0,05$), demonstrando uma importante influência desse solvente sobre os resultados de possíveis ensaios *in vitro* quando utilizado em concentrações mais elevadas.

	DMSO (%)						TBZ*	MBZ**	Controle vivo	Controle morto
	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46				
Inviável	100 ^A	95,2 ^A	54,7 ^B	5 ^B	9 ^B	13,2 ^B	100 ^A	100 ^A	7,6 ^B	100
Viável	0 ^A	4,8 ^A	45,3 ^B	95 ^B	91 ^B	87,8 ^B	0 ^A	0 ^A	92,4 ^B	0

* TBZ - Tiabendazol; ** MBZ – Mebendazol

Letras maiúsculas diferentes entre colunas representam diferença significativa ($p<0,05$).

Tabela 1. Porcentagem de viabilidade e inviabilidade do DMSO *in vitro* sobre as larvas de terceiro estágio de *Toxocara canis* em diferentes concentrações.

Em relação aos demais controles, os resultados foram condizentes com o esperado, sendo observada inviabilidade em 100% das larvas dos controles dos anti-helmínticos MBZ (100 μ g/mL) e TBZ (100 μ g/mL) e do controle de larvas mortas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo de padronização de testes *in vitro* demonstra a necessidade da investigação da possível interferência dos solventes utilizados na avaliação de compostos com atividade sobre larvas de helmintos. Uma vez que neste estudo foram avaliadas somente larvas de *Toxocara canis*, fica clara a necessidade de avaliação de outros helmintos, já que os resultados encontrados demonstram a intensa influência desse solvente sobre a viabilidade de larvas em ensaios *in vitro*, podendo até mesmo interferir na validade de resultados de pesquisas com compostos, quando estes forem diluídos em concentrações altas e sem avaliação prévia.

REFERÊNCIAS

- Avila LFC, Telmo PL, Martins LHR, Glaeser TA, Conceição FR, Leite FPL, Scaini CJ (2013) **Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae.** Rev Inst Med Trop São Paulo 55(5):363–365. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500012>
- Macpherson, C. N. L. **The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance.** Int J Parasitol, v.43, p.999-1008, 2013
- Magnaval, J.F.; Glickman, L.T.; Dorchies, P.; Morassin, B. **Highlights of human toxocariasis.** Korean J Parasitol, v.39, n.1, 2001.
- Maizels, R. M. ***Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion.** Veterinary Parasitology, v.193, n.4, p:365-74, 2013
- Massara, C.L.; Ferreira, R.S.; Guerra, H.L.; Carvalho, O.S.; **In vitro study on thiabendazole action on viability of *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758) eggs.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 34(4): 319-322, jul-ago, 2001.
- Mata-Santos, T.; Pinto, N.F.; Mata-Santos, H.A.; De Moura, K.G.; Carneiro, P.F.; Carvalho, T.S.; Del Rio, K.P.; Pinto, M.C.F.R.; Martins, L.R.; Fenalti, J.M.; Da Silva, P.E.A. & Scaini, C.J. - **Anthelmintic activity of lapachol, â-lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* larvae.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 57(3): 197-204, 2015.
- Quattrocchi G, Nicoletti A, Marin B, Bruno E, Druet-Cabanac M, Preux PM. **Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis.** PLOS Negl Trop Dis. 2012;6:1775.
- Savigny DH (1975) **In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans.** J Parasitol 61(4): 781–782. <https://doi.org/10.2307/3279492>.
- Torrado S, Torrado S, Cadorniga R, Torrado JJ. **Formulation parameters of albendazole solution.** Int J Pharm. 1996;140:45-50.
- Walcher, D. L ; Cruz, L. A. X.; Telmo, P. L.; Martins, L. H. R.; Avila, L. F. C.; Berne, M. E. A.; Scaini, C. J.. **Lactobacillus rhamnosus reduces parasite load on *Toxocara canis* experimental infection in mice, but has no effect on the parasite in vitro.** Parasitology Research (2018) 117:597–602 <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5712-7>

CAPÍTULO 3

AÇÕES DA EXPOSIÇÃO AO BISFENOL-A SOBRE A GLÂNDULA MAMÁRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS NA PÓS-MENOPAUSA ALIMENTADAS COM DIETA NORMO OU HIPERLIPÍDICA

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 01/02/2021

Janaina de Oliveira Chaves

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0002-6062-8938

Kênia Moreno de Oliveira

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP.
ORCID: 0000-0002-5725-2984

Letícia de Souza Figueiredo

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0002-2724-5687

Gésily de Souza Aguiar

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0001-6624-4575

Israelle Netto Freitas

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP.
ORCID: 0000-0002-5360-4268

Cremilda do Amaral Roso de Oliveira

Universidade Estácio de Sá
Teresópolis, RJ.
ORCID: 0000-0003-1672-2166

Vanessa Kiill Rios

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
<http://lattes.cnpq.br/3367437304278379>

Rosane Aparecida Ribeiro

Universidade Estadual de Ponta Grossa
Ponta Grossa, PR.
ORCID: 0000-0003-0839-8124

Helene Nara Henriques Blanc

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0001-5729-9785

RESUMO: O Bisfenol A (BPA) é um composto químico sintético amplamente utilizado em utensílios do cotidiano, sendo contaminante dos alimentos, do solo, do ar e da água. O BPA é considerado um desregulador endócrino (DE), sendo observado em modelos experimentais que este DE pode aumentar o risco ao câncer de mama e à obesidade, e promover prejuízos na função reprodutiva principalmente quando os roedores são expostos durante o desenvolvimento intrauterino ou pós-natal. Porém, são escassos os estudos que demonstrem as ações deste DE na pós-menopausa, período que há aumento da incidência de doenças crônicas como a obesidade e câncer no sexo feminino. Neste estudo, avaliamos os efeitos da exposição ao BPA por 90 dias sobre a glândula mamária de camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) alimentadas com dieta hiperlipídica

(HFD). A ingestão de HFD aumentou o peso corporal, mas não modificou o peso do útero nas fêmeas OVX HFD, em relação às controles (CTL). A exposição ao BPA não modificou estes parâmetros nas fêmeas que ingeriram HFD (grupo HBPA). As fêmeas OVX HBPA ou alimentadas com dieta normolipídica (grupo CBPA), apresentaram maior número de ductos na glândula mamária, com aspecto mais desenvolvido, tendo lúmen ligeiramente dilatado preenchido por secreção. Porém, nos grupos HFD e CTL os ductos da glândula mamária eram escassos e atróficos. Além disso, fêmeas HFD apresentaram hipertrofia dos adipócitos subcutâneos adjacentes à glândula mamária. A exposição ao BPA não alterou esses parâmetros morfológicos dos adipócitos nos grupos HBPA e CBPA. Portanto, a exposição ao BPA na pós-menopausa não modificou o desenvolvimento da obesidade induzida pela ingestão de HFD, mas promoveu ações tróficas e secretórias na glândula mamária que foram independentes do tipo de dieta ingerida.

PALAVRAS - CHAVE: desregulador endócrino, ovariectomia, obesidade.

ACTIONS OF BISPHENOL-A EXPOSURE ON MAMMARY GLAND OF POSTMENOPAUSAL FEMALE MICE FED ON A NORMO OR HIPERLIPIDIC DIET

ABSTRACT: Bisphenol A (BPA) is a synthetic chemical compound widely used in everyday utensils, being a contaminant of food, soil, air and water. BPA is an endocrine disruptor (ED), since experimental evidence demonstrated that it may impair the reproductive function and the mammary gland morphofunction, mainly when rodents are exposed to BPA during intrauterine or postnatal life periods. However, the literature lacks information about the effects of this ED in postmenopause, a period in which there is an increased risk to obesity and cancer. Herein, we evaluated the effects of BPA exposure for 90 days on obesity development and mammary gland morphology in female ovariectomized (OVX) mice fed on a high-fat diet (HFD). HFD intake increased body weight and adiposity, but did not change the weight of the uterus in OVX HFD females. BPA exposure did not change HFD-induced obesity or uterus weight in OVX HFD females exposed to BPA (HBPA group). Both BPA exposed groups [HBPA, or control BPA (CBPA)] exhibited mammary gland with various ducts, which were more developed and displayed dilated lumen containing secretion. But, in HFD or CTL females, the ducts of mammary gland were extremely atrophic. Furthermore, HFD females exhibited hypertrophic adipocytes in the mammary gland, when compared to CTL. BPA exposure did not alter these morphological parameters in HBPA or CBPA females. Therefore, BPA exposure in postmenopausal female mice not changed obesity induced by HFD intake, but exhibited trophic and secretory actions in mammary gland which were independently of the type of diet ingested.

KEYWORDS: Endocrine disruptor, ovariectomy, obesity.

1 | INTRODUÇÃO

A obesidade é uma pandemia que dentre as condições que elevam o risco para sua manifestação destaca-se o aumento da ingestão de alimentos hipercalóricos, redução da atividade física e o envelhecimento (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). A menopausa é um marcador do envelhecimento no sexo feminino e ocorre devido à redução progressiva da

função ovariana e das concentrações de estrogênio, resultando na parada da menstruação, e após 12 meses consecutivos de amenorreia, estabelece-se a pós-menopausa (BLÜMEL et al., 2014). Neste período, a mulher experiencia mudanças significativas no metabolismo que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas como a obesidade, diabetes e câncer (DISTEFANO, 2020).

O bisfenol A (BPA; 4,4-dihidroxi-2,2-difenilpropano) é um monômero utilizado desde a década de 1960 na produção de policarbonato e resinas epóxi que são matéria-prima para os recipientes plásticos e de metais que armazenam alimentos e bebidas, e outros utensílios do cotidiano. A exposição oral ao BPA, é a mais frequente, mas como o BPA é contaminante do ar, solo e águas residuais (BACLE et al., 2016; GRAZIANI; CARRERAS; WANNAZ, 2019; PETEFFI et al., 2019), os indivíduos também são expostos por via cutânea e respiratória. O BPA é considerado um desregulador endócrino (DE) por ser agente químico exógeno que interfere em qualquer aspecto da ação dos hormônios (GORE et al., 2015). Esse DE pode exercer ações estrogênicas e anti-androgênicas, sendo classificado como xenoestrogênio capaz de interagir com os receptores para estrogênio, androgênios e para fatores de crescimento (MURATA; KANG, 2018).

Estudos têm relacionado a exposição ao BPA no período intrauterino e/ou pós-natal com prejuízos reprodutivos, como aceleração do desenvolvimento puberal (LOZADA; KERI, 2011), diminuição da espermatogênese (CHITRA, 2003), prejuízos na foliculogênese (SANTAMARÍA et al., 2016) e aumento da proliferação do epitélio dos ductos da glândula mamária (BETANCOURT et al., 2010; THARP et al., 2012). Além disso, a exposição ao BPA no período intrauterino ou durante a idade adulta aumenta o risco de desenvolvimento de tumores na glândula mamária (BETANCOURT et al., 2010; JENKINS et al., 2011; LOZADA; KERI, 2011) e modifica o estroma endometrial, diminuindo o suporte nutricional endometrial e a implantação do zigoto (LI et al., 2016).

O BPA também é considerado agente obesogênico atuando por diversas vias de sinalização celular que modificam o metabolismo lipídico e contribuem para a maior deposição ectópica de gordura (FIGUEIREDO et al., 2020; LEGEAY; FAURE, 2017). Portanto, como a obesidade contribui para a redução da função reprodutiva em mulheres, bem como para o maior risco de desenvolver câncer no útero e nas glândulas mamárias (ONSTAD; SCHMANDT; LU, 2016; REEVES et al., 2007), a exposição ao BPA pode contribuir tanto direta quanto indiretamente para os prejuízos reprodutivos e no desenvolvimento de câncer no sexo feminino. Porém, a literatura carece de dados sobre as ações deste DE na pós-menopausa, período no qual o risco para a obesidade e suas comorbidades é maior (CHEN; MADAK-ERDOGAN, 2018; DISTEFANO, 2020; SLOPIEN et al., 2018). A obesidade também aumenta o risco de câncer na glândula mamária de mulheres na pós-menopausa, sendo a maior adiposidade potencial fonte endógena de estrogênio que supre os tumores responsivos a este hormônio (MOHANTY; MOHANTY, 2019). Levando em consideração que o BPA também se acumula no tecido adiposo (DOERGE et al., 2011), a

exposição a este DE na pós-menopausa poderia acelerar o desenvolvimento da obesidade e de alterações no trato reprodutivo e nas glândulas mamárias, aumentando o risco ao câncer. Desta forma, neste estudo avaliamos a obesidade, o peso do útero e a morfologia e histomorfometria da glândula mamária de camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD).

2 | METODOLOGIA

2.1 Indução da Menopausa Cirúrgica por Ovariectomia Bilateral

Camundongos fêmeas *Swiss* de 100 dias de vida foram mantidas no biotério setorial sob condições padronizadas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h; Aprovação CEUA UFRJ-Macaé: 035). Todos os camundongos foram submetidos à ovariectomia bilateral que seguiu as normas de vivisseção de animais descritas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório sob a lei nº 11.794, de 08/10/2008 e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 12, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013). Os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal (IP) com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após, os camundongos receberam 50 mg/kg de peso corporal de dipirona por via subcutânea para analgesia (FIGUEIREDO et al., 2020). Foi realizada laparotomia bilateral para acesso aos ovários que foram retirados juntamente com o tecido adiposo periovariano. Em seguida, procedeu-se a sutura separada da musculatura e da pele. Após 14 dias da ovariectomia, foi realizada a constatação da indução da menopausa cirúrgica pela observação ao microscópio óptico da citologia vaginal coletada com auxílio de conta-gotas contendo solução de 0,9% de NaCl.

2.2 Grupos Experimentais

Fêmeas OVX que apresentaram por 14 dias citologia vaginal em anestro (Fig. 1; HENRIQUES et al., 2010; YOU et al., 2015) foram distribuídas aleatoriamente nos grupos experimentais: Controle (CTL), CTL exposto ao BPA (CBPA), dieta hiperlipídica (HFD) e HFD exposto ao BPA (HBPA). As fêmeas OVX receberam por 90 dias ração padrão (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, BRA) normolipídica (4,6% das kcal ingeridas provenientes de gordura) ou ração hiperlipídica (65,4% das kcal provenientes de gordura) e água filtrada contendo 0,01% de etanol sem (veículo; grupos CTL e HFD, respectivamente) ou com 1 $\mu\text{g/mL}$ de BPA (grupos CBPA e HBPA, respectivamente). A exposição pela água de beber visou menor estresse aos roedores e a dose escolhida se baseou nos estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa que demonstrou que nesta dose o BPA causa prejuízos morfofuncionais ao pâncreas endócrino e fígado (FIGUEIREDO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020). Previamente foi relatado que com base no consumo hídrico diário das fêmeas

OVX CBPA e HBPA a dose diária de exposição ao BPA foi de 70 µg/kg/dia (FIGUEIREDO et al., 2020).

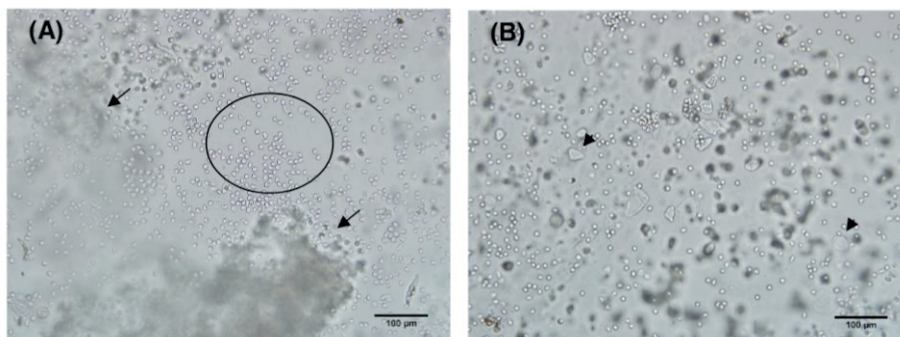


Figura 1: Fotomicrografias de citologia vaginal em anestro observada à fresco. Em A observa-se grande quantidade de leucócitos (círculo: O) e muco denso (setas: ↑). Em B observa-se grande quantidade de leucócitos e algumas células profundas (cabeça de seta: ►). Barra de escala = 100 µm.

2.3 Avaliação da Obesidade e do Peso do Útero

O peso corporal foi registrado no início do período experimental em todos os grupos de fêmeas OVX. Após 90 dias de exposição ao BPA e/ou ingestão de HFD, todas as fêmeas foram pesadas e o comprimento nasoanal (CNA) foi medido para obtenção do índice de Lee ($\text{peso corporal}^{1/3}/\text{CNA} \times 1000$). Em seguida, os camundongos foram eutanasiados por decapitação, procedeu-se a dissecação da pele na região abdomino-inguinal para a coleta do tecido adiposo subcutâneo e glândulas mamárias. Foi realizada laparotomia para coleta e pesagem do útero, e das gorduras periuterinas e parametriaais. O ganho de peso corporal total durante o período experimental foi obtido pela subtração do peso no dia da eutanásia pelo peso corporal registrado no início do período experimental (OLIVEIRA et al., 2020).

2.4 Morfologia e Histomorfometria das Glândulas Mamárias

A glândula mamária foi fixada em solução de formol de Carson por 48 h. Após, o tecido foi desidratado em série ascendente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina purificada (Biotec®, São José dos Pinhais, PR, BRA). Foram obtidas secções seriadas de 5 µm, com espaçamento de 100 µm entre os cortes. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e após registradas com o auxílio de câmera acoplada ao microscópio óptico. Para a análise das áreas percentuais na glândula mamária, em cada uma das imagens das secções da glândula mamária foi aplicada uma grade de pontos com auxílio do *software* Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>), e a partir da contagem manual, foram determinadas as estruturas mamárias de interesse (ductos-ácinos, gordura-conjuntivo e luz

de ductos e ácinos da glândula mamária). As áreas percentuais dos parâmetros avaliados na glândula mamária foram calculadas conforme descrito por POMPEI et al. (2005) com pequenas modificações. Além disso, foi realizada a contagem do número de adipócitos por campo avaliado da glândula mamária, e o diâmetro dos adipócitos foi manualmente medido utilizando-se a ferramenta *line* do Image J, sendo os valores em pixels corrigidos para micrômetros (μm) pela calibração do *software* com lâmina contendo régua de calibração para microscopia.

2.5 Western Blotting

Fragmentos da glândula mamária foram homogeneizados em solução contendo agentes anti-proteases e anti-fosfatases e após centrifugados a 15294 *g* por 40 min. Procedeu-se a quantificação proteica das amostras pelo método de Bradford e incubação a 100 °C por 5 min de 75 μg de cada amostra com 30% de tampão Laemmli (0,1% de azul de bromofenol, 1 M de fosfato de sódio, 50% de glicerol e 10% de SDS). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel bifásico de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad), as quais foram incubadas a 4°C *overnight* com anticorpo primário para a isoforma α do receptor nuclear de estrogênio (ER- α ; 1:1000, ab32063, Abcam), seguida da incubação por 2h com anticorpo policlonal anti-IgG (1:10000, Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). A detecção das proteínas foi realizada utilizando reagentes quimioluminescentes e o registro foi feito através de fotodocumentador (L-Pix Chemi Express, Loccus do Brasil, Cotia, SP, BRA). O procedimento foi repetido em todas as membranas, incubando-as com anticorpo para α -tubulina (1:10000, T6074, Sigma Aldrich), que foi utilizada como proteína controle da expressão proteica. A quantificação da densitometria das bandas foi feita através do software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para o número (n) de fêmeas OVX/grupo indicado nas legendas da tabela 1 e figuras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Os resultados foram submetidos ao teste de distribuição de normalidade Kolmogorov-Smirnov e então direcionados para testes de comparação paramétricos (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis seguido de Dunns). $P < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

3 | RESULTADOS

3.1 Avaliação da Obesidade e do Peso do Útero

Ao início do período experimental, o peso corporal foi similar entre todos os grupos

estudados de fêmeas OVX (Fig. 2A). Após 90 dias de ingestão de HFD as fêmeas OVX apresentaram aumento de 26% no peso corporal e maior ganho de peso corporal durante o período experimental (Fig. 2C), quando comparadas às fêmeas CTL ($P < 0,001$ e $P < 0.0001$, respectivamente). O grupo HFD também apresentou aumento de 40% e de 51% no peso das gorduras periuterinas (Fig. 2F) e parametriaes (Fig. 2G), respectivamente, em relação às fêmeas CTL ($P < 0,05$ e $P < 0.01$, respectivamente). Porém, não houveram diferenças no CNA, índice de Lee e no peso do útero entre as fêmeas HFD e CTL (Fig. 2D, 2E e 2H). A exposição ao BPA não modificou os parâmetros de obesidade e o peso do útero tanto nas fêmeas que consumiram HFD (grupo HBPA), quanto às alimentadas com dieta normolipídica (CBPA; Fig. 2).

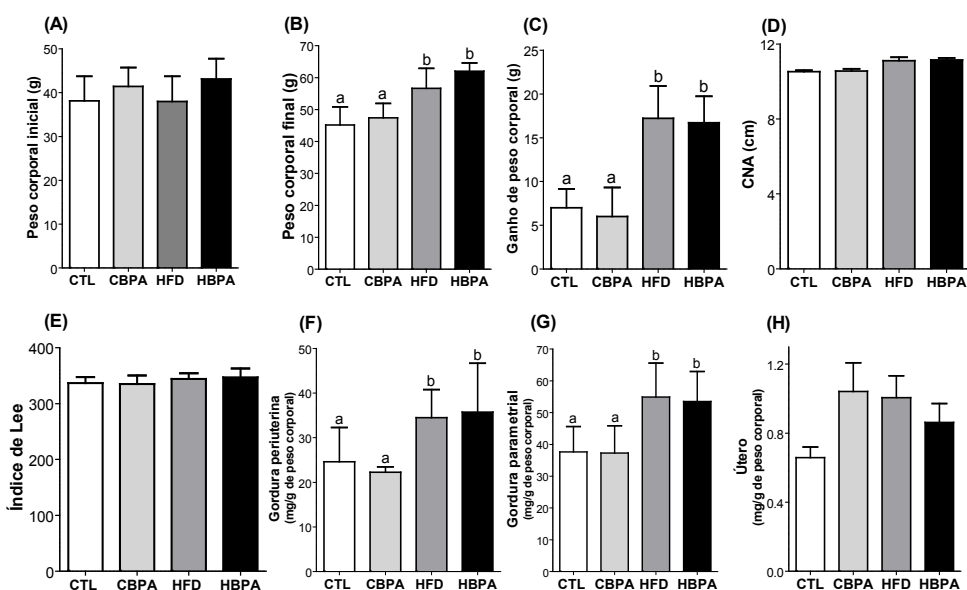


Figura 2: Média \pm EPM do peso corporal inicial (A) e final (B), ganho de peso corporal total (C), do comprimento nasoanal (CNA; D), índice de Lee (E), peso da gordura periuterina (F) e parametrial (G), e do peso do útero (H) de camundongos fêmeas OVX CTL ($n = 7$), CBPA ($n = 7$), HFD ($n = 8$) e HBPA ($n = 7$). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls, exceto para o peso do útero cujos dados foram comparados por Kruskal-Wallis seguido de Dunns, $P < 0,05$).

3.2 Morfologia, Histomorfometria e Expressão proteica do ER- α na Glândula Mamária

A morfologia da glândula mamária pode ser observada na figura 3. Em todos os grupos as áreas dos ductos apresentaram-se mais frequentes do que as áreas dos brotos alveolares (último estágio de ramificação das glândulas mamárias de camundongos). Em

nenhum dos grupos foi observada a presença do pigmento de lipofuscina, ou de mitose e apoptose. Também não foram vistas alterações adaptativas (hiperplasia, metaplasia ou displasia) ou neoplásicas (Fig. 3). Nos grupos CTL e HFD foram observadas ampla presença de tecido adiposo e conjuntivo e escassos ductos, que quando presentes, eram pouco desenvolvidos apresentando luz sem dilatação ou secreção (Fig. 3). A exposição ao BPA promoveu ações tróficas na glândula mamária tanto de fêmeas CBPA quanto HBPA, sendo observado maior número de ductos, os quais eram bem desenvolvidos, com luz ligeiramente dilatada contendo secreção em sua maioria (Fig. 3).

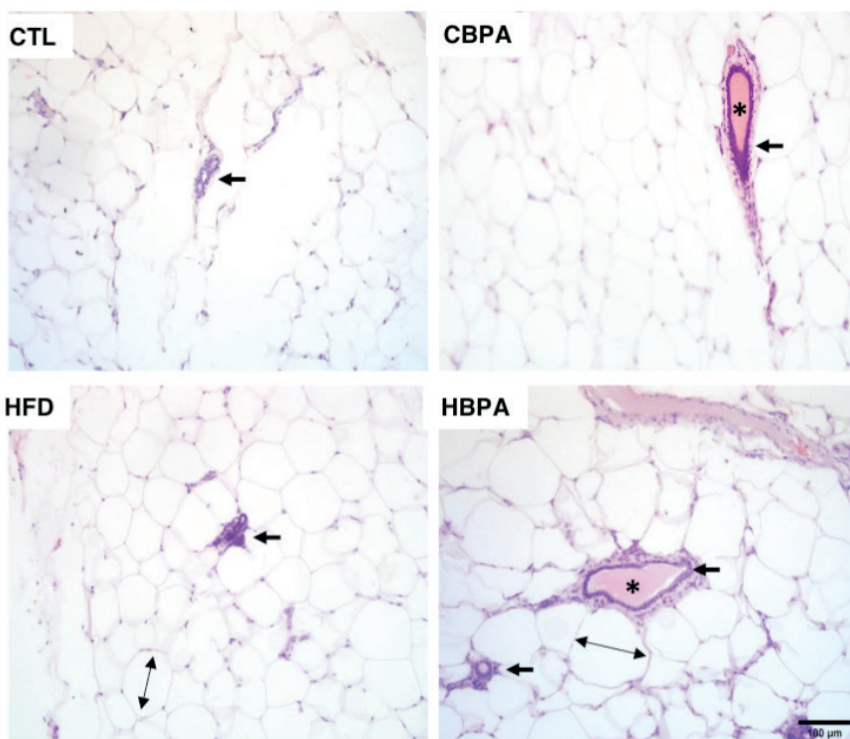


Figura 3: Fotomicrografias da glândula mamária de camundongos fêmeas OVX expostas ao BPA e alimentadas ou não com HFD. No grupo CTL e HFD o parênquima da glândula apresentou grande quantidade de tecido adiposo e escassos ductos/ácinos (setas: ↑), os quais se apresentavam pouco desenvolvidos e sem dilatação e/ou secreção luminal. Nos grupos expostos ao BPA, fêmeas CBPA e HBPA exibiram o tecido da glândula com ductos (seta: ↑) mais desenvolvidos e preenchidos com secreção na luz (asterisco: *). As fêmeas HFD e HBPA apresentaram adipócitos hipertróficos na glândula mamária (seta dupla: ↔). Barra de escala = 100 µm. Secções histológicas de 5 µm em espessura. Coloração HE.

A tabela 1 mostra os parâmetros histomorfométricos da glândula mamária. O percentual da área ocupada por ducto/ácino, luz e o percentual de gordura/tecido conjuntivo foram similares nas glândulas mamárias de fêmeas expostas ou não ao BPA e que

consumiram ou não HFD (Tab. 1). Porém, foi observado aumento de 26% no diâmetro dos adipócitos, sem modificação para o número (N.) de adipócitos/campo avaliado na glândula mamária das fêmeas HFD, em relação às CTL ($P < 0.001$; Tab. 1). As fêmeas HBPA apresentaram adipócitos hipertróficos na glândula mamária similares aos observados no grupo HFD (Tab. 1).

	CTL (n = 5)	CBPA (n = 5)	HFD (n = 5)	HBPA (n = 5)
% Ducto/ácino	2,83 ± 0,68	5,70 ± 1,75	3,19 ± 0,58	4,97 ± 2,53
% Luz ducto	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,80	0,20 ± 0,20	1,00 ± 1,00
% gordura/tecido conjuntivo	96,00 ± 1,14	73,20 ± 4,63	96,60 ± 0,93	94,40 ± 2,69
N. adipócitos/campo	38,00 ± 3,77	44,50 ± 7,39	31,74 ± 4,57	33,33 ± 2,33
Diâmetro dos adipócitos (μm)	56,75 ± 1,99 ^a	56,70 ± 2,55 ^a	71,53 ± 2,26 ^b	71,71 ± 1,93 ^b

Dados são médias ± EPM. Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis seguido de Dunns, $P < 0,05$).

Tabela 1: Parâmetros histomorfométricos avaliados na glândula mamária de camundongos fêmeas OVX expostas ao BPA e alimentadas ou não com HFD.

A figura 4 mostra a expressão proteica do ER- α na glândula mamária das fêmeas OVX expostas ao BPA em associação ou não com ingestão de HFD. O tipo de dieta ingerida ou a exposição ao BPA não modificaram o conteúdo proteico do ER- α na glândula mamária das fêmeas OVX.

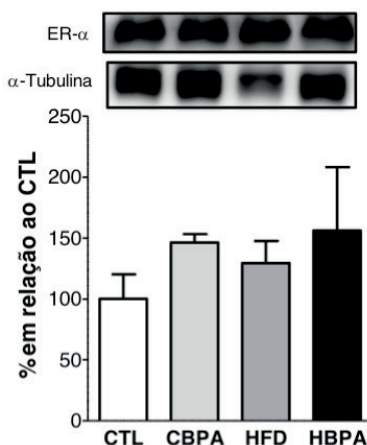


Figura 4: Bandas representativas do *Western blotting* para o ER- α e α -tubulina, e médias ± EPM do percentual da expressão proteica do ER- α / α -tubulina na glândula mamária de camundongos fêmeas OVX CTL (n = 3), CBPA (n = 3), HFD (n = 3) e HBPA (n = 3). Dados analisados por Kruskal-Wallis seguido de Dunns, $P < 0,05$.

4 | DISCUSSÃO

Apesar de haver dados na literatura demonstrando que o BPA pode aumentar a adiposidade (LEGEAY; FAURE, 2017), em nosso estudo não evidenciamos exacerbamento dos parâmetros indicadores de obesidade nas fêmeas HBPA e CBPA. Dados da literatura indicam que os efeitos obesogênicos do BPA podem divergir de acordo com o período/tempo de exposição, a concentração utilizada, pelo tipo de dieta associada, e até mesmo pela hiperatividade dos roedores (RUBIN; SCHAEBERLE; SOTO, 2019). A exposição de ratas *Sprague-Dawley* à 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de BPA no período gestacional e lactação aumentou na geração F1 o peso corporal e o estoque de tecido adiposo branco perigonadal (SOMM et al., 2009). Por outro lado, fêmeas *C57Bl/6* na idade adulta expostas à 5, 50, 500, e 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de BPA e alimentadas com HFD, não apresentaram elevação do peso corporal ou adiposidade (YANG et al., 2016). FERGUSON et al. (2011) relacionaram a não alteração da adiposidade e do peso corporal na prole F1 de ratas *Sprague-Dawley* expostas ao BPA à maior atividade locomotora. Essas evidências experimentais aliadas às observações do nosso estudo, sugerem que há vários fatores que podem regular e interferir nas ações obesogênicas do BPA. Além disso, recentemente demonstramos que apesar de camundongos fêmeas na pós-menopausa expostas ao BPA não apresentarem modificações no peso dos estoques viscerais de gordura (FIGUEIREDO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020), o DE aumentou a deposição de gordura no fígado (FIGUEIREDO et al., 2020). Portanto, as ações obesogênicas do BPA podem não ser observadas somente com procedimentos que avaliam macroscopicamente a adiposidade, assim não descartamos que modificações moleculares e funcionais no tecido adiposo possam estar sendo induzidas pelo BPA nas fêmeas OVX CBPA e HBPA.

É importante destacar que o peso uterino é um dos indicadores para a avaliação da ação hormonal estrogênica (HENRIQUES, 2013). Porém, o peso uterino das fêmeas CBPA e HBPA não diferiu dos seus respectivos grupos controles não expostos ao xenoestrogênio, indicando ação hormonal fraca do BPA neste tecido. Porém, a análise histomorfológica da glândula mamária dos grupos expostos ao BPA demonstrou que este DE exerceu ação hormonal neste tecido, mas de forma independente do tipo de dieta consumida pelas fêmeas OVX.

Muitos estudos têm relacionado a exposição ao BPA, nos períodos de vida intrauterino ou pós-natal, com modificações tróficas e proliferativas na glândula mamária (BETANCOURT et al., 2010; THARP et al., 2012; MANDRUP et al., 2016). Mas, pouco se sabe sobre os efeitos da exposição a este DE no período da pós-menopausa. Camundongos fêmeas *CD-1* expostas a 250 $\text{ng}/\text{kg}/\text{dia}$ de BPA durante a vida intrauterina, e que foram OVX aos 25 dias de vida pós-natal, apresentaram após 10 dias da ovariectomia, aumento do número de brotos alveolares terminais em relação à área ocupada pela árvore ductal da glândula mamária, porém, sem diferenças para a área ductal (MUÑOZ-DE-TORO et al., 2005). Sabe-

se que os brotos alveolares terminais são as estruturas frequentemente associadas com a susceptibilidade ao câncer (LOZADA E KERI, 2011). Entretanto, essas estruturas não são encontradas em roedores submetidas à ovariectomia, cuja estrutura mamária se apresenta atrófica, com presença apenas de ductos e ácinos (HENRIQUES, 2013). Corroborando com isso, em nosso estudo, os brotos alveolares terminais não foram observados em todos os grupos de fêmeas OVX, bem como a glândula mamária apresentou atrofia nos grupos CTL e HFD. A exposição ao BPA modificou este padrão tecidual da pós-menopausa, visto que tanto fêmeas CBPA, quanto HBPA, apresentaram a glândula mamária com ductos e ácinos mais desenvolvidos, com lúmen dilatado e contendo secreção. Essas características também foram previamente relatadas em roedores fêmeas expostas ao BPA no período intrauterino (MARKEY et al., 2001) ou idade adulta (IBRAHIM; ELBAKRY; BAYOMY, 2016), porém, as fêmeas CBPA e HBPA não demonstraram alterações hiperplásicas do epitélio ductal, um achado frequente nos estudos que abordam a exposição ao BPA durante a vida intrauterina e relacionam o xenoestrogênio à carcinogênese (MANDRUP et al., 2016; IBRAHIM; ELBAKRY; BAYOMY, 2016).

As ações tróficas e proliferativas do BPA sobre a glândula mamária podem ser mediadas por ativação de receptores para o estrogênio (MURATA; KANG, 2018). Em roedores ou primatas não-humanos o maior desenvolvimento dos tecidos da glândula mamária foi relacionado ao aumento da expressão do ER- α (IBRAHIM et al., 2016; THARP et al., 2012). Mas, em nosso estudo, o maior trofismo do tecido mamário das fêmeas CBPA e HBPA não foi acompanhado por modificações na expressão proteica do ER- α pelo DE. Todavia, BETANCOURT et al. (2010) observaram que ratas *Sprague-Dawley* expostas a 250 $\mu\text{g}/\text{dia}/\text{kg}$ de BPA durante a vida intrauterina apresentaram redução da expressão do ER- α na glândula mamária aos 50 dias de vida pós-natal, porém aumento do conteúdo proteico mamário do ER- α aos 100 dias de vida. Desta forma, a expressão deste receptor nuclear pode variar conforme o tempo de exposição ao BPA. Além disso, é possível que o DE tenha promovido as ações tróficas na glândula mamária das fêmeas OVX CBPA e HBPA por desbalanço na dinâmica de renovação celular via ativação de outros receptores. Em acordo, foi demonstrado que a exposição ao BPA acelerou a tumorigênese por aumentar a proliferação celular e reduzir a apoptose via ativação do receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina (JENKINS et al., 2011).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo, pela primeira vez, demonstrou que a exposição ao BPA durante a pós-menopausa, associado à ingestão de dieta normolipídica ou hiperlipídica, causou ações tróficas e secretórias sobre a glândula mamária, modificando o padrão estrutural do tecido mamário neste período da vida. Não observamos alterações hiperplásicas ou displásicas que poderiam ser consideradas pré-neoplásicas em roedores. Contudo, destaca-se que

são necessários maiores estudos, principalmente com abordagens moleculares, para se descartar que a exposição ao BPA durante a pós-menopausa, não constitui fator de risco ao surgimento precoce no sexo feminino de prejuízos no trato genital e nas glândulas mamárias.

REFERÊNCIAS

- BACLE, A.; THEVENOT, S.; GRIGNON, C.; BELMOUAZ, M.; BAUWENS, M.; TEYCHENE, B.; VENISSE, N.; MIGEOT, V.; DUPUIS, A. **Determination of bisphenol A in water and the medical devices used in hemodialysis treatment.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 505, n. 1–2, p. 115–121, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.003.
- BETANCOURT, A. M.; ELTOUM, I. A.; DESMOND, R. A.; RUSSO, J.; LAMARTINIERE, C. A. **In utero exposure to Bisphenol a shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat.** *Environmental Health Perspectives*, v. 118, n. 11, p. 1614–1619, 2010. DOI: 10.1289/ehp.1002148.
- BLÜMEL, J. E.; LAVÍN, P.; VALLEJO, M. S.; SARRÁ, S. **Menopause or climacteric, just a semantic discussion or has it clinical implications?** *Climacteric*, v. 17, n. 3, p. 235–241, 2014. DOI: 10.3109/13697137.2013.838948.
- CHEN, K. L.; MADAK-ERDOGAN, Z. **Estrogens and female liver health.** *Steroids*, v. 133, p. 38–43, 2018. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.10.015.
- CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. **The epidemiology of obesity.** *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 92, n. Mar, p. 6–10, 2019. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.09.005.
- DISTEFANO, J. K. **NAFLD and NASH in postmenopausal women: Implications for diagnosis and treatment.** *Endocrinology (United States)*, v. 161, n. 10, p. bqaa134, 2020. DOI: 10.1210/endo/bqaa134.
- DOERGE, D. R.; TWADDLE, N. C.; VANLANDINGHAM, M.; BROWN, R. P.; FISHER, J. W. **Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 255, n. 3, p. 261–270, 2011. DOI: 10.1016/j.taap.2011.07.009.
- FERGUSON, S. A.; LAW, C. D.; ABSHIRE, J. S. **Developmental treatment with bisphenol a or ethinyl estradiol causes few alterations on early preweaning measures.** *Toxicological Sciences*, v. 124, n. 1, p. 149–160, 2011. DOI: 10.1093/toxsci/kfr201.
- FIGUEIREDO, L. S.; OLIVEIRA, K. M.; FREITAS, I. N.; SILVA, J. A.; SILVA, J. N.; FAVERO-SANTOS, B. C.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, E. M.; RIBEIRO, R. A. **Bisphenol-A exposure worsens hepatic steatosis in ovariectomized mice fed on a high-fat diet: Role of endoplasmic reticulum stress and fibrogenic pathways.** *Life Sciences*, v. 256, p. 118012, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118012.
- GORE, A. C.; CHAPPELL, V. A.; FENTON, S. E.; FLAWS, J. A.; NADAL, A.; PRINS, G. S.; TOPPARI, J.; ZOELLER, R. T. **EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals.** *Endocrine Reviews*, v. 36, n. 6, p. E1–E150, 2015. DOI: 10.1210/er.2015-1010.
- GRAZIANI, N. S.; CARRERAS, H.; WANNAZ, E. **Atmospheric levels of BPA associated with particulate matter in an urban environment.** *Heliyon*, v. 5, n. 4, p. e01419, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01419.

HENRIQUES, H. N. **Efeito do uso contínuo de hormônios esteroides sexuais na mama de ratas Wistar**. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Patologia), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

HENRIQUES, H. N.; BERGMANN DE CARVALHO, A. C.; PANTALEÃO, J. A. S.; GUZMÁN-SILVA, M. A. **Effect of long-time administration of tibolone on vaginal cytology of castrated rats**. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*, v. 37, n. 2, p. 123–126, 2010.

IBRAHIM, M. A. A.; ELBAKRY, R. H.; BAYOMY, N. A. **Effect of bisphenol A on morphology, apoptosis and proliferation in the resting mammary gland of the adult albino rat**. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 97, n. 1, p. 27–36, 2016.

JENKINS, S.; WANG, J.; ELTOUM, I.; DESMOND, R.; LAMARTINIERE, C. A. **Chronic oral exposure to Bisphenol a results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in mmtv-erbB2 mice**. *Environmental Health Perspectives*, v. 119, n. 11, p. 1604–1609, 2011.

LEGEAY, S.; FAURE, S. **Is bisphenol A an environmental obesogen?** *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 31, n. 6, p. 594–609, 2017.

LI, Q.; DAVILA, J.; KANNAN, A.; FLAWS, J. A.; BAGCHI, M. K.; BAGCHI, I. C. **Chronic exposure to bisphenol a affects uterine function during early pregnancy in mice**. *Endocrinology*, v. 157, n. 5, p. 1764–1774, 2016.

LOZADA, K. W.; KERI, R. A. **Bisphenol A increases mammary cancer risk in two distinct mouse models of breast cancer**. *Biology of Reproduction*, v. 85, n. 3, p. 490–497, 2011.

MANDRUP, K. R.; HASS, U.; CHRISTIANSEN, S.; BOBERG, J. **Perinatal ethinyl oestradiol alters mammary gland development in male and female Wistar rats**. *International Journal of Andrology*, v. 35, p. 385–396, 2012.

MARKEY, C. M.; LUQUE, E. H.; DE TORO, M. M.; SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. **In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland**. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 4, p. 1215–1223, 2001.

MOHANTY, S. S.; MOHANTY, P. K. **Obesity as potential breast cancer risk factor for postmenopausal women**. *Genes & Diseases*, p. online sept. 10, 2019. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.09.006.

MUÑOZ-DE-TORO, M.; MARKEY, C. M.; WADIA, P. R.; LUQUE, E. H.; RUBIN, B. S.; SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. **Perinatal exposure to bisphenol-a alters peripubertal mammary gland development in mice**. *Endocrinology*, v. 146, n. 9, p. 4138–4147, 2005.

MURATA, M.; KANG, J. H. **Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways**. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 1, p. 311–327, 2018.

OLIVEIRA, K. M.; FIGUEIREDO, L. S.; ARAUJO, T.R.; FREITAS, I. N.; SILVA, J. N.; BOSCHERO, A. C.; RIBEIRO, R. A. **Prolonged bisphenol-A exposure decreases endocrine pancreatic proliferation in response to obesogenic diet in ovariectomized mice**. *Steroids*, v. 160, p. 108658, 2020.

ONSTAD, M. A.; SCHMANDT, R. E.; LU, K. H. **Addressing the role of obesity in endometrial cancer risk, prevention, and treatment.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 35, p. 4225–4230, 2016.

PETEFFI, G. P.; FLECK, J. D.; KAEI, I. M.; ROSA, D. C.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. **Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin - Rio Grande do Sul - Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 79, n. 4, p. 712, 2019.

POMPEI, L. M.; CARVALHO, F. M.; ORTIZ, S. C. B. C.; MOTTA, M. C.; CRUZ, R. J.; MELO, N. R. **Morphometric evaluation of effects of two sex steroids on mammary gland of female rats.** *Maturitas*, v. 51, p. 370–379, 2005.

REEVES, G. K.; PIRIE, K.; BERAL, V.; GREEN, J.; SPENCER, E.; BULL, D. **Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: Cohort study.** *British Medical Journal*, v. 335, n. 7630, p. 1134, 2007.

RUBIN, B. S.; SCHAEBERLE, C. M.; SOTO, A. M. **The case for BPA as an obesogen: Contributors to the controversy.** *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, p. 30, 2019.

SLOPIEN, R. *et al.* **Menopause and diabetes: EMAS clinical guide.** *Maturitas*, v. 117, p. 6–10, 2018.

SOMM, E.; SCHWITZGEBEL, V. M.; TOULOTTE, A.; CEDERROTH, C. R.; COMBESCURE, C.; NEF, S.; AUBERT, M. L.; HÜPPI, P. S. **Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat.** *Environmental Health Perspectives*, v. 117, p. 1549–1555, 2009.

THARP, A. P.; MAFFINI, M. V.; HUNT, P. A.; VANDEVOORT, C. A.; SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. **Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 21, p. 8190–8195, 2012.

YANG, M. *et al.* **Bisphenol a promotes adiposity and inflammation in a nonmonotonic dose-response way in 5-week-old male and female C57BL/6J mice fed a low-calorie diet.** *Endocrinology*, v. 157, n. 6, p. 2333–2345, 2016.

YOU, M. K.; KIM, D. W.; JEONG, K. S.; BANG, M. A.; KIM, H. S.; RHUY, J.; KIM, H. A. **St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) stimulates human osteoblastic MG-63 cell proliferation and attenuates trabecular bone loss induced by ovariectomy.** *Nutrition Research and Practice*, v. 9, n. 5, p. 459–65, 2015.

CAPÍTULO 4

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *VITEX AGNUS-CASTUS L.* (LAMIACEAE)

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 05/02/2021

Regiane Gonçalves

Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal do Amazonas
AM, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5888288871205945>

Vanessa Farias dos Santos Ayres

Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal do Amazonas
AM, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3144639161871200>

Carlos Eduardo de Carvalho

Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e
Tecnológicas, Universidade de Franca
SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9421476565366318>

Maria Gorete Mendes de Souza

Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e
Tecnológicas, Universidade de Franca
SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4045067130189785>

Anderson Cavalcante Guimarães

Instituto de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Amazonas
Manaus, AM, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0662433264074199>

Geone Maia Corrêa

Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal do Amazonas
AM, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7274488066461409>

Carlos Henrique Gomes Martins

Departamento de Microbiologia, Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade Federal de
Uberlândia
Uberlândia, MG, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8076024656192550>

Renata Takeara

Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal do Amazonas
AM, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0659464190667878>

Eliane de Oliveira Silva

Departamento de Química Orgânica, Instituto
de Química
Salvador, BA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7892882973970151>

Antônio Eduardo Miller Crotti

Departamento de Química, Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3885489458764834>

RESUMO: A multiplicação anormal de bactérias bucais causa cárie e placa dentária. Essas doenças continuam sendo um grande problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Neste estudo, a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Vitex agnus-castus* (OE-VAC) coletadas no Norte do Brasil contra um painel representativo de bactérias cariogênicas foram investigadas. A atividade antimicrobiana de OE-

VAC foi avaliada em termos de seus valores de concentração inibitória mínima (CIM) usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. Os constituintes químicos do OE-VAC foram identificados por Cromatografia Gasosa (CG-FID) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). OE-VAC exibiu alguma atividade contra todos os patógenos bucais investigados; os valores de CIM variaram de 15,6 a 200 µg/mL. OE-VAC apresentou atividade promissora contra *Streptococcus mutans* (CIM = 15,6 µg/mL), *Lactobacillus casei* (CIM = 15,6 µg/mL) e *Streptococcus mitis* (CIM = 31,2 µg/mL). Os compostos 1,8-cineol (23,8%), (*E*)-β-farneseno (14,6%), (*E*)-cariofileno (12,5%), sabineno (11,4%) e acetato de α-terpinil (7,7%) foram os principais constituintes químicos do OE-VAC. A eficácia do OE-VAC contra *S. mutans* merece destaque e deve ser investigada posteriormente.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias cariogênicas; 1,8-cineol; patógenos bucais; *Streptococcus mutans*

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *VITEX AGNUS-CASTUS* L. (LAMIACEAE)

ABSTRACT: Abnormal multiplication of oral bacteria causes dental caries and dental plaque. These diseases continue to be major public health concerns worldwide, mainly in developing countries. In this study, the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Vitex agnus-castus* leaves (VAC-EO) collected in the North of Brazil against a representative panel of cariogenic bacteria were investigated. The antimicrobial activity of OE-VAC was evaluated in terms of its minimum inhibitory concentration (MIC) values by using the broth microdilution method in 96-well microplates. The chemical constituents of OE-VAC were identified by gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). VAC-EO displayed some activity against all the investigated oral pathogens; MIC values ranged from 15.6 to 200 µg/mL. OE-VAC had promising activity against *Streptococcus mutans* (MIC= 15.6 µg/mL), *Lactobacillus casei* (MIC= 15.6 µg/mL), and *Streptococcus mitis* (MIC= 31.2 µg/mL). The compounds 1,8-cineole (23.8%), (*E*)-β-farnesene (14.6%), (*E*)-caryophyllene (12.5%), sabinene (11.4%), and α-terpinyl acetate (7.7%) were the major chemical constituents of VAC-EO. The efficacy of VAC-EO against *S. mutans* is noteworthy and should be further investigated.

KEYWORDS: cariogenic bacteria; 1-8-cineole; oral pathogens; *Streptococcus mutans*.

1 | INTRODUÇÃO

Bactérias acidogênicas e acidúricas podem formar um biofilme organizado causando a formação da placa dentária (CREVELIN et al., 2015). A escovação e o uso do fio dental são as estratégias mais eficazes para remover micro-organismos instalados na superfície do dente e, assim, prevenir cáries e doenças gengivais. Devido à dificuldade de se controlar a formação do biofilme e remover completamente o biofilme por meios mecânicos, a maioria da população falha em garantir cuidados bucais adequados (MELO et al., 2015). Alguns produtos contendo agentes antimicrobianos têm sido utilizados como medida complementar para auxiliar na diminuição da formação de biofilme na superfície

dentária (CREVELIN et al., 2015). A clorexidina tem sido amplamente aplicada para esse fim por apresentar propriedades anticariogênicas. No entanto, seu uso regular em produtos de higiene bucal muitas vezes leva a vários efeitos colaterais e contribui para o surgimento de resistência microbiana (AGUIAR et al., 2013b).

Vitex agnus-castus L. (Lamiaceae) é uma pequena árvore ou arbusto nativo de países europeus, mediterrâneos e da Ásia Central. No Brasil, imigrantes europeus introduziram *V. agnus-castus* na região amazônica (ZOGHBI; ANDRADE; MAIA, 1999). Esta planta possui um potencial biológico bastante conhecido. Seus efeitos diuréticos, antissépticos, digestivos, antifúngicos, ansiolíticos, afrodisíacos, emenagogos, antiespasmódicos e analgésicos têm sido aplicados na medicina popular. *V. agnus-castus* também tem sido empregada para tratar mastopatias, para inibir receptores dopaminérgicos D2 e receptores opioides e para inibir a síntese de prolactina, entre outros usos (ZAHID; RIZWANI; ISHAQE, 2016). Além disso, essa espécie é uma das plantas medicinais mais tradicionais e eficazes no alívio das cólicas uterinas e na regulação da menstruação (CHHABRAKALA; KULKARNI, 2011; MARI et al., 2012). O óleo essencial (OE) extraído das sementes de *V. agnus-castus* apresenta atividade antimicrobiana contra espécies de *Candida* sp causadoras de infecções nosocomiais (ASDADI et al., 2015). O OE extraído das folhas desta espécie de planta atua contra alguns fitopatógenos importantes, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). O OE extraído do fruto e das folhas de *V. agnus-castus* também exerce atividade contra *Salmonella typhimurium* e *Micrococcus flavus* (STOJKOVIĆ et al., 2011).

Neste capítulo serão abordadas a constituição química e a atividade antimicrobiana do OE de *Vitex agnus-castus* cultivada no Norte do Brasil contra um painel representativo de bactérias cariogênicas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Vitex agnus-castus L. (Lamiaceae) foi coletada próximo à cidade de Itacotiara (58°26'54.3"S 3°8'28.8"O), Amazonas, Brasil em junho de 2009 e identificada pelo Prof. Ari de Freitas Hidalgo (Universidade Federal do Amazonas). Uma exsicata (HUAM 8268) foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil (Herbário UFAM).

2.2 Extração do Óleo Essencial

Folhas frescas de *V. agnus-castus* (1500 g) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger por 3 h. Antes da extração, o material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. O

óleo essencial de *V. agnus-castus* (OE-VAC) foi coletado manualmente e vestígios de água foram removidos pela adição de sulfato de sódio anidro. Após a filtração, o óleo obtido (OE-VAC) foi armazenado a 4°C, no escuro, até o momento da análise. O rendimento (massa/massa) de OE-VAC foi calculado a partir do peso das folhas frescas e expresso como a média das três análises.

2.3 Análises por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os constituintes químicos do OE-VAC foram identificados com base em metodologia publicada anteriormente (AGUIAR et al., 2013a; MELO et al., 2015; VIEIRA et al., 2017). Para tanto, as amostras foram solubilizadas em éter etílico e analisadas em cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20s, detector FID, coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm di; 0,25 µm de espessura de filme) e processador para tratamento de dados. A temperatura da coluna foi programada para aumentar de 60 para 240°C a 3°C/min e foi então mantida a 240°C por 5 min. Hélio (99,999%) foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. O volume da amostra injetada foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes químicos de OE-VAC foram obtidas pela normalização das áreas dos picos (%). As áreas relativas foram expressas como a média de três análises em CC-FID.

As análises por CG-EM foram realizadas em um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) equipado com um injetor automático AOC-20i, coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m de comprimento x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura de filme) e fonte de ionização por elétrons (EI-MS) operando a 70 eV. O gás de arraste foi o hélio (99,999%) a um fluxo de 1,0 mL/min, e o volume de injeção foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram fixadas em 240 e 280°C, respectivamente. A programação da temperatura do forno foi a mesmo usada para CG-FID. Os espectros de massas foram obtidos com intervalo de varredura de 0,5 s, de 40 a 600 Da. Os componentes químicos de OE-VAC foram identificados com base em seus índices de retenção aritmética obtidos em uma coluna capilar Rtx-5MS, sob as mesmas condições operacionais usadas para CG-FID, em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963). As estruturas foram determinadas com base nos dados espectrais contidos nas bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, bem como na comparação de seus padrões de fragmentação com os da literatura (ADAMS, 2007).

2.4 Cepas Bacterias e Ensaio Antimicrobiano

A atividade antimicrobiana *in vitro* do OE-VAC foi determinada pelo ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) com base no método de microdiluição em caldo (CLSI, 2009). *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *S.*

mutans (ATCC 25175), *S. mitis* (ATCC 49456), *S. sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082) foram as cepas padrão usadas no ensaio. Inicialmente, as bactérias foram transferidas para meio ágar sangue (Difco Labs, Detroit, Mich, EUA) e as colônias individuais de 24 h foram suspensas em 10 mL de caldo triptona de soja (Difco). Um espectrofotômetro (Femto, São Paulo, Brasil) operando no comprimento de onda (λ) de 625 nm foi utilizado para padronizar as suspensões de cada micro-organismo, para igualar à transmitância de 81, equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A diluição da suspensão padronizada gerou a concentração final de 5×10^5 UFC/mL. O óleo essencial OE-VAC foi dissolvido em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 16,0 mg/mL. Concentrações variando de 4000 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas após a diluição do OE-VAC em caldo triptona de soja (Difco). Após as diluições, as concentrações de DMSO ficaram entre 4% e 0,0039% (v/v). Controles negativos, três poços inoculados contendo DMSO em concentrações variando de 4% a 1%, e um poço não inoculado sem agente antimicrobiano foram incluídos. Um poço inoculado ajudou a avaliar se o caldo era adequado para o crescimento dos micro-organismos. O controle positivo foi o dicloridrato de clorexidina (Sigma-Aldrich, St. Louis) em concentrações variando de 5,9 a 0,115 $\mu\text{g/mL}$, diluído em caldo triptona de soja (Difco). As microplacas (96 poços) foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, 30 μL de uma solução aquosa de resazurina a 0,02% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados em cada poço da microplaca para indicar a viabilidade do micro-organismo (PALOMINO et al., 2002). A menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do micro-organismo (CIM) foi determinada como a concentração de OE-VAC capaz de impedir a alteração da cor da solução de resazurina (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 | RESULTADOS

3.1 Constituintes Químicos do Óleo Essencial de *Vitex agnus-castus* (OE-VAC)

As folhas de *Vitex agnus-castus* L. (Lamiaceae) forneceram um óleo essencial amarelado (OE-VAC) com rendimento de $0,09 \pm 0,01\%$ (m/m). Na Tabela I estão listados os 29 compostos identificados neste óleo. As análises de CG-FID e CG-EM revelaram que monoterpenos (62,4%) foram os principais constituintes de OE-VAC, enquanto 1,8-cineol (**2**, 23,8%), (*E*)- β -farneseno (**5**, 14,6%), (*E*)-cariofileno (**4**, 12,5%), sabineno (**1**, 11,4%) e acetato de α -terpinila (**3**, 7,7%) foram os constituintes principais (Figura 1).

Substância	IR _{exp} ¹	IR _{lit} ²	AR% ³	Identificação ⁴
α -Thujeno	924	931	0,2	RL MS
α -pineno	931	939	5,9	RL MS
Sabineno	971	976	11,4	RL MS
β -pineno	977	980	0,9	RL MS
myrceno	987	991	2,1	RL MS
1-felandreno	1006	1139	0,6	RL MS
α -terpineno	1016	1018	0,3	RL MS
p -cimeno	1023	1026	0,2	RL MS
limoneno	1028	1031	2,8	RL MS
1,8-cineol	1031	1033	23,8	RL MS
(E)- β -ocimeno	1043	1050	0,6	RL MS
γ -terpineno	1056	1062	0,7	RL MS
α -terpinoleno	1084	1088	0,3	RL MS
linalool	1100	1098	0,2	RL MS
4-terpineol	1179	1177	2,0	RL MS
α -terpineol	1194	1189	2,1	RL MS
acetato de α -terpinil	1345	1352	7,7	RL MS
acetato de citronelilla	1349	1354	0,6	RL MS
α -gurjuneno	1402	1409	0,2	RL MS
(E)-cariofileno	1415	1418	12,5	RL MS
(E)- β -farneseno	1452	1458	14,6	RL MS
aloaromadendreno	1454	1461	0,6	RL MS
bicyclogermacreno	1490	1494	6,6	RL MS
spatuleno	1571	1576	0,4	RL MS
óxido de cariofileno	1575	1581	0,4	RL MS
viridiflorol	1588	1590	0,2	RL MS
α -cadinol	1650	1653	0,2	RL MS
Hidrocarbonetos				
monoterpenos			26,0	
Monoterpenos oxigenados			36,4	
Hidrocarbonetos				
sesquiterpenos			34,5	
Sesquiterpenos				
oxigenados			1,2	
Total			98,1	

¹IR_{exp}: Índice de retenção experimental, determinado em relação a *n*-alcanos (C₈-C₂₀) na coluna Rtx-5MS; ²IR_{lit}: índice de retenção reportado na literatura (ADAMS, 2007); ³AR: área relativa (área do pico relativa à área total de picos no cromatograma CG-FID), média de três triplicatas; ⁴RL: comparação do IR_{exp} com a literatura; MS: Comparação dos espectros de massa com aqueles das bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 12.

Tabela I. Constituintes químicos do óleo essencial de *Vitex agnus-castus* (OE-VAC)

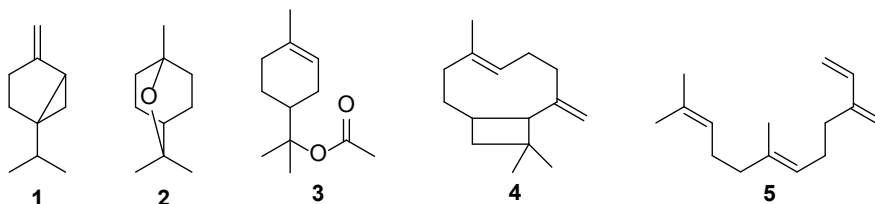


Figura 1. Estruturas químicas dos monoterpenos sabineno (1), 1,8-cineol (2), acetato de α -terpinila (3), (*E*)-cariofileno (4) e (*E*)- β -farneseno (5).

3.2 Atividade Antimicrobiana do OE-VAC

A atividade antimicrobiana bacteriana *in vitro* (valores CIM, Tabela II) de OE-VAC foi avaliada contra um painel representativo de bactérias cariogênicas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com dicloridrato de clorexidina (controle positivo). De acordo com a literatura, valores de CIM menores que 100 $\mu\text{g/mL}$, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ e entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ correspondem a atividades antimicrobianas promissoras, moderadas e fracas, respectivamente, enquanto valores de CIM maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ denotam inatividade (GIBBONS, 2004; RÍOS; RECIO, 2005; SALEEM et al., 2010). Com base nesses critérios, OE-VAC exibiu atividade moderada contra *S. salivarius*, *S. sanguinis* e *E. faecalis* (CIM= 200 $\mu\text{g/mL}$), e *S. sobrinus* (CIM= 125 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, o OE-VAC teve atividade promissora contra *S. mutans* (CIM= 15,6 $\mu\text{g/mL}$), *L. casei* (CIM= 15,6 $\mu\text{g/mL}$), e *S. mitis* (CIM= 31,25 $\mu\text{g/mL}$).

Micro-organismos	OE-VAC	Clorexidina ¹
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	15,6	1,8
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	31,25	14,7
<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	200	7,4
<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478)	125	1,8
<i>Streptococcus salivarius</i> (ATCC 25975)	200	7,4
<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 11578)	15,6	3,7
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4082)	200	14,7

¹ Dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

Tabela II. Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial de *Vitex agnus castus* (OE-VAC) frente a bactérias cariogênicas selecionadas

4 | DISCUSSÃO

A composição química do óleo essencial extraído de *Vitex agnus-castus* coletado no Egito (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014), Turquia (DUYMUŞ et al., 2014; SARIKURKCU et al., 2009), Marrocos (ASDADI et al., 2015), Sérvia (STOJKOVIĆ et al., 2011) e Brasil (ZOGHBI; ANDRADE; MAIA, 1999) foram investigadas previamente. Embora o conteúdo e a composição de um óleo essencial possam variar consideravelmente entre amostras coletadas em locais diferentes e em estações do ano distintas (BASER; BUCHBAUER, 2010), poucos constituintes foram identificados nos óleos essenciais de *Vitex agnus-castus* além dos monoterpenos 1,8-cineol, sabineno, α -pineno, e acetato de α -terpinil, e dos sesquiterpenos (*E*)- ou (*Z*)-*b*-farneseno e (*E*)-cariofileno. No presente estudo, nós detectamos 1,8-cineol, sabineno, acetato de α -terpinila, (*E*)-cariofileno, e (*Z*)-*b*-farneseno como os constituintes químicos majoritários de OE-VAC. A composição química de OE-VAC apresentou-se muito semelhante à composição química do óleo essencial extraído de um espécime de *V. agnus-castus* coletado no norte do Brasil (ZOGHBI; ANDRADE; MAIA, 1999). No entanto, o conteúdo de (*E*)-cariofileno mostrou-se consideravelmente maior em OE-VAC.

Alguns relatos explicam que a lipofilicidade dos constituintes químicos dos óleos essenciais está associada à sua atividade antimicrobiana. Os principais componentes lipofílicos desses óleos são monoterpenos e sesquiterpenos (VIEIRA et al., 2017). A lipofilicidade permite que os componentes dos óleos essenciais se difundam facilmente pelas membranas celulares e, então, afetem o correto funcionamento das vias metabólicas ou organelas dos micro-organismos. Os óleos essenciais também podem inibir as sínteses de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos em células bacterianas (ABAD et al., 2012). A correlação entre a lipofilicidade dos constituintes de um óleo essencial e sua atividade antimicrobiana tem nos motivado a investigar a atividade antibacteriana de alguns óleos essenciais contra bactérias cariogênicas (AGUIAR et al., 2013b; BARDAJÍ et al., 2016; CREVELIN et al., 2015). Neste estudo, verificou-se que OE-VAC exibe atividade promissora contra *Streptococcus mutans* (CIM= 15,6 $\mu\text{g/mL}$), *Lactobacillus casei* (CIM= 15,6 $\mu\text{g/mL}$), e *Streptococcus mitis* (CIM= 31,25 $\mu\text{g/mL}$). Esses resultados merecem ser destacados porque *S. mutans* é um dos principais agentes causadores da cárie dentária e sua inibição por compostos naturais é incomum (SALEEM et al., 2010).

De acordo com a literatura, óleos essenciais extraídos de diferentes partes de *V. agnus-castus* exibem atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (EKUNDAYO et al., 1990; GÖRLER; OEHLKE; SOICKE, 1985). Estudos anteriores associaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Vitex* sp. com o seu conteúdo de 1,8-cineol devido ao aumento da atividade do óleo essencial com o aumento do conteúdo de 1,8-cineol (NYILIGIRA et al., 2004). Uma vez dentro da célula microbiana, 1,8-cineol pode interagir com enzimas

e proteínas da membrana para reverter o fluxo de prótons, o que afetaria a atividade celular (STOJKOVIĆ et al., 2011). No entanto, nos nossos estudos, 1,8-cineol sozinho não apresentou atividade antibacteriana significativa (MIC > 1000 µg/mL, dados não mostrados). Em resumo, a atividade antimicrobiana do OE-VAC pode estar correlacionada a outros componentes principais ou mesmo a componentes minoritários que podem aumentar a atividade dos constituintes químicos majoritários deste óleo essencial via mecanismo sinérgico. No entanto, embora a atividade antimicrobiana do OE-VAC possa estar relacionada à lipofilicidade de seus monoterpênos, o mecanismo exato pelo qual o OE-VAC exerce sua ação antimicrobiana não está claro e deve ser investigado posteriormente.

5 | CONCLUSÕES

Os resultados apresentados destacam que o óleo essencial das folhas de *Vitex agnus-castus* (OE-VAC) exibe uma atividade antimicrobiana interessante e promissora contra algumas bactérias cariogênicas importantes, incluindo *Streptococcus mutans*. Nesse sentido, OE-VAC pode ser usado como um componente promissor de novos produtos de higiene bucal, já que *S. mutans* é um dos principais agentes causadores de distúrbios orais, entre eles a cárie dentária.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2007/54241-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos financiamentos a projetos e bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. et al. The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2542–2566, 2012.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGUIAR, G. P. et al. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil from the flowers of *Bidens sulphurea* (Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 10, p. 920–924, 2013a.
- AGUIAR, G. P. et al. Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1668–1672, 2013b.

ASDADI, A. et al. Study on chemical analysis, antioxidant and *in vitro* antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. e118–e127, 2015.

BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776–782, 2014.

BARDAJÍ, D. K. R. et al. Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. **Natural Product Research**, v. 30, n. 10, p. 1178–1181, 2016.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils - science, technology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010.

CHHABRAKALA, G. S.; KULKARNI, S. *Vitex agnus-castus* - An overview. **Journal of Natural Remedies**, v. 11, n. 2, p. 90–97, 2011.

CLSI. CLSI document M7-A8. In: **Susceptibility testing of aerobic bacteria. Approved standard**. 8th ed. Wayne, PA: NCCLS, 2009. p. 15.

CREVELIN, E. J. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–6, 2015.

DUYMUŞ, H. G. et al. The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 33–42, 2014.

EKUNDAYO, O. et al. The chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil of *Vitex agnus-castus* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, n. 3, p. 115–119, 1990.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 2, p. 263, 2004.

GÖRLER, K.; OEHLKE, D.; SOICKE, H. Iridoidführung von *Vitex agnus-castus*. **Planta Medica**, v. 51, n. 06, p. 530–531, 1985.

MARI, A. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of chemical markers and principal component analysis of *Vitex agnus-castus* L. fruits (Verbenaceae) and derived food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 224–230, 2012.

MELO, N. I. DE et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 519–525, 2015.

NYILIGIRA, E. et al. Essential oil composition and *in vitro* antimicrobial and anti-inflammatory activity of South African *Vitex* species. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 4, p. 611–617, 2004.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 2720–2722, 2002.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, 2005.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 238–254, 2010.

SARIKURKCU, C. et al. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 10, p. 2479–2483, 2009.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. v. **Methods** 42, p. 321–324, 2007.

STOJKOVIĆ, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1017–1022, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VIEIRA, T. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* (Asteraceae) leaves. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 1, p. 123–131, 2017.

ZAHID, H.; RIZWANI, G. H.; ISHAQE, S. Phytopharmacological review on *Vitex agnus-castus*: A potential medicinal plant. **Chinese Herbal Medicines**, v. 8, n. 1, p. 24–29, 2016.

ZOGHBI, M. DAS G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. The essential oil of *Vitex agnus-castus* L. growing in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 4, p. 211–213, 1999.

CAPÍTULO 5

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *SALMONELLA* SPP. NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 05/01/2021

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva

Centro Universitário do Triângulo – UNITRI
Uberlândia – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/1121388507923862>

Vanessa Silva Miranda

Universidade Luterana do Brasil – ILES/ULBRA
Itumbiara – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/6915395969409076>

Nayane Lopes Ferreira

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA
Canoas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/1913110277745589>

Laressa Dacle Tomaz

Universidade Luterana do Brasil – ILES/ULBRA
Itumbiara – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/3090108991284639>

Vitor Simão da Silva

Centro Universitário do Triângulo – UNITRI
Uberlândia – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/1538529119105994>

Karina Santos Silva

Faculdade UNA
Itumbiara – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/0606700737908782>

RESUMO: A *Salmonella* spp. é um importante agente zoonótico que pode ser disseminado ao longo da cadeia produtiva de frangos. O

isolamento e os testes bioquímicos são uma ferramenta amplamente utilizada na microbiologia para auxiliar na identificação de bactérias. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar amostras fecais frescas e de suabes cloacais de um plantel de frangos criados para o abate industrial, a fim de se isolar e identificar bioquimicamente *Salmonella* spp. O estudo foi realizado com um lote de frangos de corte pertencente a uma granja comercial da cidade de Monte Carmelo-MG. Para tanto, foram colhidas 50 amostras de fezes frescas e 50 amostras de suabes cloacais, as quais foram transportadas, armazenadas e acondicionadas sob refrigeração no Laboratório de Microbiologia do ILES/ULBRA de Itumbiara-GO. As amostras foram submetidas às análises microbiológicas de cultivos de enriquecimento seletivos e não seletivos e ao plaqueamento em placas de petri. Das 50 amostras de fezes frescas e de suabes cloacais analisados, nenhuma originou colônias com características sugestivas de *Salmonella* spp., demonstrando o isolamento negativo para esta bactéria nas amostras analisadas. A ausência do isolamento dessa bactéria no plaqueamento pode estar associada ao alto controle sanitário que é aplicado ao plantel amostrado, como foi evidenciado no inquérito epidemiológico.

PALAVRAS - CHAVE: Diagnóstico. Bacteriologia. Zoonose. Saúde pública.

ABSTRACT: *Salmonella* spp. is an important zoonotic agent that can be disseminated throughout the chicken production chain. Isolation and biochemical tests are a tool widely used in microbiology to assist in the identification

of bacteria. Therefore, the present study aimed to analyze fresh fecal samples and cloacal swabs from a broiler flock bred for industrial slaughter, in order to isolate and biologically identify *Salmonella* spp. The study was carried out with a batch of broilers belonging to a commercial farm in the city of Monte Carmelo-MG. For that, 50 samples of fresh feces and 50 samples of cloacal swabs were collected, which were transported, stored and conditioned under refrigeration at the Microbiology Laboratory of ILES / ULBRA in Itumbiara-GO. The samples were subjected to microbiological analysis of selective and non-selective enrichment cultures and plating in petri dishes. Of the 50 samples of fresh feces and cloacal swabs analyzed, none originated colonies with characteristics suggestive of *Salmonella* spp., demonstrating the negative isolation for this bacterium in the analyzed samples. The absence of isolation of this bacterium in the plating may be associated with the high sanitary control that is applied to the sampled squad, as evidenced in the epidemiological survey.

KEYWORDS: Diagnosis. Bacteriology. Zoonosis. Public health.

1 | INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma zoonose causada pela *Salmonella* spp. que causa transtornos à saúde pública pela sua capacidade de causar toxinfecção alimentar. Esta zoonose é causada pelo consumo de alimentos, como carne e ovos, contaminados por *Salmonella* spp. já no início da cadeia produtiva avícola (FILHO et al., 2014).

Salmonella é um gênero de bactérias conhecidas vulgarmente como salmonelas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo conhecidas há mais de um século. São bactérias Gram negativas, em forma de bastonete, não formam esporos, consideradas anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose e outros açúcares, e descarboxiladoras de aminoácidos, como a lisina (SANTOS et al., 2013). A maioria apresenta flagelo para sua locomoção, exceto as pertencentes aos sorotipos Pullorum e Gallinarum (SCHUBERT, 2008).

Essa bactéria está entre as principais envolvidas em surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, com ampla disseminação e causando amplo impacto negativo na saúde e economia animal, uma vez que o homem e os animais são seus principais hospedeiros (FRANCHIN, 2008). Dessa maneira, se configura como uma das enterobactérias mais patogênicas, responsável por complicações clínicas e mortalidade entre seus hospedeiros (PEREIRA et al., 2013).

Nas aves, a *Salmonella* spp. pode causar doenças agudas ou crônicas, sendo classificadas em três enfermidades: a Pulorose, causada pela *Salmonella enterica* Pullorum, o Tifo Aviário causada pela *Salmonella enterica* Gallinarum; ambas os sorotipos adaptadas apenas às aves, e ainda o Paratifo Aviário, causada pela *Salmonella enterica* Enteritidis e pela *Salmonella enterica* Typhimurium, os quais são adaptadas tanto nas aves quanto nos humanos, nos quais podem causar toxinfecções alimentares (PEREIRA et al., 2013).

Em 1994, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o

Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com o objetivo de normatizar sanitariamente a avicultura comercial e estabelecer ações para a regulamentação da produção avícola e proteção da saúde do plantel nacional, além de reduzir o risco de transmissão para o homem. Estrategicamente, o PNSA foi implementado para prevenir, controlar ou erradicar as principais doenças de interesse econômico na avicultura e também relacionadas saúde pública, incluindo algumas zoonoses aviárias; além de estabelecer medidas para a certificação sanitária e fornecer produtos avícolas seguros e de boa qualidade para o mercado interno e externo (BRASIL, 2016).

A vasta disseminação de *Salmonella* spp. em rebanhos avícolas está relacionada diretamente as modernas técnicas de manejo, ausência do controle sanitário, equipamentos e instalações, alimentação das aves, animais domésticos e granjas vizinhas; assim comprometendo o sistema de defesa dessas aves. Mesmo com medidas criteriosas de biossegurança e programas sanitários para a profilaxia, a presença desta bactéria no ambiente é altamente prevalente, garantindo apenas uma redução na pressão de infecção das aves (GAMA, 2001).

Tendo em vista a disseminação de *Salmonella* spp. em rebanhos avícolas brasileiros, seria possível isolar este patógeno em um plantel de frangos de uma granja comercial? Diante do exposto e do respaldo da grande capacidade de disseminação e resistência da *Salmonella* spp. no meio ambiente (GAMA, 2001), que garantem a sua alta prevalência nos rebanhos avícolas brasileiros, aponta-se a possibilidade de isolamento dessa bactéria em um plantel avícola comercial criado em um sistema de criação intensiva.

Este trabalho justifica-se pela grande importância da *Salmonella* spp. na saúde pública, uma vez que tem sido incriminada como o agente principal responsável por surtos de intoxicações alimentares humanas, alta morbidade e septicemia (FERREIRA et al., 2013). Ademais, essa enfermidade causa sérios prejuízos à indústria e rebanhos avícolas, com queda na produção de ovos, perda de peso devido à baixa conversão alimentar e mortalidade, necessitando de adequação às exigências do mercado e ao controle pelo PNSA (MATTIELLO, 2013).

O objetivo principal deste trabalho foi analisar amostras fecais frescas e suabes cloacais de um plantel de frangos comerciais, a fim de se isolar e identificar bioquimicamente a *Salmonella* spp. Secundariamente, objetivou-se: a) realizar um inquérito epidemiológico para subsidiar os achados bacteriológicos; b) analisar e discutir comparativamente a detecção a partir de amostras de fecais frescas e suabes cloacais; c) caracterizar as colônias isoladas e discutir a identificação bioquímica.

2 | METODOLOGIA

2.1 Inquérito epidemiológico, origem, coleta e transporte das amostras

Para o levantamento do histórico sanitário das aves e das condições de biossegurança da unidade de produção avícola, foi realizado um inquérito epidemiológico (IE) em forma de questionário. O IE foi elaborado de acordo com Back (2010) com algumas modificações e foi aplicado ao proprietário da granja responsável pelas aves.

A granja onde as amostras foram coletadas se localizava no município de Monte Carmelo-MG. Essa granja possuía 12 galpões convencionais com bom isolamento sanitário, constituído de barreiras verdes e isolamento físico, com ausência de outros animais, como canídeos e roedores, sem a presença de granjas na circunvizinhança.

O lote amostrado era composto por aves da espécie *Gallus gallus* com cerca de 15 dias de idade, cuja finalidade era corte, sendo o abate previsto para o 45º dia de vida. O lote era criado em confinamento, em uma área aproximada de 1.500 m², sob condições ambientais de bem-estar adequadas às aves.

O lote amostrado não recebeu e nem estava recebendo medicação nos últimos dias 15 dias. Igualmente, não recebeu vacinação contra *Salmonella* Enteritidis. No entanto, de acordo com a instrução normativa nº 78 de 3 de novembro de 2003, o estabelecimento avícola deverá ser vacinado mensalmente contra *Salmonella* Enteritidis, usando apenas vacinas inativadas e devem estar sob tratamento contínuo medicamentoso para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium sob acompanhamento e controle do MAPA (BRASIL, 2003).

Foram coletadas 50 amostras de fezes frescas e 50 amostras de suabes cloacais, sendo que cada tipo de espécime foi obtido pareada e individualmente da mesma ave. As amostras foram identificadas por números de 1 a 50.

Concomitantemente às coletas, os suabes cloacais individuais foram devidamente colocados em sua embalagem original, e fechados com fita isolante. Cerca de 25,0 gramas de fezes frescas foram coletadas individualmente com auxílio de espátulas estéreis e acondicionadas em frascos, também, estéreis. Simultaneamente às coletas, as amostras foram acondicionadas em caixas refrigeradas com gelo.

Ao final das coletas, as amostras foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Luterana do Brasil, no município de Itumbiara-GO, onde foram acondicionadas entre 2 e 8 °C até o processamento.

2.2 Bacteriologia

Para a realização do diagnóstico bacteriológico, as amostras coletadas foram conduzidas às etapas de enriquecimento, isolamento e, posteriormente, a série de testes bioquímicos, de acordo com a portaria nº 126, de 3 de novembro de 1995, com algumas modificações (BRASIL, 2002).

2.2.1 *Enriquecimento em caldo não seletivo e caldo seletivo*

A etapa inicial das análises bacteriológicas foi a de submissão das amostras em caldos de enriquecimento não seletivo e enriquecimento seletivo. Para o enriquecimento não seletivo, 2,0 g de fezes de cada amostra foram inoculados em 20,0 mL de BHI (Caldo de cérebro e coração) e 1 suabe de cada amostra foram inoculados em 20 mL de BHI, os quais permaneceram incubados a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas. Para o enriquecimento seletivo, 2,0 mL do caldo não seletivo foram inoculados em 20 mL de Caldo Tetrionato e em 20 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis, nos quais ficaram incubados a temperatura de 42 a 43 °C por 18 a 24 horas.

2.2.2 *Isolamento de Salmonella spp.*

Para o isolamento, foram aplicados os ágaros MacConkey e Verde Brilhante em placas, os quais foram estriados pela técnica de esgotamento, a partir de alçadas dos caldos seletivos, seguindo-se de incubação a temperatura de 35 a 37 °C durante 18 a 24 horas. Depois da incubação, verificar o aspecto das colônias desenvolvidas nas placas. As colônias desenvolvidas no Ágar MacConkey apresentarão coloração incolor, já as desenvolvidas no Ágar Verde Brilhante terão coloração rosada, coloração considerada sugestivas de *Salmonella* spp.

2.2.3 *Identificação bioquímica*

A partir do isolamento de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. em Ágar MacConkey e Ágar Verde Brilhante, será realizada a identificação bioquímica preliminar das colônias, onde 2 a 3 colônias seriam transferidas de cada ágar para o Ágar TSI (Ágar Tríplice Açúcar Ferro), LIA (Ágar Lisina Ferro), SIM (Ágar Citrato de Simmons) e Caldo Ureia para a identificação bioquímica, e ficariam incubado a 37°C por 24 horas. A identificação bioquímica preliminar seguirá os padrões de análises propostos no quadro 1.

Comportamento Bioquímico		<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> spp. Sub-espécie I	<i>Salmonella</i> spp. Sub-espécies III a e III b
TSI 24 horas	Base	A gás +/-	A gás -	A gás +	A gás +
	Bisel	V	V	V	V ou A
	H ₂ S	+ / -	+	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P	P
	H ₂ S	+ / -	+	+	+
Agar Ureia (Urease)		-	-	-	-
Agar SIM (Motilidade)		-	-	+	+

Fonte: BRASIL, 2002.

Salmonella spp. sub espécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella spp. sub espécie III a e III b- Antigo grupo Arizona

A – amarelo (ácido)

V – vermelho (alcalino)

P – púrpura (alcalino)

Quadro 1- Identificação bioquímica preliminar de *Salmonella* spp.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta de realização do inquérito epidemiológico (IE) no presente estudo é pertinente pois, segundo Back (2010), as informações levantadas são importantes para se conhecer a epidemiologia da *Salmonella* em uma dada região e podem ser usadas para subsidiar exames de diagnóstico laboratorial das salmoneloses.

Através do ensaio bacteriológico, constatou-se que nenhuma das 50 amostras fecais frescas analisadas originou colônias com características sugestivas de *Salmonella* spp., na etapa de isolamento em ágares sólidos acondicionados em placas. As colônias crescidas no Ágar Verde Brilhante apresentaram coloração transparente e as desenvolvidas no Ágar MacConkey apresentaram coloração vermelho-escuro, como se observa na figura 1. Em relação aos suabes cloacais, observou-se que em todas as amostras analisadas não foi possível isolar colônias com características de *Salmonella* spp. As colônias crescidas apresentaram as mesmas colorações observadas nas análises com fezes, como observado na figura 2.

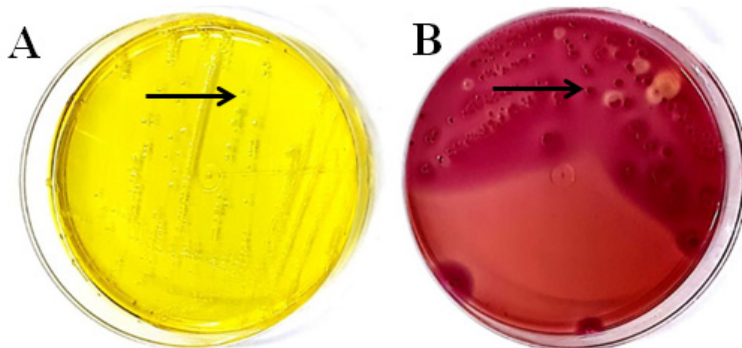


Figura 1- Crescimento de colônias isoladas não características de *Salmonella* spp., a partir de amostras fecais frescas. **A)** Ágar Verde Brilhante com colônias (seta) transparentes; **B)** Ágar MacConkey com colônias (seta) de coloração vermelho-escura.

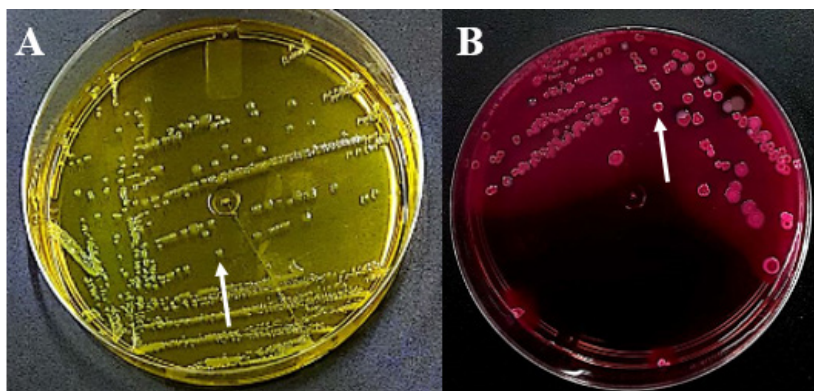


Figura 2- Crescimento de colônias isoladas não características de *Salmonella* spp., a partir de amostras de suaves cloacais. **A)** Ágar Verde Brilhante com colônias (seta) transparentes; **B)** Ágar MacConkey com colônias (seta) de coloração vermelho-escura.

Segundo a Portaria nº 126 do MAPA, as colônias de *Salmonella* spp. crescidas no Ágar Verde Brilhante devem se apresentar com coloração rosada, enquanto as colônias crescidas no Ágar MacConkey devem se apresentar com coloração incolor, o que se diferem de acordo com os resultados achados no presente estudo.

Os resultados bacteriológicos sugerem que a granja estudada, apesar de alguns problemas de manejo técnico evidenciados no inquérito epidemiológico, se preocupa e realiza adequadamente o controle sanitário através da biossegurança adotada, devido à ausência de *Salmonella* spp. tanto nas amostras de fezes frescas quanto nas de suaves cloacais. Amaral et al. (2014) relatam que o isolamento sanitário por meio de barreiras físicas naturais, como as barreiras verdes, reduz a contaminação e possíveis transmissões de *Salmonella* spp. pelo ar. E ainda, preconizam que as granjas comerciais avícolas devem ser construídas distantes umas das outras e afastadas de estradas por onde transitam

caminhões que transportam aves destinadas para o abate, monitorando assim o controle de patógenos.

Ravagnani et al. (2012) pesquisaram *Salmonella* spp. em 100 amostras de suabes cloacais de frango de corte e em 2 amostras de suabes de arrasto provenientes de dois aviários. As amostras analisadas apresentaram resultados negativos durante o isolamento de *Salmonella* spp., constatando as boas condições sanitárias da integração, o que corrobora os achados bacteriológicos do estudo presente. Da mesma forma, Gambiragi et al. (2003) investigaram a presença de *Salmonella* spp. em pintos de corte de um dia em 100 amostras de suabes cloacais para tentativa de isolamento, porém obtiveram 100% de negatividade em suas amostras analisadas, podendo assim concluir que os planteis avícolas têm um alto padrão de qualidade sanitária e se encontram em boas condições para o alojamento de aves.

Luz (2012) pesquisou a ocorrência de *Salmonella* spp. em 121 amostras de suabes cloacais em aves silvestres cativas em um criadouro no Rio Grande do Sul, utilizando a técnica enriquecimento, semeadura em placas, identificação bioquímica e a prova de soroaglutinação rápida. De todas as amostras analisadas, apenas uma apresentou características sugestivas de *Salmonella* spp. na etapa de isolamento.

Moreira et al. (2008) verificaram a ocorrência de *Salmonella* spp. utilizando o método de enriquecimento, isolamento e identificação bioquímica em 363 amostras de carcaça de frango em municípios do estado de Goiás. Mesmo com as práticas de higiene adotadas no campo e durante o processo de abate, obteve-se o isolamento de *Salmonella* spp. em 52 amostras de carcaças.

Lemos et al. (1999) pesquisaram em 78 amostras de suabes cloacais, a presença de *Salmonella* spp. em aves selvagens no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro por meio da técnica de isolamento e identificação bioquímica, porém foram encontrados total negatividade em todas as amostras.

Pereira et al. (1999) relatam que a utilização de fezes frescas não causa estresse nas aves, são mais confiáveis e representativas que a utilização de suabes cloacais, porém a utilização de suabes em coletas é mais fácil, prático, onde não há sacrifício das aves.

De acordo com os resultados do IE, o lote de aves alojado era misto, ou seja, composto por aves fêmeas e machos, com 15 dias de idade. A curva de ganho de peso e o índice de mortalidade do lote estavam e sempre estiveram dentro do padrão da linhagem genética recomendado. O lote não apresentava sintomas e sinais de doenças, como diarreia, apatia ou eriçamento de penas, e não havia histórico de doenças progressas. Em geral, aves da espécie *Gallus gallus*, quando estão infectadas por *Salmonella* spp., apresentam diarreia com coloração diferenciada, mortalidade elevada, penas arrepiadas, perda de apetite e asas caídas, com dificuldade de respiração (OLIVEIRA, 2004). Não obstante, de acordo com Paiva (2010), aves infectadas por *Salmonella* spp. podem se apresentar assintomáticas e ser portadoras da bactéria por toda a vida, disseminando-a no

ambiente, o que pode estar relacionado com os dados obtidos nesse estudo.

Em relação à biossegurança, a unidade de produção se localiza cerca de 15 km de distância da rodovia onde há caminhões transitando com aves comerciais destinadas ao abate. A granja possui barreiras verdes naturais e barreiras sanitárias para um bom isolamento físico, não havendo outras granjas nos arredores. Amaral et al. (2014) relatam que o isolamento sanitário por meio de barreiras naturais reduz a contaminação e a possível transmissão de *Salmonella* spp. pelo ar.

A água destinada à dessantação das aves é tratada com cloro na dosagem de 5 ppm, o que pode estar associado à ausência desse patógeno, visto que a adição de cloro na água de bebida elimina microrganismos patogênicos, desde que seja feito a higienização do sistema de fornecimento de água para uma melhor eficácia (AMARAL et al., 2014). Foi verificado que a ração fornecida ao lote recebe tratamento térmico e é produzida por uma cooperativa, mas não recebe tratamento químico para controle de *Salmonella*. De acordo com Oliveira (2011), as rações são consideradas umas das principais fontes de contaminação de *Salmonella* spp. em lotes avícolas, pois há rações que possuem farinha de carne em sua constituição, além de serem produzidas em meio a procedimentos sanitários inadequados.

Ainda, de acordo com inquérito epidemiológico, o lote amostrado não havia recebido e nem estava recebendo medicação nos últimos dias 15 dias. Igualmente, não recebeu vacinação contra *Salmonella* Enteritidis. No entanto, de acordo com a instrução normativa nº 78 de 3 de novembro de 2003, o estabelecimento avícola deveria vacinar contra *Salmonella* Enteritidis, usando apenas vacinas inativadas e deveria estar sob tratamento contínuo medicamentoso para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, sob acompanhamento e controle do MAPA (BRASIL, 2003).

4 | CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados bacteriológicos, não foi possível cultivar, isolar e identificar *Salmonella* spp. a partir de fezes frescas e suabes cloacais de um lote de frangos comerciais confinados na região de Monte Carmelo-MG. A ausência do isolamento dessa bactéria no nas amostras clínicas pode estar associada ao alto controle sanitário a que o plantel foi submetido, como foi evidenciado no inquérito epidemiológico. Ademais, o inquérito epidemiológico se mostrou como uma valiosa ferramenta de triagem de doenças infectocontagiosas, como a salmonelose, sendo capaz de investigar fatos epidemiológicos envolvendo o ambiente, agente etiológico e hospedeiro; e ainda, de subsidiar testes microbiológicos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, P. F. G. P; MARTINS, L. A; OTUTUMI, L. K. Biossegurança na criação de frangos de corte. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 664-685, 2014.

BACK, A. **Manual de doença das aves**. 2. Ed. Cascavel: Editora Integração, 2010. 311p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livres ou controladas para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium **Diário Oficial da União**, n. 1, 05 de novembro de 2003, Seção 1, p. 3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Portaria nº 126 de 03 de novembro de 1995**. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, e *S. Typhimurium*). Brasília: MAA/SDA/DDA/CVPS/PNSA, 2002. 63-78p.

FERREIRA, L. L; MENDES, F. R; SANTOS, B. M; ANDRADE, M. A; CAFÉ, M. B. Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 10, n. 5, p. 2716-2751, 2013.

FILHO, V. J. R. G; TEIXEIRA, R. S. C; LOPES, E. S; ALBUQUERQUE, A. H; LIMA, S. V. G; HORN, R. V; SILVA, R. C. R; CARDOSO, W. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em galinhas criadas em fundo de quintal (*Gallus domesticus*) e ovos comercializados nas feiras livres na cidade de Fortaleza, Ceará. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1855-1864, 2014.

FRANCHIN, P. R. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em carne e produtos cárneos**. Tese para obtenção de título de Doutor em Ciências dos Alimentos. Santa Catarina, 2008, 104p.

GAMA, N. M. S. Q. ***Salmonella* spp. em aves de postura comercial**. Dissertação para obtenção de título de Mestre em Patologia Animal. Jaboticabal, 2001, 68p.

GAMBIRAGI, A. P. O. M; SALLES, R. P. R; FILHO, J. L. A; OLIVEIRA, W. F; MACIEL, W. C; ROMÃO, J. M; TEIXEIRA, R. S. C. *Salmonella* spp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza – CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

LE MOS, M; SILVA, G. M. D; FEDULLO, L.P.L; PEREIRA, V. L. A. *Salmonella* em aves selvagens no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 40-43, 1999.

LUZ, P. G. **Deteção de *Salmonella* spp. em aves silvestres cativas e avaliação do impacto sobre a avicultura**. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinária Preventiva. Pelotas, 2012, 1p – 44p.

MATTIELLO, S. P. **Caracterização da resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* entérica proveniente de materiais de origem avícola**. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre, 2013, 74p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Programa de Sanidade Avícola completa 20 anos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/10/programa-de-sanidade-avicola-completa-20-anos>>. Acesso em: 20 de março de 2016.

MOREIRA, G. N.; REZENDE, C. S. M.; CARVALHO, R. N.; MESQUITA, S. Q. P.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M. L. T. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.

OLIVEIRA, W. F. **Isolamento e tipificação de *Salmonella* da cadeia produtiva de frango de corte da região metropolitana de Fortaleza-CE**. Dissertação ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Fortaleza, 2004, 101p.

PAIVA, J. B. **Infecção de aves por mutantes de *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis com deleção nos genes *cobS* e *cbiA***. Dissertação para obtenção de título de mestre em Microbiologia Agropecuária. Jaboticabal, 2010, 106p.

PEREIRA, C. G.; SANTOS, B. M.; GÓMEZ, S. Y. M.; ABREU, T. G. M. **Prevenção e controle de doenças infecciosas nas aves de produção**. Viçosa: Editora UFV, 2013.

PEREIRA, V. L. A.; SILVA, G. M.; LEMOS, M. Presença de *Salmonella* em frangos de corte aparentemente sadios em unidades de criação industrial na região de São José do Vale do Rio Preto-RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 156-161, 1999.

RAVAGNANI, L. K.; AGOSTINIS, R. O.; OTUTUMI, L. K.; LIMA, E. T.; FERNANDES, J. I. M.; MARTINS, L. A. Pesquisa de *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões climatizados de uma integração na região Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2327-2336, 2012.

SANTOS, J. R.; MEZA, S. K. L.; MARTINI, K. C.; NUNES, R. V. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis-SAP**, v. 12, n. 3, p. 167-174, 2013.

SCHUBERT, M. A. R. **Isolamento de *Salmonella* spp. de amostras fecais de aves silvestres mantidas em cativeiro**. Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária. São Paulo, 2008, 27p.

STOPPA, G. F. Z. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em abatedouros avícolas**. Dissertação para obtenção de título de Mestre em Microbiologia Agropecuária. Jaboticabal, 2011, 92p.

VAZ, A. N.; ARMANDO, A. P.; RIBEIRO, A. R.; ZANCAN, F. T.; BRISOLA, M. L. Pesquisa de *Salmonella* em mutuns (*Mitu mitu*) mantidos em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n.1, p.68-72, 2015. 5, p. 1675-1683, 2008.

CAPÍTULO 6

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO *CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING* NA CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 04/01/2021

Nicole Dalonso

Sociedade Educacional de Santa Catarina –
Unisociesc
Joinville – SC
<http://lattes.cnpq.br/2341587952304052>

RESUMO: A modificação genética de microrganismos tem despertado interesse dos pesquisadores por permitir a viabilidade de certos processos biotecnológicos. Visando aumentar o rendimento de produtos de interesse farmacêutico, medicinal, cosmético, ambiental, biotecnológico, entre outros, diversos métodos de fusão de fragmentos de DNA já foram estudados, porém ainda existem certas dificuldades processuais quanto ao tamanho do plasmídeo a ser montado. Neste trabalho serão apresentadas algumas das principais técnicas de fusão de fragmentos de DNA, sendo detalhado o método *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) e sua verificação quanto a correta montagem dos fragmentos, empregando para isso a digestão por enzimas de restrição. No presente estudo foi desenvolvido um protocolo passo a passo do método CPEC na montagem de dois plasmídeos para modificação genética de microrganismos, de modo a permitir avanços biotecnológicos com maior efetividade. Foi possível identificar que o tamanho do plasmídeo não afetou o percentual de colônias corretas, e sim que outras características, como o CG%, a quantidade de pares de base (pb)

sobrepostas com o vetor base, bem como entre os fragmentos, no qual afetam o sucesso da construção por CPEC.

PALAVRAS - CHAVE: Fusão de fragmentos de DNA, plasmídeos, protocolo, CPEC.

ADAPTATION OF THE CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION CLONING METHOD IN PLASMIDS CONSTRUCTION FOR GENETIC MODIFICATION OF MICROORGANISMS

ABSTRACT: The genetic modification of microorganisms has encouraged researchers for allowing the viability of certain biotechnological processes. In order to increase the yield of pharmaceutical, medicinal, cosmetic, environmental and biotechnological products, among others, several methods of assembling DNA fragments have already been studied, however there are still certain difficulties regarding process and plasmid size to be connected. In this work, some of the main techniques to assemble DNA fragments will be presented, highlighting the *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) method and its verification as to the correct assembly of the fragments, using digestion by restriction enzymes. In the present study, a step-by-step protocol of the CPEC method was developed to assemble two plasmids for the genetic modification of microorganisms, in order to allow biotechnological advances with greater effectiveness. It was possible to identify that plasmid size did not affect the percentage of correct colonies, but that other characteristics, such as CG%, the number of base pairs (bp)

overlapped with the base vector, as well as between fragments, in which affect the success of construction by CPEC.

KEYWORDS: Assembling DNA fragments, plasmids, protocol, CPEC.

1 | INTRODUÇÃO

A viabilidade dos processos biotecnológicos depende frequentemente da modificação genética do organismo que expressa o produto de interesse (STEPHANOPOULOS, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de métodos que facilitem a montagem de cassetes e vetores para o melhoramento genético de microrganismos têm se tornado cada vez mais necessário. Com auxílio da Biologia Sintética algumas vias metabólicas podem ser alteradas e montadas para produzir células mais robustas capazes de produzir maiores quantidades de produtos desejados (COBB et al., 2013; LI; BORODINA, 2015).

Para realizar a montagem de cassetes de interesse, inicialmente é necessário o fusão de fragmentos de DNA de diferentes organismos ou genes. Diversos métodos de montagem de fragmentos de DNA *in vitro* e *in vivo* já foram descritos (XIONG et al., 2008; SHAO et al., 2009; WANG et al., 2012; PATRON, 2014). Os fragmentos de interesse podem ser amplificados pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e diretamente introduzidos em plasmídeos por recombinação homóloga *in vitro*, porém este procedimento necessita de transformação bacteriana, purificação e também confirmação do plasmídeo (SZEWCZYK et al., 2007). Os métodos de sequências de clonagem dependentes utilizam enzimas de restrição e ligação ou recombinação sítio específica, o que limita sua aplicação dentro da biologia sintética, uma vez que são restritos aos sítios específicos dos vetores e insertos (QUAN; TIAN, 2011).

Algumas aplicações mais complexas envolvendo múltiplos fragmentos necessitam de métodos de sequências de clonagem independentes, dentre as quais destacam-se o método isotérmico enzimático de Gibson (GIBSON et al., 2008), a Reação em Cadeia da Ligase (LCR) (KOK et al., 2014), a Ligação Independente de Clonagem (LIC) (ASLANIDIS; JONG, 1990), a Sequência e Ligação Independente de Clonagem (SLIC) (LI; ELLEDGE, 2012) T4 DNA polymerase, to generate single-stranded DNA overhangs in insert and vector sequences. These fragments are then assembled in vitro and transformed into *Escherichia coli* to generate recombinant DNA of interest. SLIC inserts can also be generated by incomplete PCR (iPCR, a Fusão baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-fusion-based) (SHEVCHUK et al., 2004), *Hot-Fusion* (FU et al., 2014) e *Circular polymerase extension cloning* (CPEC) (QUAN; TIAN, 2009).

Muitos fatores estão envolvidos na escolha do melhor método para a construção de fragmentos, desde os custos de reagentes, laboratório, o grau de complexidade e as sequências do DNA envolvidas (KOK et al., 2014). Por este motivo, o pesquisador deve fazer a escolha do método conforme suas possibilidades e viabilidade para cada caso.

O método isotérmico enzimático de Gibson permite a união de fragmentos com sequências terminais em sobreposição (15-80 pb) por meio da combinação de três enzimas: Exonuclease, DNA polimerase e DNA ligase. Basicamente, uma exonuclease remove os nucleotídeos de uma das extremidades da dupla fita, expondo as regiões de complementaridade entre as fitas. Posteriormente, as porções complementares são aneladas e preenchidas pela DNA polimerase. A DNA ligase sela os cortes permitindo o reparo dos intervalos entre as fitas (GIBSON, 2011).

O LCR utiliza oligonucleotídeos complementares aos terminais das regiões vizinhas do DNA que funcionam como molde para unir fragmentos de dupla fita previamente fosforilados nas porções 5'. Após desnaturação e anelamento dos ssDNA (*bridging oligos*), uma ligase termoestável une os fragmentos através de uma ligação fosfodiéster. Após ciclos de desnaturação, anelamento e ligação são obtidos fragmentos complexos de DNA. Em condições otimizadas os autores puderam fusionar até vinte fragmentos de até 20 kb (KOK et al., 2014).

O método conhecido como LIC utiliza uma propriedade específica da T4 DNA polimerase que atua como exonuclease na ausência de dNTPs. Utilizando a PCR são adicionadas ao inserto sequências curtas de 12 nucleotídeos em sobreposição com o respectivo plasmídeo, de tal forma que um dos dNTPs esteja ausente. O inserto e o plasmídeo linearizado são então tratados com a polimerase T4 na presença do dNTP inicialmente ausente. A T4 DNA polimerase possui atividade de exonuclease 3' para 5', degradando o DNA do terminal 3' até encontrar o primeiro resíduo correspondente ao dNTP adicionado, gerando assim pequenas regiões complementares em fita simples, que posteriormente serão aneladas gerando duplas fitas. O tamanho dos fragmentos empregados podem variar de 150-3.000 pb e o plasmídeo utilizado pelos autores foi o pUC119 que contém o gene de resistência à ampicilina (ASLANIDIS; JONG, 1990). O método SLIC não tem restrições de sequência em sua região de homologia, possui o mesmo princípio já descrito para o LIC e pode fusionar até dez fragmentos (LI; ELLEDGE, 2012).

Basicamente, no PCR de fusão, três ou quatro fragmentos previamente obtidos e purificados podem ser unificados inicialmente numa reação de PCR padrão, porém sem adição inicial de *primers*. Na fusão tripla todos os fragmentos em quantidades equimolares são colocados na mesma reação por 13 ciclos, sem *primers*, sendo posteriormente purificados e adicionados a uma nova reação com *primers* externos e cerca de 30 ciclos para obtenção da montagem completa. Já na fusão quádrupla os fragmentos em quantidades equimolares são separados em dois grupos de dois fragmentos cada, e após 12 ciclos de fusão os quatro fragmentos são unidos numa nova reação de 20 ciclos, ainda sem *primers*. Ao final da purificação desta etapa, uma nova reação é realizada com adição dos *primers* externos e cerca de 30 ciclos para obtenção da montagem completa (SHEVCHUK et al., 2004).

Um método de fusão duplo para montagem de cassetes com a proteína

verde fluorescente (*green fluorescent protein* - GFP) foi desenvolvido por PCR-*fusion-based*. Os autores verificaram que, por razões ainda desconhecidas, a purificação dos fragmentos de DNA diretamente do gel de agarose promoveu inibição da reação de fusão. Portanto, os dois fragmentos com 24 nucleotídeos em sobreposição, compostos por promotor/gene de interesse e GFP/3'UTR, foram fusionados diretamente dos seus produtos de PCR, numa concentração aproximada de 1 ng/50 μ L de reação de cada fragmento (HOBERT, 2002). Segundo Shevchuk et al. (2004), alguns itens são imprescindíveis para o sucesso do PCR-*fusion-based*: 1) uso de uma enzima com atividade corretora (*proofreading*) 3'→5'; 2) a purificação dos intermediários da PCR deve limitar-se a ligar e lavar (*bind-and-wash*), pois a gel-purificação acaba impossibilitando o uso dos longos fragmentos para fusões posteriores; 3) os fragmentos devem possuir regiões de sobreposição com cerca de 25 pb ou mais; 4) os *primers* devem apresentar temperaturas de *melting* elevadas (68-70°C), o que aumenta a especificidade evitando erros e estruturas secundárias durante o anelamento.

No método denominado *Hot-Fusion* múltiplos fragmentos com regiões entre 17-30 pb em sobreposição podem ser fusionados em um único passo. A incubação dos fragmentos com o vetor é realizada a 50°C com uma exonuclease (T5) e uma polimerase de alta fidelidade (Phusion). A T5 remove nucleotídeos do terminal 5' para 3' deixando porções de fita simples complementares entre os fragmentos e a Phusion preenche as lacunas unindo as porções em dupla fita. Foi observado até 95% de eficiência de clonagem, mesmo quando o fusão foi realizado com produtos de PCR não purificado, mas que apresentavam boa concentração (30-100 ng/ μ L) (FU et al., 2014).

O fusão de fragmentos previamente amplificados e purificados via CPEC evita a adição de sítios de restrição e não requer ligases e exonucleases específicas. O método utiliza o mecanismo de extensão com a DNA polimerase, unindo fragmentos sobrepostos para formar os plasmídeos circulares de cadeia dupla. Geralmente se aplica uma relação molar de fragmentos/plasmídeo de 1:1 ou 2:1, numa concentração total de DNA de 10-20 ng/ μ L. Uma DNA polimerase de alta fidelidade é primordial para este método, além da purificação prévia dos fragmentos. Dependendo do tamanho e da quantidade dos fragmentos podem ser usados de 5-20 ciclos de desnaturação a 98°C, anelamento a 55°C, extensão a 72°C por 15 segundos/kb e uma extensão final de no mínimo 5 min. Os *primers* das regiões de sobreposição dos fragmentos devem ter temperaturas de *melting* muito próximas e elevadas (60-70°C) para que o anelamento seja correto. Basicamente, este método é muito semelhante à preparação da mistura reacional da PCR, exceto que não há adição de *primers*, ou seja, não se trata de uma amplificação. Outra vantagem é que o produto fusionado pode ser transformado diretamente no organismo de interesse sem purificação (QUAN; TIAN, 2011).

Vários cassetes de expressão podem ser montados para melhorar a via metabólica dos microrganismos. Com o avanço das técnicas de fusão de DNA é possível montar

seqüências lineares para deleção de genes, troca de promotores e adição de proteínas tag, que podem ser aplicadas posteriormente à transformação de microrganismos (SZEWCZYK et al., 2007).

Num estudo prévio sobre diferentes métodos de montagem de fragmentos de DNA, Dalonso et al. (2017), empregando fragmentos previamente purificados, foi a melhor opção na montagem de longos cassetes de expressão, com tamanho superior a 7000 pares de bases. No presente trabalho, maiores detalhes sobre o protocolo de obtenção de plasmídeos serão explorados, de modo a apresentar um passo a passo para obtenção e validação no fusão de fragmentos de DNA.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Dois plasmídeos com funções distintas, pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO foram construídos de modo a validar o método CPEC anteriormente selecionado (DALONSO et al., 2017) allowing some biotechnological processes to become economically viable by genetic improvement of microorganisms. We compared three methods of assembling six DNA fragments: PCR fusion-based, isothermal NEBuilder and circular polymerase extension cloning (CPEC). O vetor linearizado pUC20 foi usado como base para a construção dos plasmídeos. Este plasmídeo contém o gene de resistência a ampicilina como marcador, sendo replicado em bactéria *Escherichia coli* DH5 α . Após cultura *overnight* das colônias contendo o vetor de expressão com gene de resistência a higromicina, pUCHYG, foi extraído empregando *NucleoSpin Plasmid* e digerido com BamHI para promover sua linearização. Os *primers* para amplificação dos fragmentos de interesse da glucano sintase (GLSA e GLSB) e do promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) de *Pleurotus ostreatus* PC9 (Utrecht University) foram desenhados pela ferramenta NEBuilder, disponível no site da NEB (<http://NEBuilder.neb.com/#>), de modo que tivessem 15 pares de base complementares entre si, e 30 pares de bases complementares com o vetor pUCHYG.

Para obtenção do plasmídeo pUCHYG-HYDRO, inicialmente foram amplificados os fragmentos 5' e 3' UTR (região não traduzida) do gene da hidrofobina de *P. ostreatus* com *overlapping primers* para o plasmídeo pUC20 linearizado com enzimas de restrição Smal e EcoRV. O gene de resistência a higromicina foi extraído do plasmídeo pHYM1.2 (SCHOLTMEIJER et al., 2001) por amplificação em PCR, empregando *overlapping primers*. O fragmento referente ao gene da higromicina foi colocado entre as regiões 5' e 3' UTR do gene da hidrofobina. Os *primers* foram desenhados pela ferramenta NEBuilder, disponível no site da NEB (<http://nebuilder.neb.com/#>), de modo que tivessem 13 pares de base complementares entre si, e 25 pares de bases complementares com o vetor pUC20.

Os vetores pUCHYG e pUC20, empregados como base na construção de seus respectivos plasmídeos, foram digeridos *overnight* com as enzimas de restrição

já mencionadas e todos os fragmentos e vetores foram purificados de bandas de agarose (*NucleoSpin-Gel* e *PCR Clean-up* - MN) e quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific).

Os vetores linearizados (0,016 pmol) foram então misturados na relação 1:3 aos demais fragmentos a serem fusionados de maneira equimolar (0,05 pmol de cada). Posteriormente, uma alíquota de 6 μL desta mistura foi então submetida a *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) durante 2,5 ciclos/kb, num volume de reação de 25 μL . A reação consistiu numa desnaturação inicial a 98°C por 30 s e 2,5 ciclos/kb a 98°C por 10 s, 55°C por 30 s, 72°C por 160 s, seguida de 10 min de extensão final a 72°C. Os componentes da reação foram os mesmos para uma reação padrão com a DNA polimerase Phusion, exceto que não são adicionados *primers*.

Células quimicamente competentes (25 μL) (Stellar, TaKaRa) foram então transformadas por choque térmico com 2,5 μL do produto de reação CPEC. As colônias transformantes após seleção em LB contendo ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram submetidas à extração de DNA plasmidial (*NucleoSpin Plasmid*) e digeridas com enzima de restrição Sall. As colônias corretas que continham a sequência do plasmídeo construído foram confirmadas de acordo com o perfil de digestão esperado, conforme predição da ferramenta online J5 (<https://j5.jbei.org/VectorEditor/VectorEditor.html>).

A Figura 1 apresenta um esquema das etapas necessárias para construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO.

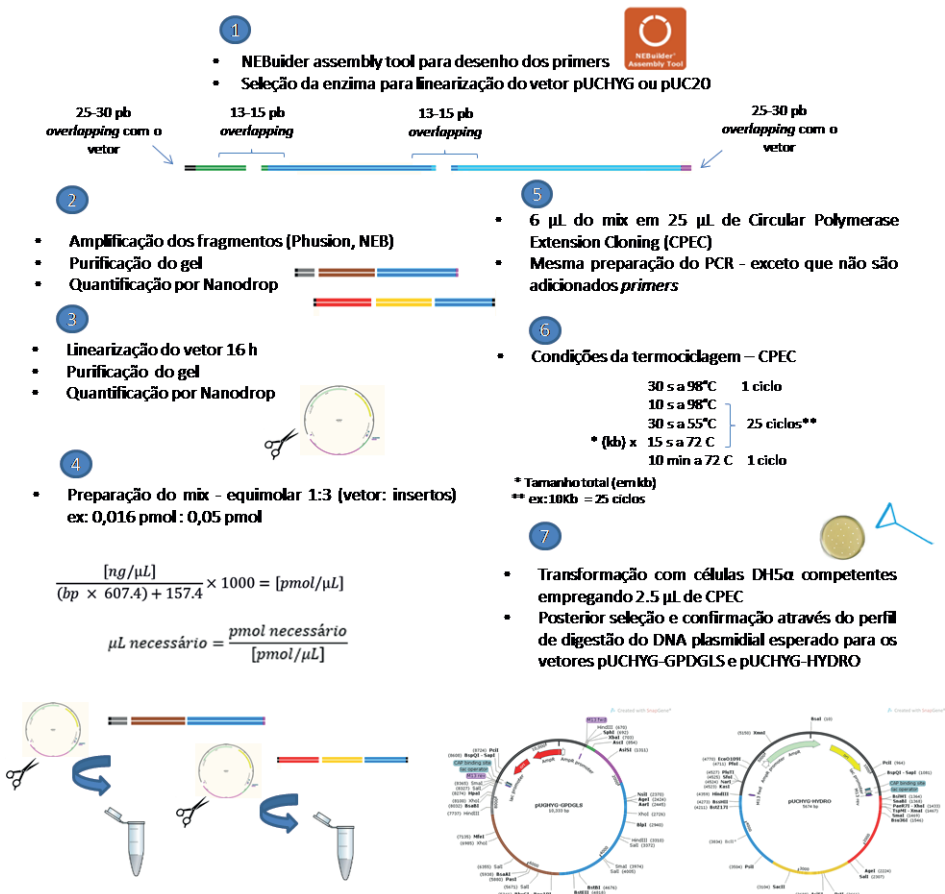


Figura 1: Esquema das etapas necessárias para construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO.

Fonte: Próprio autor.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do método para fusão de DNA irá depender do número de fragmentos que se deseja fundir. Por exemplo, para fusão de dois sugere-se o PCR-*fusion-based* e NEBuilder pela facilidade e rapidez que ambos apresentam, além de que os fragmentos podem ser fundidos diretamente dos produtos de PCR. A partir de três fragmentos a purificação torna-se o ponto chave da qualidade dos fundidos, pois os intermediários da reação ficam mais evidentes em caso de primers remanescentes. Para múltiplos fragmentos indica-se a adaptação do método CPEC que permite o fusão após purificação individual das bandas de DNA. Para esta adaptação do CPEC são de suma importância a qualidade e a pureza dos fragmentos, sendo a purificação em gel

de agarose mais indicada para assegurar a montagem correta. Uma polimerase de alta fidelidade define também o sucesso deste método.

Dois diferentes plasmídeos foram construídos de modo a validar a técnica CPEC para esta finalidade. A construção do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS visa a troca do promotor natural da glucano sintase pelo promotor constitutivo GPD de *Pleurotus ostreatus* PC9, já a construção do plasmídeo pUCHYG-HYDRO tem por objetivo a deleção do gene da hidrofobina, de *Pleurotus ostreatus* Δ Ku80.

As Figuras 2 e 3 a seguir mostram os perfis de digestão com diferentes enzimas de restrição, tanto práticos quanto teóricos, utilizados para confirmação das colônias corretas dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS (Figura 2) e pUCHYG-HYDRO (Figura 3).

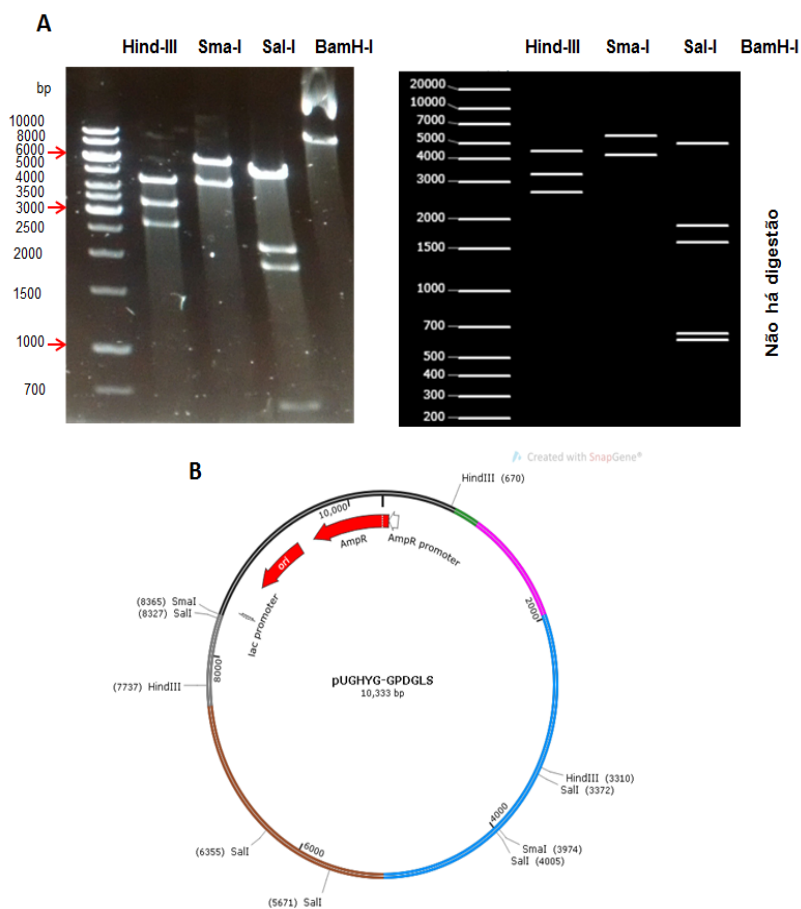


Figura 2: Perfis de digestão com enzimas de restrição HindIII, SmaI, SalI e BamHI, tanto práticos (esquerda) quanto teóricos (direita), utilizados para confirmação do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS; B - Mapa de restrição do plasmídeo pUCHYG-GPDGLS.

Fonte: Próprio autor.

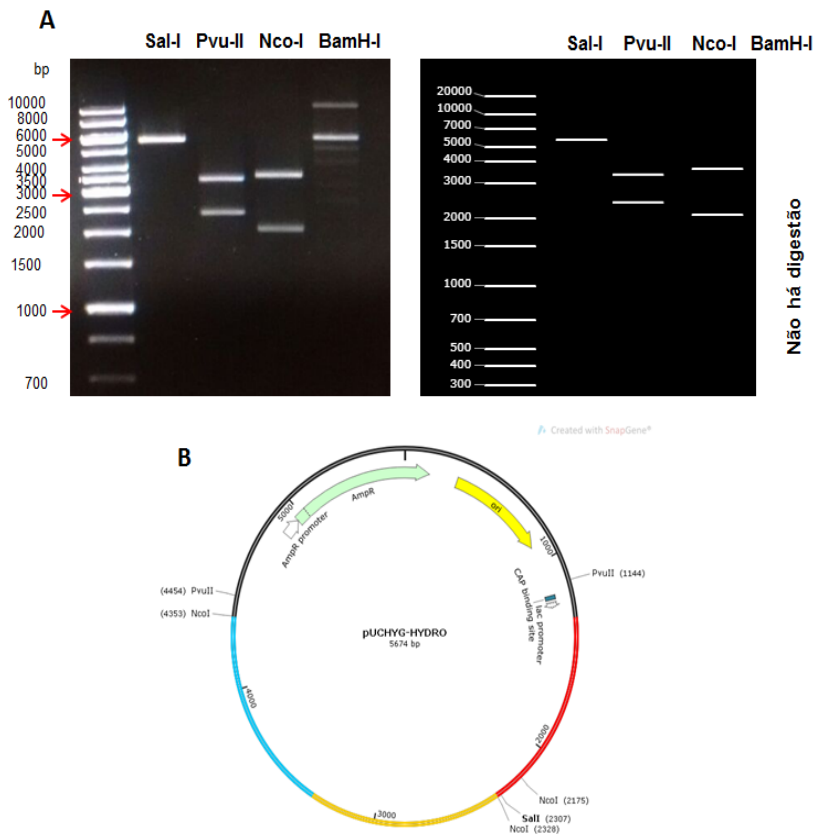


Figura 3: Perfis de digestão com enzimas de restrição SalI, PvuII, NcoI e BamHI, tanto práticos (esquerda) quanto teóricos (direita), utilizados para confirmação do plasmídeo pUCHYG-HYDRO; B - Mapa de restrição do plasmídeo pUCHYG-HYDRO.

Fonte: Próprio autor.

Os perfis de digestão com as respectivas enzimas de restrição confirmam a montagem correta dos fragmentos para obtenção dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS (Figura 2) e pUCHYG-HYDRO (Figura 3). Portanto, a técnica CPEC pode ser facilmente empregada no fusionamento de fragmentos de DNA e construção de plasmídeos, para os mais diferentes propósitos, seja para super-expressão, modificação ou deleção de genes.

Das dezesseis colônias analisadas por Quan e Tian (2009), de maneira randômica através de PCR de colônia, 100% apresentaram o inserto correto em testes realizados com plasmídeo de 6,4 kb que continham três fragmentos fusionados por CPEC. Outros autores quando analisaram o perfil de digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos isolados das respectivas colônias, não alcançaram mais de 50% das colônias corretas quando quatro fragmentos foram fusionados por CPEC (KOK et al., 2014).

Verifica-se, na tabela 1, que o número de colônias corretas diminuiu quando CG% entre fragmentos aumentaram. Ambas as sobreposições, com vetor e entre fragmentos contribuíram para aumentar o número correto de colônias no CPEC. O comprimento total do plasmídeo parece não ter sido um ponto crítico. O passo de amplificação e o corte da banda de DNA no gel podem ser considerados pontos críticos para gerar colônias incorretas.

Tabela 1 a seguir apresenta o percentual de colônias corretas, dentre as 20 colônias analisadas randomicamente, na obtenção dos plasmídeos pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO, com 4 fragmentos fusionados cada.

Plasmídeo	Comprimento do plasmídeo (kb)	% de CG entre os fragmentos	Sobreposição com o vetor (pb)	Sobreposição entre os fragmentos (pb)	% de colônias corretas (n=20)
pUCHYG-GPDGLS	10,3	49,6	30	15	85 (17/20)
pUCHYG-HYDRO	5,6	53	25	13	30 (6/20)

Tabela 1: Comprimento dos plasmídeos, % CG, sobreposição com vetor/fragmentos e a interferência quanto ao número de colônias corretas.

4 | CONCLUSÕES

A escolha do método de fusionamento de fragmentos de DNA em *overlapping* depende do número de fragmentos que se deseja fusionar. A partir de três fragmentos a purificação torna-se o ponto chave da qualidade dos fusionados, pois os intermediários da reação ficam mais evidentes em caso de *primers* remanescentes, sendo mais apropriado o método CPEC, que permite o fusionamento após purificação individual das bandas de DNA. A técnica CPEC permitiu a construção de dois plasmídeos pUCHYG-GPDGLS e pUCHYG-HYDRO, havendo diferença entre o número de colônias corretas, conforme a complexidade em relação ao CG%, número de pares de bases sobrepostas entre os fragmentos, bem como entre os fragmentos e vetores. A correta montagem dos plasmídeos foi confirmada pelos perfis de digestão obtidos conforme simulação, empregando diferentes enzimas de restrição. A técnica CPEC permite a construção de plasmídeos, para os mais diferentes propósitos, seja para super-expressão, modificação ou deleção de genes.

REFERÊNCIAS

ASLANIDIS, Charalampos; JONG, Pieter J. De. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.

COBB, R. E.; NING, J. C.; ZHAO, H. DNA assembly techniques for next - generation combinatorial biosynthesis of natural products. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], p. 1–9, 2013. DOI: 10.1007/s10295-013-1358-3.

DALONSO, N.; SAVOLDI, M.; FRANÇA, P. H. C.; REIS, T. F.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. M. Sequence-independent cloning methods for long DNA fragments applied to synthetic biology. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 530, p. 5–8, 2017. DOI: 10.1016/j.ab.2017.04.018.

FU, Changlin; DONOVAN, William P.; SHIKAPWASHYA-HASSER, Olga; YE, Xudong; COLE, Robert H. Hot Fusion : An efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, p. 1–20, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115318.

GIBSON, Daniel G. et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. **Science**, [S. l.], v. 319, p. 1215–1220, 2008.

GIBSON, Daniel G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 498p. 349–361. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.

HOBERT, Oliver. PCR Fusion-Based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. **BioTechniques**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 728–730, 2002.

KOK, Stefan De et al. Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction. **ACS Synthetic Biology**, [S. l.], v. 3, p. 97–106, 2014.

LI, Mamie Z.; ELLEDGE, Stephen J. SLIC: A method for sequence- and ligation-independent cloning. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 852, p. 51–59, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-564-0_5.

LI, Mingji; BORODINA, Irina. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1111/1567-1364.12213.

PATRON, Nicola J. ScienceDirect DNA assembly for plant biology : techniques and tools. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 19, p. 14–19, 2014. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.02.004.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1–6, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0006441.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning for high- throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011. DOI: 10.1038/nprot.2010.181.

SCHOLTMEIJER, K.; WÖSTEN, H. A. B.; SPRINGER, J.; WESSELS, J. G. H. Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 481–483, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.1.481-483.2001.

SHAO, Zengyi; ZHAO, Hua; ZHAO, Huimin. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 1–10, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkn991.

SHEVCHUK, Nikolai A.; BRYKSIN, Anton V; NUSINOVICH, Yevgeniya A.; CABELLO, Felipe C.; SUTHERLAND, Margaret; LADISCH, Stephan. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 1–12, 2004. DOI: 10.1093/nar/gnh014.

STEPHANOPOULOS, Gregory. Synthetic biology and metabolic engineering. **ACS Synthetic Biology**, [S. l.], v. 1, n. 11, p. 514–525, 2012. DOI: 10.1021/sb300094q.

SZEWCZYK, Edyta; NAYAK, Tania; OAKLEY, C. Elizabeth; EDGERTON, Heather; XIONG, Yi; TAHERI-TALESH, Naimeh; OSMANI, Stephen A.; OAKLEY, Berl R. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 3111–3121, 2007.

WANG, Tianwen; MA, Xingyuan; ZHU, Hu; LI, Aitao. Available methods for assembling expression cassettes for synthetic biology. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S. l.], v. 93, n. 5, p. 1853–1863, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-3920-8.

XIONG, Ai-Sheng; PENG, Ri-He; ZHUANG, Jing; LIU, Jin-Ge; GAO, Feng; CHEN, Jian-Min; CHENG, Zong-Ming; YAO, Quan-Hong. Non-polymerase-cycling-assembly-based chemical gene synthesis: Strategies, methods, and progress. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 26, p. 121–134, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.10.001.

CAPÍTULO 7

ANÁLISE DA CITOGENOTOXICIDADE DAS INFUSÕES DE *ARTEMISIA VULGARIS* L. UTILIZANDO O BIOENSAIO *ALLIUM CEPA*

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 04/01/2021

Claudia de Faria Leal

Centro Universitário de Formiga (UNIFOR-MG)
Formiga – MG
<http://lattes.cnpq.br/0714927172411174>

Lília Rosário Ribeiro

Centro Universitário de Formiga (UNIFOR-MG)
Formiga – MG
<http://lattes.cnpq.br/2500709022132247>

Daiane Maria de Almeida

Centro Universitário de Formiga (UNIFOR-MG)
Formiga – MG
<http://lattes.cnpq.br/7591016841484318>

RESUMO: *Artemisia vulgaris* L. é uma herbácea originária da Ásia, utilizada na medicina popular por sua ação analgésica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antiespasmódica, anti-helmíntica e anticonvulsivante. Com o aumento do uso de produtos naturais para fins terapêuticos, estudos sobre a citogenotoxicidade de infusões são de extrema relevância por servirem como bioindicadores da seguridade da utilização das plantas pela população humana. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos chás de *Artemisia vulgaris* L. por meio do bioensaio *Allium cepa*. Para a realização do estudo, foram utilizadas três concentrações de infusões de *A. vulgaris* L. (0,5 g/L, 2,5 g/L e 5,0 g/L). Como controles negativo e positivo, foram utilizados água e metil metano-

sulfonato, respectivamente. A concentração de 5 g/L mostrou-se citotóxica no bioensaio *A. cepa*, com declínio significativo no índice mitótico. Verificou-se um aumento significativo no número de alterações cromossômicas e de células com núcleos condensados nos três tratamentos avaliados. Conclui-se que as infusões de *A. vulgaris* podem ocasionar efeitos citogenotóxicos importantes sobre células meristemáticas de *A. cepa*.

PALAVRAS - CHAVE: *Allium cepa*. Artemisia. Plantas medicinais.

ANALYSIS OF THE CYTOGENOTOXICITY OF *ARTEMISIA VULGARIS* L. INFUSIONS USING THE *ALLIUM CEPA* BIOASSAY

ABSTRACT: *Artemisia vulgaris* L. is an herb originating in Asia, used in folk medicine for its analgesic, antihypertensive, anti-inflammatory, antispasmodic, anthelmintic and anticonvulsant action. With the increase in the use of natural products for therapeutic purposes, studies on the cytogenotoxicity of infusions are extremely exposed because they serve as bioindicators of the safety of the use of plants by the human population. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of the cytotoxic and genotoxic of *Artemisia vulgaris* L. teas through the *Allium cepa* bioassay. To carry out the study, the three methods used for infusions of *A. vulgaris* L. (0.5 g / L, 2.5 g / L and 5.0 g / L). As negative and positive controls, water and methyl methanesulfonate were used, respectively. The concentration of 5 g / L is known to be cytotoxic in the *A. cepa* bioassay, with a significant decline in the mitotic index. There was a significant increase

in the number of chromosomal and cell changes with condensed nuclei in the three treatments adopted. It is concluded that *A. vulgaris* infusions can cause important cytogenotoxic effects on meristematic cells of *A. cepa*.

KEYWORDS: *Allium cepa*. Mugwort. Medicinal Plants.

1 | INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças remonta à história da humanidade. Desde que os seres humanos procuraram uma ferramenta em seu ambiente para se recuperar de alguma enfermidade, o uso de plantas era sua única opção de tratamento (JAMSHIDI-KIA et al, 2018; SOUZA).

Ao longo dos anos, os avanços na indústria farmacêutica não impediram que as plantas medicinais continuassem sendo amplamente utilizadas nas culturas tradicionais em todo o mundo, e tem-se observado que estão se tornando cada vez mais populares na sociedade contemporânea como alternativas naturais ou suplementos aos produtos químicos sintéticos (WINK; VAN WYK, 2017). No entanto, as plantas podem apresentar compostos tóxicos como parte de seus mecanismos naturais de defesa, desta forma, estudos relacionados à toxicidade são indispensáveis para assegurar que os recursos vegetais sejam utilizados de forma segura para fins medicinais. (RIBEIRO et al., 2013).

Dentre as espécies vegetais comumente utilizadas na medicina popular destaca-se a *Artemisia vulgaris* L., conhecida popularmente por várias sinomímias como artemísia, artemigem, artemígio, flor-de-são-joão, anador e losna-brava (LORENZI; MATOS 2003). Trata-se de uma herbácea perene, de 30-60 cm de altura, originária da Ásia, apresentando distribuição cosmopolita.

A planta é utilizada na medicina popular por suas ações analgésica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antiespasmódica, anti-helmíntica e anticonvulsivante, sendo usada também para o tratamento da dismenorrea (NIGAM et al., 2019). Com relação aos compostos químicos presentes na *A. vulgaris* L. destacam-se a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica com propriedades antimaláricas e o óleo essencial rico em alfa-pineno, mentol, beta-eudesmol e espatulenol (ALIZADEH et al., 2012; GAUR et al., 2014).

Alguns estudos relatam sobre as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e citotóxicas dos extratos alcoólicos e óleos essenciais de *A. Vulgaris* (SALEH et al., 2014; HAMAD, 2018). No entanto, estudos sobre o potencial citogenotóxico das infusões aquosas da espécie são escassos.

O bioensaio *Allium cepa* é um teste promissor para o *screening* inicial de citogenotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais por apresentar considerável custo benefício, reprodutibilidade satisfatória, além de sua validação por órgãos reguladores (CARMO; LEAL; RIBEIRO, 2020). Esta eficácia baseia-se nas características da cinética de proliferação da planta, no rápido crescimento de suas raízes, ao seu grande número

de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade ao longo do ano, fácil manuseio e pequeno número ($2n = 16$) e grande tamanho de seus cromossomos (MARIN-MORALES; VENTURA CAMARGO, 2016).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citogenotóxicos e mutagênicos dos chás de *Artemisia vulgaris* L. utilizando o biensaio *Allium cepa*.

2 | METODOLOGIA

2.1 Material botânico e ensaio de germinação

Para os ensaios de germinação das sementes de *A. cepa*, foi utilizado o chá comercial de *Artemisia vulgaris* L. As infusões foram preparadas nas concentrações 0,5 g/L, 2,5 g/L e 5,0 g/L. Como controle negativo utilizou-se água destilada e como controle positivo, metil metano-sulfonato (MMS) (10 µg/mL). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições de 50 sementes por tratamento. Previamente, todas as sementes foram tratadas com água destilada por 24h para a emissão das raízes e transferidas para placas de Petri com os respectivos tratamentos e grupos controle por mais 72h. As sementes foram mantidas em estufa do tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) a 24°C.

2.2 Análise citogenética

As raízes foram coletadas e fixadas com etanol/ácido acético glacial (3:1, v/v) por 24 horas, lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N a 60° por 2 minutos. As lâminas foram preparadas utilizando o método do esmagamento em orceína acética 2% (GUERRA; SOUZA, 2002). Para cada tratamento, foram selecionadas cinco lâminas e dez campos foram avaliados (totalizando 1.000 células / lâmina) sob microscópio de luz (RIBEIRO et al., 2013).

Para observar a citotoxicidade dos chás, foram analisados os índices mitóticos e de morte celular para cada tratamento. Para a análise dos efeitos genotóxicos, foi observada a presença de alterações cromossômicas como cromossomos perdidos, aderências cromossômicas (*stickness*), C-metáfases, pontes cromossômicas, dentre outras (BIANCHI, 2008).

Os controles positivos e negativos serviram como parâmetros para a análise dos chás, onde o controle positivo, tratado com metil metano-sulfonato – MMS (10 µg/mL), foi visto como a situação mais danosa para as células, e o controle negativo, tratado apenas com água destilada, como a menos capaz de danificar as células meristemáticas de *A. cepa*.

2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* Sisvar (Ferreira, 2011), e os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão (SD) com pós teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), para avaliar as significâncias das diferenças entre o índice mitótico e a frequência de anormalidades cromossômicas e nucleares.

3 | RESULTADOS

Os resultados das análises citotóxicas e genotóxicas das infusões de *Artemisia vulgaris* L. são mostrados na Tabela 1.

Tratamentos	Índice Mitótico ± 0.66	Alterações Cromossômicas ± 0.21	Micronúcleo ± 0.71	Núcleo Condensado ± 1.33
Controle Positivo	8.64 a1	1.78 a3	3.22 a2	6.38 a2
Controle Negativo	9.70 a2	0.20 a1	0.14 a1	0.07 a1
0.5 g/L	11.30 a2	1.19 a2	0.82 a1	8.23 a2
2.5 g/L	11.78 a2	1.05 a2	0.97 a1	8.33 a2
5.0 g/L	9.30 a1	0.93 a2	0.99 a1	14.85 a3

Nota: Os valores médios provenientes da análise das lâminas de cada tratamento são mostrados com letra "a" com índices diferentes. (Teste de Scott-Knott, $p < 0,05$). \pm desvio padrão.

Tabela 1: Análise estatística das células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos chás de *Artemisia vulgaris* L.

3.1 Efeitos citotóxicos

O Índice Mitótico, caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular, foi utilizado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade dos extratos aquosos de *A. vulgaris* L. Isso significa que, índices mitóticos menores que o controle negativo podem indicar alterações decorrentes da ação química dos chás no crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, índices mitóticos superiores ao controle negativo, são resultados de um aumento na divisão celular, que pode ser prejudicial à célula, levando a uma proliferação celular desordenada (LEME, MARIN-MORALES, 2009). A análise do índice mitótico permitiu observar a presença de valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para a concentração de 5 g/L, o que pode ser justificado por uma maior concentração de óleos essenciais nas infusões nesta concentração. Saleh et al. (2014), verificaram que os óleos essenciais de *A. vulgaris* atuam como um indutor seletivo de apoptose em células cancerosas.

A citotoxicidade dos chás também pode ser observada analisando o índice de morte celular para cada tratamento (BIANCHI, 2008). Em muitas células foram constatadas características de morte celular, como condensação do núcleo (FIG. 1 e Tab. 1) (OLIVEIRA, 2015). Foi possível constatar também que a citotoxicidade das infusões de *A. vulgaris* aumentou de maneira dose-dependente.

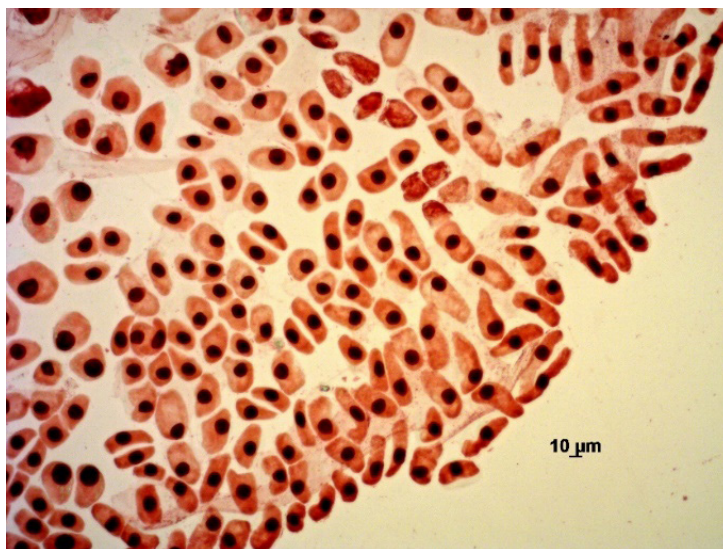


Figura 1 – Células meristemáticas de *A. cepa* com núcleo condensado

Fonte: Autor

3.2 Efeitos genotóxicos

As alterações cromossômicas são resultantes de modificações na estrutura dos cromossomos. Elas são provenientes de quebras, bem como mudanças no número total de cromossomos, sendo que podem ocorrer após a exposição a agentes químicos (BIANCHI, 2008). A partir das análises microscópicas foi possível constatar a presença de alterações cromossômicas (FIG. 2 e Tab. 1) nas células tratadas com as três concentrações das infusões de *A. vulgaris* L. testadas, o que indica genotoxicidade, ou seja, a capacidade dos compostos presentes nas infusões provocarem danos ao material genético das células meristemáticas de *A. cepa*.

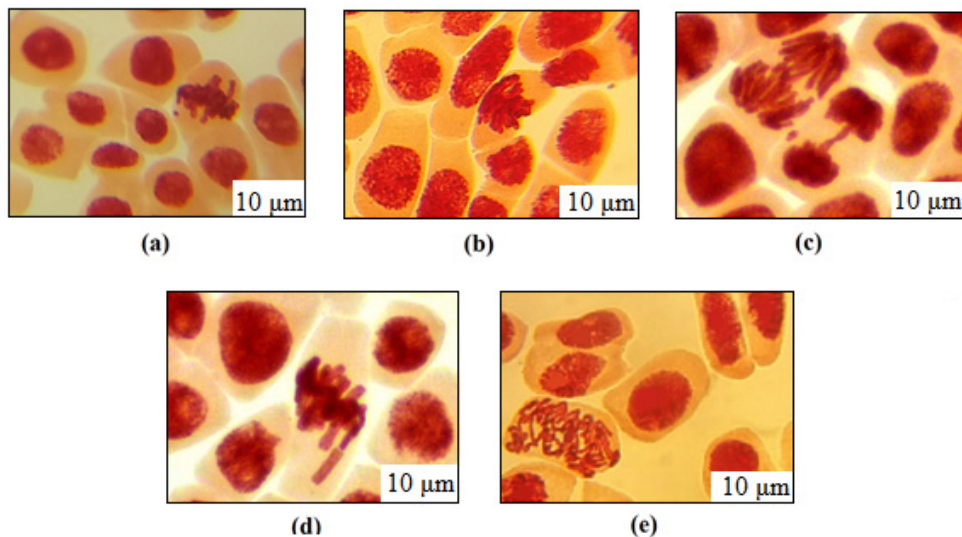


Figura 2 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa*:
 (a) Metáfase com fragmento cromossômico; (b) Metáfase com aderência cromossômica (*stickness*); (c) Telófase com ponte cromossômica; (d) Metáfase com cromossomo perdido; (e) duplicação cromossômica.

Fonte: Autor

4 | CONCLUSÃO

As infusões de *A. vulgaris* L. mostraram efeitos citotóxicos e genotóxicos sobre as células meristemáticas de *A. cepa*, o que reforça o potencial da espécie como uma fonte promissora de pesquisa para novos agentes antitumorais.

Os efeitos citogenotóxicos observados sugerem ainda, cautela quanto à utilização rotineira das infusões de *A. vulgaris* por humanos, enfatizando a necessidade de estudos mais aprofundados utilizando outros sistemas de testes em mamíferos.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, M. *et al.* Composição química do óleo essencial de *Artemisia vulgaris* do oeste do Azerbaijão, Irã. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 493-496, 2012.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 165 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, 2008.

CARMO, L.R.; LEAL, L.S.; RIBEIRO, L.R. *Allium cepa* e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82419-82430, 28 out. 2020.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GAUR, R. *et al.* Estudos antimaláricos *in vitro* de novos produtos biotransformados com artemisinina e seus derivados. **Phytochemistry**, v. 107, p. 135-140, 2014.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC, 2002. 131p.

HAMAD, A. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential in *Artemisia vulgaris* L. **Revista Romana de Medicina de Laborator**, 2018.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Hermed Pharmacology, Shahrekord**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 1 jan. 2018.

LEME, D. M; MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring**: A review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 254p.

MARIN-MORALES, M.A.; VENTURA-CAMARGO, B. Micronuclei and chromosome aberrations derived from the action of Atrazine herbicide in *Allium cepa* meristematic cells. **Journal of Earth Sciences & Environmental Studies**, Rio Claro, v. 1, p. 22-28, 18 jan. 2016.

NIGAM, M. *et al.* Bioactive Compounds and Health Benefits of Artemisia Species. **Natural Product Communications**, p. 1-17, 2019.

OLIVEIRA, C. Citometria de fluxo como metodologia para análise de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: uma abordagem comparativa com a citogenética. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, 2015.

RIBEIRO, L.R. *et al.* Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences**, p. 433 - 438, 2013.

SALEH, A. *et al.* *In vitro* cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

VAN WYK, B.; WINK, M. **Medicinal plants of the world**. 2. ed. rev. Pretoria: Cabi, 2017. 520 p.

CAPÍTULO 8

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *PSEUDOBOMBAX MARGINATUM* (A.ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS

Data de aceite: 01/04/2021

Nathália Amorim Madeiro dos Santos

Mestranda em Biotecnologia, Universidade
Potiguar, Natal, RN

Juciana Freitas da Silva

Mestrando em Biotecnologia, Universidade
Potiguar, Natal, RN

Tiago Pinheiro de Souza

Mestrando em Biotecnologia, Universidade
Potiguar, Natal, RN

Heryka Myrna Maia Ramalho

Doutora em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Potiguar, Natal, RN

RESUMO: A espécie *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns, uma árvore endêmica da América do Sul, pertencente à família Malvaceae, possui potencialidade para uso terapêutico. Devido as suas propriedades farmacológicas, a espécie é utilizada para tratamento de úlcera, gastrite, ação antiinflamatória e contraceptiva. Visando contribuir para um maior conhecimento sobre a importância das atividades biológicas da espécie, é que apresentamos uma revisão das principais publicações envolvendo estudos etnobotânicos e biológicos da *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns. Para o levantamento bibliográfico foram utilizados como descritores os seguintes termos: *Pseudobombax marginatum*; *P. marginatum*

and extracts. Foram encontrados um total de 25 artigos, desse total, foram incluídos 18 artigos para a revisão, os demais não se adequaram aos critérios de inclusão. Os diferentes estudos encontrados demonstraram que a espécie vegetal apresenta compostos fenólicos, com isso ação antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana e ação antiinflamatória. Os resultados confirmam que a espécie pode ser utilizada para fins terapêuticos, além de permitir que novos produtos farmacêuticos possam ser desenvolvidos e outros testes possam ser realizados *in vitro* e *in vivo* para a confirmação de outras atividades biológicas.

PALAVRAS - CHAVE: Embiratanha, etnobotânica, plantas medicinais.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *PSEUDOBOMBAX MARGINATUM* (A.ST.- HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS

ABSTRACT: The species *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns, an endemic tree in South America, belonging to the Malvaceae family, has potential for therapeutic use. Due to its pharmacological properties, the species is used to treat ulcers, gastritis, anti-inflammatory and contraceptive action. Aiming to contribute to a greater knowledge about the importance of the species biological activities is that we present a review of the main publications involving ethnobotanical and biological studies of *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. &Cambess.) A. Robyns. For the bibliographic survey, the following terms

were used as descriptors: *Pseudobombax marginatum*; *P. marginatum* and extracts. A total of 25 articles were found, 18 articles were included for a review, the others did not meet the inclusion criteria. The different studies found showed that the plant species has phenolic compounds, therefore, confirming its antioxidant, antimicrobial, antibacterial and anti-inflammatory action. The results confirm that the species can be used by for therapeutic purposes, in addition to allowing new pharmaceutical products to be developed and other tests to be carried out *in vitro* and *in vivo* to confirm other biological activities.

KEYWORDS: Embiratanha, ethnobotanical, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antiga quanto à espécie humana. Algumas comunidades e grupos étnicos dispõem muitas vezes de um único recurso terapêutico para o tratamento de doenças, que são as plantas medicinais, entretanto, a procura por tratamentos alternativos ou aliados a medicamentos vem crescendo consideravelmente, sendo essa uma prática frequente entre a sociedade brasileira (MACIEL *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2015).

O uso de plantas medicinais no Brasil, associada ao conhecimento popular, tem sido repassada através das gerações, o que corresponde à utilização de muitas dessas plantas para cura da população frente a várias enfermidades (DUARTE, 2006).

Para Maciel *et al.* (2002), as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas das espécies vegetais, auxiliando os pesquisadores na seleção de espécies para estudos botânicos, farmacológicos e fitoquímicos.

Um ecossistema brasileiro muito promissor, porém, ainda pouco explorado, é a caatinga, que têm uma ampla diversidade florística, contendo cerca de vinte mil espécies de plantas (GIULIETTI *et al.*, 2004).

A caatinga é uma formação vegetal particular, que cobre cerca de 10% do território nacional (área aproximada de 900.000 Km²) e 70% do território nordestino (SANTOS *et al.*, 2015). Trovão e colaboradores (2004) reportaram que a caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, caracterizado por possuir plantas adaptadas fisiologicamente às condições de deficiência hídrica.

Uma das espécies característica do bioma caatinga é a *Pseudobombax marginatum* (A. ST – Hil, Juss. & Cambess) A. Robyns que pertence à família Bombacaceae, reclassificada em Malvaceae, conhecida popularmente como embiratanha, embiruçu, paineira-embiruçu ou sumaúma (LORENZI, 1998; VERAS FILHO, 2012).

De acordo com Agra e colaboradores (2008), a espécie apresenta emprego medicinal por populações da região Nordeste do Brasil, que utilizam o método de decocção e maceração como forma de preparo e aplicam nos casos de processos inflamatórios e no combate a dores no corpo e na cabeça.

A preocupação com a sustentabilidade dos recursos naturais tem incentivado o aumento nas investigações sobre a atividade biológica e farmacológica de diversas espécies de plantas medicinais, com o intuito de se desenvolver novos medicamentos à base de extratos vegetais.

Diante do exposto esse estudo teve como objetivo contribuir para um maior conhecimento sobre a importância das atividades biológicas da espécie, sendo assim, apresentamos uma revisão das principais publicações envolvendo estudos sobre as ações biológicas da *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns.

METODOLOGIA

O presente estudo foi conduzido procedendo às buscas na literatura científica por artigos em bancos de dados específicos. O levantamento dos artigos foi realizado em bibliotecas *online*, como: Google *scholar*, Scielo, Pubmed, e Science Direct. A pesquisa foi realizada utilizando-se os descritores: *Pseudobombax marginatum*; *P. marginatum* and extracts, nas línguas portuguesa e inglesa (Tabela 01). O período de tempo utilizado para às buscas foi entre o ano de 1990 até o ano de 2021.

Palavras-chave	Base de dados	Referências identificadas
<i>Pseudobombax marginatum</i>	Google scholar	21
	Scielo	3
<i>P. marginatum</i> and extracts	Pubmed	1
	Science Direct	0

Tabela 01. Referências bibliográficas identificadas conforme as palavras-chave e bases de dados pesquisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em recente estudo, Figueiredo *et al.* (2020), apontam que a distribuição de *Pseudobombax marginatum* ocorre no Peru, Bolívia e Brasil, neste último, mais especificamente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sob o domínio da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, incluindo a Floresta Decidual Sazonal (Flora do Brasil 2020 em preparação). Os dados de floração da espécie, na caatinga nordestina indicam que a floração ocorre nos meses de março, junho e de agosto a novembro e frutificação em novembro (FIGUEIREDO *et al.*, 2020).

Pseudobombax marginatum apresenta porte arbóreo, pouco ramificada, medindo entre 5 e 14 m e caule irregular com excrescências amorfas, glabrescentes, com estrias longitudinais verde-amareladas (PEQUENO *et al.*, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2020).

Flores terminais ou subterminais, solitárias, 11-17,3 cm de comprimento, botões oblongos a obovais, com antese noturna. Folhas compostas, digitadas, agrupadas no ápice dos ramos, de 5 a 9 folíolos, revestida de pelos em ambas as faces. O seu fruto é uma cápsula lenhosa, de 10 a 16 cm de comprimento, com muitas sementes pequenas com 0,5-0,6 cm de comprimento, piriformes, marrom-claras quando imaturas e enegrecidas quando herborizadas, envoltas em fibra dourada, parecidas com algodão (CAMPANHA ; ARAÚJO, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2020).

A madeira da Embiratanha é considerada uma madeira leve (DIÓGENES *et al.*, 2019). Autores sugerem que a espécie *P. marginatum* apresenta diferentes utilidades, a sua madeira leve é indicada para confecção de caixotes, forros, brinquedos e calçados. A raiz da planta nova pode ser utilizada para alimentação humana em tempos de escassez. Pode ser usada para fins paisagísticos, pela beleza da floração e para restauração florestal, para enriquecer capoeiras e matas ciliares. As fibras da casca são muito resistentes e podem ser usadas para a produção de excelentes cordas, além de ser utilizada para a construção de casa de taipa (CAMPANHA; ARAÚJO, 2010).

A partir dos dados da literatura investigada podemos distribuir os artigos elegidos para essa pesquisa em duas categorias, artigos etnobotânicos e artigos experimentais, como podem ser verificados na Tabela 02.

Tipo de Artigo	Parte da planta usada	Manipulação	Indicação	Estado	Autor/Ano
Etnobotânico	Caule	-	Inflamação espinhal	Nordeste	ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , (2007)
Etnobotânico	Caule	Decocto	Antiinflamatório	Nordeste	AGRA <i>et al.</i> , (2008)
Etnobotânico	-	-	-	Paraíba	ALMEIDA <i>et al.</i> , (2010)
Etnobotânico	-	-	-	Paraíba	SANTOS E MELO (2010)
Etnobotânico	Entrecasca	Maceração	Dor de coluna	Rio Grande do Norte	ROQUE <i>et al.</i> , (2010)
Etnobotânico	Casca	Maceração	Antiinflamatória Cicatrização de feridas Contraceptiva Úlceras Gastrite	Rio Grande do Norte	PAULINO <i>et al.</i> , (2011)
Etnobotânico	Casca	Maceração	Dores nas costas Dor de dente	Rio Grande do Norte	FREITAS E COELHO (2011)

Etnobotânico			Crise de coluna Tosse Bronquite Depressão Nervosismo Hérnia Úlcera Fadiga Pedra nos rins		Pereira Júnior <i>et al.</i> , (2014)
Experimental	Extrato da casca do caule e das folhas	-	Atividade antimicrobiana Toxicidade	Pernambuco	VERAS FILHO, (2012)
Experimental	Extrato da casca do caule	-	Atividade antimicrobiana	Paraíba	COSTA <i>et al.</i> , (2013)
Experimental	Extrato da casca do caule	-	Atividade antiinflamatória e anti-nociceptiva	Rio Grande do Norte	PAIVA <i>et al.</i> , (2013)
Experimental	Extrato do caule, galhos, raiz, flores	-	Atividade antioxidante	Rio Grande do Norte	MENEZES <i>et al.</i> , 2015
Experimental	Extrato da casca do caule	-	Atividade antibacteriana	Rio Grande do Norte	SANTOS <i>et al.</i> , 2018
Experimental	Extrato da casca do caule	-	Atividade antiinflamatória	Ceará	GONÇALVES <i>et al.</i> , (2019)

Tabela 02. Estudos conduzidos com a espécie *Pseudobombax marginatum* (A.St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns.

Diante dos dados observados na Tabela 02, pode-se verificar que os estudos etnobotânicos dessa espécie foram realizados entre os anos de 2007 e 2011, o que sugere que são necessárias outras investigações para um melhor entendimento da espécie. Apesar de que, nos anos de 2018 e 2020 foram encontrados trabalhos taxonômicos das espécies da família Malvaceae. Estudos experimentais com a espécie *P. marginatum* só foram reportados a partir do ano de 2013, sendo o último publicado no ano de 2018.

Ao realizar a subdivisão dos estudos que citam a referida espécie, podemos verificar que os manuscritos que tiveram a abordagem etnobotânica apresentaram-se em maior quantidade do que aqueles com abordagem experimental. Sendo assim, procedemos a análise individual destes estudos, para um melhor conhecimento sobre as apreciações realizadas em cada um deles.

Uma revisão de literatura foi conduzida por Albuquerque e colaboradores (2007), com o objetivo de analisar os dados publicados relativos a plantas medicinais utilizadas por comunidades tradicionais da região semi-árida do Nordeste brasileiro, os resultados indicaram que, na época, 21 publicações citavam 389 espécies de plantas medicinais. Dentre as espécies, *P. marginatum*, foi citada, sendo utilizada a casca do caule para o

tratamento de inflamação espinhal.

De acordo com estudo etnobotânico de plantas medicinais da região Nordeste realizado por Agra *et al.* (2008), foi reportado que o caule da espécie *P. marginatum* foi utilizado na forma de decocto como agente anti-inflamatório.

Uma pesquisa realizada em três comunidades no semi-árido nordestino sobre a importância de plantas medicinais nativas e exóticas citadas pela comunidade rural Almeida *et al.* (2010), verificaram que a *P. marginatum* foi citada como espécie nativa nas três comunidades. No mesmo ano, um levantamento florístico de uma área de caatinga no município de Boqueirão, Paraíba, foi conduzido e constatou-se que foram registradas 47 espécies, uma delas era a *P. marginatum*, que foi relatada ter um hábito arbóreo (SANTOS; MELO, 2010).

A identificação de diferentes formas de uso de plantas medicinais nativas do bioma Caatinga, em comunidade rural no município de Caicó, Rio Grande do Norte, foi conduzido por Roque *et al.* (2010), foram descritos os usos medicinais de 62 espécies, reportadas por 12 informantes. Dentre as espécies a *P. marginatum* foi citada pela utilização da sobrecasca, sob forma de manipulação a maceração, sendo indicada para dor de coluna. As cascas e as raízes foram as partes predominantemente consumidas. Os dados levantados por esta pesquisa evidenciaram uma diversidade de espécies da flora seridoense com potencial medicinal e reforçam a importância que a biodiversidade tem sobre as comunidades rurais.

Paulino *et al.* (2011), fizeram um levantamento de plantas medicinais e a caracterização da sua utilização em um pequeno vilarejo denominado Sítio de Góis, localizado em Apodi no Rio Grande do Norte, Brasil. Os resultados do estudo mostraram que a *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil. Juss.& Cambess.) A. Robyns, conhecida na localidade como imbiratanha, apresentou um alto valor de importância relativa para a comunidade, sendo reportado que a água da casca apresenta atividade antiinflamatória, na cicatrização de feridas, ação contraceptiva e para o tratamento de úlceras e gastrite.

Um estudo conduzido em uma comunidade rural em Mossoró, RN, resgatou os conhecimentos tradicionais a respeito do uso, manejo e conservação de plantas medicinais na comunidade, os resultados apresentaram que 41 espécies foram citadas, dentre essas a *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil. Juss.& Cambess.) A. Robyns, foi relatado que é utilizada para o tratamento de dores nas costas e de dente (FREITAS; COELHO, 2014).

Levantamento etnobotânico realizado a fim de subsidiar pesquisas sobre fitofármacos a serem desenvolvidos com espécies vegetais ocorrentes na Caatinga, constatou que 38 espécies foram identificadas no levantamento etnobotânico, a *P. marginatum* foi uma das espécies citadas, com indicação para crise de coluna, tosse, nervosismo, bronquite, depressão, hérnia, úlcera, fadiga, pedra nos rins, usando o método de chá e lambedor (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Os resultados desse levantamento apontam que apenas 06 investigações na literatura avaliaram a utilização de extrato de *P. marginatum* para a análise das suas

atividades biológicas. Um desses manuscritos foi conduzido por Costa *et al.* (2013) que averiguaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de algumas plantas medicinais da região semi-árida da Paraíba. Os resultados do trabalho apontaram que a Embiratanha apresentou atividade antimicrobiana para pelo menos três espécies de *Candida*.

O estudo realizado por Veras Filho (2012) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de folhas e casca de Embiratanha, os quais demonstraram uma importante atividade antimicrobiana sendo ativas contra 70% das bactérias testadas. Esses mesmos autores utilizaram do bioensaio de letalidade da *A. salina* na avaliação de extratos brutos das cascas e folhas de *Pseudobombax marginatum* revelando resultados interessantes, os quais foram considerados atóxicos (VERAS FILHO, 2012).

Um experimento *in vivo* para avaliar o efeito antiinflamatório e antinociceptivo do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *P. marginatum* foi conduzido por Paiva *et al.* (2013). Os dados experimentais do extrato avaliado indicaram atividade antiinflamatória e antinociceptiva, confirmando a indicação da espécie para a medicina tradicional.

A interação do extrato das cascas do caule de *P. marginatum* com a superfície celular de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foi avaliado por um grupo de pesquisadores com o intuito de verificar a atividade antibacteriana deste, os resultados sugerem que o extrato de *P. marginatum* interfere na superfície celular de *B. cereus* bem como no seu possível mecanismo de ação. Além de afetar a parede da célula bacteriana causando alterações na membrana citoplasmática e no seu conteúdo, ocasionando inibição do crescimento ou morte celular. Além disso, também constatou-se que, a análise química do extrato apresentou compostos fenólicos, dentre eles derivados de catequina, ou seja, os resultados da atividade antibacteriana, pode ser atribuída a esses derivados (SANTOS *et al.*, 2018).

No tocante a composição química da Embiratanha foi reportada a presença de três estudos que verificaram os compostos químicos presentes em partes distintas da espécie. A investigação conduzida pelo grupo de Veras Filho e colaboradores (2012) realizou um *screening* fitoquímico qualitativo do extrato hidroetanólico de folhas e cascas, além de determinar a sua toxicidade preliminar e avaliar o potencial antioxidante da Embiratanha. Os testes fitoquímicos apresentaram a presença de taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas e terpenos, destes os grupos que mais se destacaram em diversidade foram os terpenóides e compostos fenólicos, grupos químicos que estão estritamente relacionados com o efeito antiinflamatório da planta. Foi observado que as folhas e cascas apresentaram atividade antioxidante.

O outro estudo conduzido por pesquisadores examinou a quantificação de antocianinas dos extratos hidroetanólico das diversas partes, galhos, caule, raiz e flores, da Embiratanha (*Pseudobombax marginatum*). Foram avaliados os extratos com o intuito de estimar a concentração de antocianinas presente nos mesmos. Os resultados da pesquisa sugeriram que dentre as partes analisadas o caule apresentou a maior concentração de

antocianinas (MENEZES *et al.*, 2015).

Gonçalves *et al.* (2019) preparou um extrato etanólico à frio de *Pseudobombax marginatum*, bem como o isolamento e caracterização de seus metabólitos com o objetivo de avaliá-los quanto suas propriedades medicinais. O material passou por avaliação de RMN, resultando no isolamento do lupeol, substância com propriedades medicinais antiinflamatórias.

Diante da avaliação dos estudos alocados no presente trabalho podemos inferir que essa é uma área que permite uma ampla quantidade de pesquisas científicas, pelo grande potencial biológico da espécie em estudo.

CONCLUSÃO

Observou-se, dentre os estudos arrolados, que a espécie *Pseudobombax marginatum* (A. ST – Hil, Juss. & Cambess) A. Robyns possui reconhecida ação cicatrizante, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antibacteriana. Apesar das conhecidas atividades biológicas da espécie verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novos estudos para comprovação das demais atividades biológicas ainda não reportadas na literatura. Além disso, os resultados demonstram que essa espécie tem um grande potencial terapêutico, podendo ser alvo de inúmeros estudos para o desenvolvimento de fitofármacos que possam ser produzidos com a utilização de ferramentas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. de F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA FILHO, J. M. **Survey of medicinal plants used in theregion Northeast of Brazil**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach**. Journal of Ethnopharmacology, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALMEIDA, C. de F. C. B. R. de; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. **A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil**. Journal of Ethnopharmacology, v. 127, p. 674-684, 2010.

CAMPANHA, M. M.; ARAÚJO, F. S. **Árvores e arbustos do sistema agrossilvipastoril Caprinos e Ovinos**, CE. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 32 p, 2010.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, V. G. B.; SILVA, J. D. F.; TROVÃO, D. M. D. B. M.; MEDEIROS, A. C. D. **In vitro antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil**. Revista Odonto Ciência, v.28, p.101-104, 2013.

DIÓGENES, F. E. G.; MAIA, J. H.; SOUZA, L. S.; DE SOUSA, T. M.; CASTRO, V. G. **Caracterização física e determinação do teor de extrativos da madeira de Embiratanha**. Advances in Forestry Science, v. 6, p. 755-759, 2019.

- FIGUEIREDO, S. S.; MONTEIRO, F. K. D. S.; MELO, J. I. M. D. **Flora of Paraíba, Brazil: Bombacoideae Burnett (Malvaceae)**. Biota Neotropica, v. 20, 2020.
- FREITAS, A. V. L.; COELHO, M. D. F. B. **Os “remédios do mato” por especialistas locais da comunidade São João da Várzea, Mossoró, RN, Brasil**. Interações (Campo Grande), v. 15, p. 249-264, 2014.
- GIULIETTI, A. M.; BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação, 2004.
- GONÇALVES, S. C. R. A. H., CÉSAR, A., & RODRIGUES, P. **Estudo químico de plantas medicinais do sertão central - *Pseudobombax marginatum***. 2019. Disponível em: [semicEmbiratanhaSaid.pdf](#) ([ifce.edu.br](#))
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA., 887p., 2002.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F.; Grynberg, N. F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química nova, v. 25), p. 429-438, 2002.
- MENEZES, M. A. G.; DE OLIVEIRA NETO, F. B.; BERTINO, L. M.; DA SILVA, F. F. M.; ALVES, L. A. **Quantificação de antocianinas dos extratos de Embiratanha (*Pseudobombax marginatum*)**. HOLOS, v. 1, p. 30-35, 2015.
- PAIVA, D. C.; SANTOS, C. A.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; THOMAZZI, S. M.; FALCÃO, D. A. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar**. Journal of Ethnopharmacology. n. 16, v. 149, p. 416-421, 2013.
- PAULINO, R DA C.; HENRIQUES, G. P. DE S. A.; COELHO, M. DE F. B.; ARAÚJO, P. V. DO N. **Riqueza e importância das plantas medicinais do Rio Grande do Norte**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 11, p. 157-168, 2011.
- PEREIRA JUNIOR, L. R.; ANDRADE, A. P. D.; ARAÚJO, K. D.; BARBOSA, A. D. S.; BARBOSA, F. M. **Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos**. Floresta e Ambiente, v. 21, p. 509-520, 2014.
- PEQUENO, I. D.; ALMEIDA, N. M.; SIQUEIRA FILHO, J. A. **Biologia reprodutiva e guilda de visitantes florais de *Pseudobombax marginatum* (Malvaceae)**. Rodriguésia, v. 67, p. 395-404, 2016.
- 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 Medicinais, v. 12, p. 31-42, 2010.
- SANTOS, A. C. J.; MELO, J. I. M. **Flora vascular de uma área de caatinga no estado da Paraíba-Nordeste do Brasil**. Revista Caatinga, v. 23, p. 32-40, 2010.

SANTOS, A.C.B.; NUNES, T.S.; COUTINHO, T.S.; SILVA, M.A.P. **Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, p. 980-991, 2015.

SANTOS, E. C. G.; DONNICI, C. L.; CAMARGOS, E. R. S.; ARAÚJO-SILVA, G.; XAVIER-JUNIOR, F. H.; FARIAS, L. M. **Interaction of *Pseudobombax marginatum* Robyns Stem Bark Extract on the Cell Surface of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus***. Journal of Bacteriology and Mycology, v. 5, p. 1063, 2018.

TROVÃO, D. M. B. M.; SILVA; S. C.; SILVA, A. B.; VIEIRA JUNIOR, R. L. **Estudo comparativo entre três fisionomias de Caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Macapá, AP, v. 4, p. 1-5, 2004.

VERAS, F. J. **Desenvolvimento farmacotécnico de formulações plásticas do extrato bruto do caule de *Pseudobombax marginatum* (A. ST. – Hil, Juss. & Cambess) A. Robyns. Avaliação de atividades fitoquímica toxicológica, antimicrobiana e antioxidante**. 2012, 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HIF-1 α EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 05/02/2021

Beatriz da Silva Vimercati

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Alegre – ES
<http://lattes.cnpq.br/1043065006299584>

Sara de Oliveira Evaristo

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Alegre – ES
<http://lattes.cnpq.br/4793218461049389>

Maria Eliza Soares Queiroz

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Alegre – ES
<http://lattes.cnpq.br/6621092177441341>

Mayara Mota de Oliveira

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES
<http://lattes.cnpq.br/5495329160438980>

Árcia Leone Evangelista Monteiro de Assis

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES
<http://lattes.cnpq.br/4388048333806435>

Aline Ribeiro Borçoi

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES
<http://lattes.cnpq.br/0558531160628107>

Rafael Pereira de Souza

Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/4643289545572174>

Anderson Barros Archanjo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES
<http://lattes.cnpq.br/5529149503714764>

Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES
<http://lattes.cnpq.br/6445492335035108>

RESUMO: Introdução: O câncer oral possui um potencial rápido e ilimitado para o crescimento e pode apresentar regiões hipóxicas. O fator induzível por hipóxia (HIF) é uma das proteínas envolvidas na regulação da hipóxia e um importante marcador prognóstico no câncer oral. **Objetivo:** Analisar a expressão da proteína HIF-1 α e relacionar o perfil de expressão com as características clinicopatológicas de pacientes com câncer oral. **Métodos:** Para isto, foram obtidas, juntamente com as informações clinicopatológicas, 37 amostras de carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Das amostras foram preparadas lâminas histológicas para a coloração por AgNOR e para imunohistoquímica com o anticorpo anti-HIF-1 α . Os dados de contagem de regiões organizadoras de nucléolo e do padrão de expressão de HIF-1 α , foram relacionados com as características clinicopatológicas. **Resultados:** Foi observada uma associação do estadiamento clínico e do grau de diferenciação com a positividade de expressão da proteína HIF-1 α , onde os maiores scores eram de pacientes com estadiamento avançado. Foi possível observar ainda a

interrelação da expressão de HIF-1 α citoplasmática e nuclear. **Conclusão:** A proteína HIF-1 α é um potencial marcador prognóstico que pode proporcionar um maior entendimento das respostas celulares e sistêmica à hipóxia.

PALAVRAS - CHAVE: Câncer oral, HIF-1 α , hipóxia, regiões organizadoras de nucléolos, marcador prognóstico.

EXPRESSION OF THE HIF-1 α PROTEIN IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

ABSTRACT: Background: Oral cancer has a fast and unlimited potential for growth and can present hypoxic regions. The hypoxia-inducible factor (HIF) is one of the proteins involved in the regulation of hypoxia and an important prognostic marker in oral cancer. **Aim:** To analyze the expression of the HIF-1 α protein and to relate the expression profile with the clinical and pathological characteristics of patients with oral cancer. **Methods:** For this, 37 samples of squamous cell carcinoma of the oral cavity were obtained, together with the clinical and pathological information. Histological slides were prepared from the samples for staining by AgNOR and for immunohistochemistry with anti-HIF-1 α antibody. The counting data of nucleolus organizing regions and the pattern of expression of HIF-1 α , were related to the clinical and pathological characteristics. **Results:** An association between clinical staging and degree of differentiation with positive expression of the HIF-1 α protein was observed, where the highest scores were for patients with advanced staging. It was also possible to observe the interrelation of cytoplasmic and nuclear HIF-1 α expression. **Conclusion:** The HIF-1 α protein is a potential prognostic marker that can provide a better understanding of the cellular and systemic responses to hypoxia.

KEYWORDS: Oral cancer, HIF-1 α , hypoxia, nucleolus organizing regions, prognostic marker.

1 | INTRODUÇÃO

Os tumores malignos de cabeça e pescoço afetam principalmente homens, entre a quinta e oitava década de vida, sendo mais comum os que acometem a cavidade oral (INCA, 2019). Dentre os tipos histológicos que ocorrem na cavidade oral, o carcinoma de células escamosas são responsáveis por 90% dos casos (SILVEIRA et al., 2012). E o atraso no diagnóstico da lesão leva a limitação da resposta ao tratamento, um pior prognóstico e diminuição da sobrevida (LYDIAAT, 2002).

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento (BRENER et al., 2007), possuindo um potencial para crescimento rápido e ilimitado, logo, áreas de tecido hipóxico são comuns nesses tumores malignos, favorecendo a progressão do câncer e resistência à terapia. A hipóxia é um fator importante para a progressão tumoral, e os Fatores Induzíveis por Hipóxia (HIFs) e seus genes alvos, são as principais proteínas envolvidas na regulação da hipóxia (DE LIMA, 2014).

O HIF1 é uma proteína nuclear e um heterodímero, que é composto pelas subunidades HIF1 α e HIF1 β (WANG et al., 1995) e a subunidade alfa é um importante

marcador para o entendimento das respostas celulares e sistêmicas à hipóxia (CHINTALA et al., 2012). A atividade proliferativa pode estar diretamente relacionada ao aporte de oxigênio e nutrientes, assim a baixa tensão de oxigênio altera a homeostase celular, levando à ativação da proteína HIF-1 α , cuja expressão é altamente regulada pela concentração de oxigênio (SEMENZA, 2003). Em tumores sólidos, como o carcinoma de células escamosas, a expressão de HIF-1 α pode contribuir para a malignidade e comportamento agressivo (SANTOS et al., 2012).

Dessa forma, sabendo da importância da proteína HIF-1 α na progressão tumoral, este estudo teve como objetivo analisar a expressão desta proteína e relacionar com as características clinicopatológicas de carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

2 | METODOLOGIA

2.1 Casuística e amostras

Para este estudo, foram selecionadas 37 amostras de tecido tumoral, em blocos de parafina, de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral, tratados no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, Brasil. Além disso, foram coletadas as informações clinicopatológicas. Dos blocos de parafina com as amostras foram realizados cortes histológicos de três μ de espessura e depositados lâminas histológicas.

2.2 Análise das Regiões Organizadoras de Nucléolos

As lâminas foram coradas com AgNOR (PLOTON et al., 1986). A análise das RONS foi realizada pela contagem de 100 células neoplásicas utilizando microscópio óptico com aumento de 100x sob imersão. No final na contagem, determinado a média de RONS.

2.3 Reação para imunomarcção da proteína HIF-1 α

Para a recuperação antigênica foi utilizado solução de ácido cítrico pH 6,0 em forno micro-ondas. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a incubação em metanol e peróxido de hidrogênio (1:1) e o bloqueio de proteínas pela imersão das lâminas em solução de 3% de Leite Mólico® em TRIS pH 7,4. O anticorpo primário anti-HIF-1 α (1:200) foi aplicado e incubado em câmara úmida na geladeira overnight. A amplificação da reação foi realizada pela incubação anticorpo secundário por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados com o cromógeno DAB (1:50) e depois lavadas com água destilada. Por fim, contra-coradas com hematoxilina.

As lâminas foram analisadas e classificadas segundo o percentual de células coradas em: 0 (\leq 10%), 1 (11-30%); 2 (31-50%), 3 (51-75%) e 4 (> 75%); e pela intensidade de coloração em: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte). As pontuações foram multiplicadas e com base no score final, cada amostra foi categorizada como expressão

negativa (0), positiva fraca ($1 \leq 6$) ou positiva forte (> 6), seguindo a metodologia adaptada de Li *et al.* (2015).

2.4 Estatística e aspectos éticos

Foram utilizados os teste Qui-quadrado e de Mann-Whitney para os testes de associação, com nível de confiança de 95% e foram realizados no programa IBM SPSS Statistics 20. O estudo foi registrado e aprovado com os números CAAE: 49091515.9.0000.5060 e CAAE: 49091515.9.3002.5471.

3 | RESULTADOS

Ao realizarmos a análise do padrão de expressão citoplasmática de HIF-1 α e relacionarmos com as características clinicopatológicas e com o status da contagem de RONS, podemos observar uma associação da positividade de expressão com o estadiamento clínico e com o grau de diferenciação ($p = 0.010$; $p = 0.050$, respectivamente; Tabela 1). Não foi possível observar relação das demais características assim como do status RON com o padrão de expressão citoplasmática de HIF-1 α .

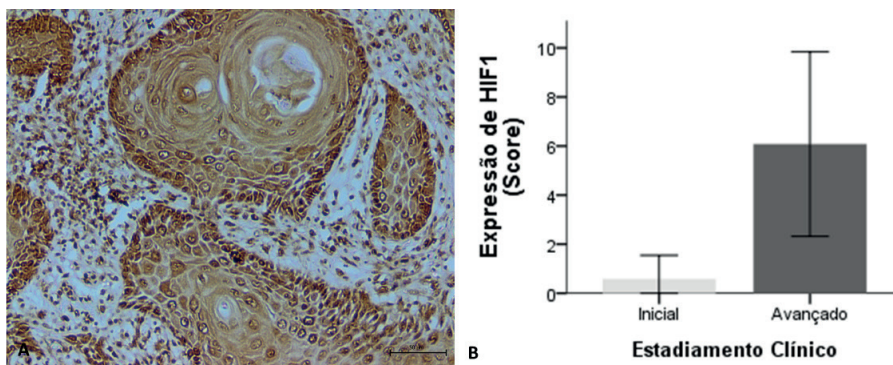


Figura 1. Fotomicrografia da expressão de HIF-1 α no tumor com imunomarcagem forte (A). Análise da expressão de HIF-1 α de acordo com o estadiamento clínico dos pacientes com câncer oral.

Em relação ao padrão de expressão nuclear de HIF-1 α , também foi possível observar uma associação do estadiamento clínico e do grau de diferenciação ($p = 0.005$; $p = 0.019$, respectivamente; Tabela 2). Observou-se ainda, que tanto para HIF-1 α citoplasmática ou nuclear os maiores valores de score estavam entre os pacientes com estadiamento clínico avançado ($p = 0.001$; Figura 1).

Quando comparamos os scores de expressão citoplasmática de HIF-1 α com a intensidade de expressão nuclear, observamos uma associação ($p = 0.000$), assim como

o inverso, do score de expressão nuclear pela intensidade citoplasmática ($p = 0.002$), ou seja, os padrões de expressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α são estreitamente ligados (Figura 2).

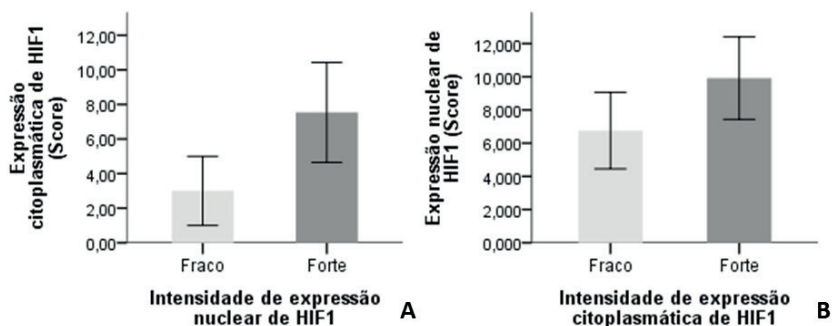


Figura 2. Análise da expressão de citoplasmática de HIF-1 α de acordo com a intensidade de expressão nuclear de HIF-1 α (A) e da expressão nuclear de acordo com a intensidade de expressão citoplasmática (B).

Características	Positividade			Intensidade						
	Negativo		<i>p</i>	Fraco		<i>p</i>				
	No.	(%)		No.	(%)					
Tamanho do tumor¹										
pT1, pT2	3	50,0	9	29,0	0,367	3	20,0	6	37,5	0,433
pT3, pT4	3	50,0	22	71,0		12	80,0	10	62,5	
Linfonodos¹										
Negativo	4	66,7	24	77,4	0,620	11	73,3	13	81,2	0,685
Positivo	2	33,3	7	22,6		4	26,7	3	18,8	
Estadiamento Clínico										
Inicial	3	50,0	1	3,2	0,010	1	6,7	0	0	0,484
Avançado	3	50,0	30	96,8		14	93,3	16	100,0	
Grau de diferenciação										
Bem	2	33,3	6	20,0	0,050	2	13,3	4	26,7	0,651
Moderadamente	3	50,0	24	80,0		13	86,7	11	73,3	
Pouco	1	16,7	0	0		0	0	0	0	
Infiltração Vascular										
Não	4	66,7	25	86,2	0,268	12	85,7	13	86,7	1,000
Sim	2	33,3	4	13,8		2	14,3	2	13,3	
Infiltração Perineural										
Não	3	50,0	20	69,0	0,391	8	57,1	12	80,0	0,245
Sim	3	50,0	9	31,0		6	42,9	3	20,0	
RON²										
1	4	66,7	24	77,4	0,620	11	73,3	13	81,2	0,685
2	2	33,3	7	22,6		4	26,7	3	18,8	

¹ Classificação TNM 7ª Edição; ² Regiões Organizadoras de Nucléolos: 1, contagem média $\leq 1,5$ e 2, contagem média $> 1,5$.

Tabela 1. Análise da expressão citoplasmática de HIF-1 α em carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

Características	Positividade				p	Intensidade				p
	Negativo		Positivo			Fraco		Forte		
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor¹										
pT1, pT2	3	60,0	9	28,1	0,304	3	33,3	6	26,1	0,685
pT3, pT4	2	40,0	23	71,9		6	66,7	17	73,9	
Linfonodos¹										
Negativo	3	60,0	25	78,1	0,577	7	77,8	18	78,3	1,000
Positivo	2	40,0	7	21,9		2	22,2	5	21,7	
Estadiamento Clínico										
Inicial	3	60,0	1	3,1	0,005	1	11,1	0	0	0,281
Avançado	2	40,0	31	96,9		8	88,9	23	100,0	
Grau de diferenciação										
Bem	2	40,0	6	19,4	0,019	1	11,1	5	22,7	0,642
Moderadamente	2	40,0	25	80,6		8	88,9	17	77,3	
Pouco	1	20,0	0	0		0	0	0	0	
Infiltração Vascular										
Não	3	60,0	26	86,7	0,195	0	0	4	19,0	0,287
Sim	2	40,0	4	13,3		9	100,0	17	81,0	
Infiltração Perineural										
Não	2	40,0	21	70,0	0,313	7	87,5	14	63,6	0,374
Sim	3	60,0	9	30,0		1	12,5	8	36,4	
RON²										
1	3	60,0	25	78,1	0,577	7	77,8	18	78,3	1,000
2	2	40,0	7	21,9		2	22,2	5	21,7	

¹ Classificação TNM 7ª Edição; ² Regiões Organizadoras de Nucléolos: 1, contagem média ≤ 1,5 e 2, contagem média > 1,5.

Tabela 2. Análise da expressão nuclear de HIF-1α em carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

4 | DISCUSSÃO

Pesquisadores do mundo todo estudam incansavelmente formas de ajudar pacientes com câncer a terem um diagnóstico mais preciso, tratamentos mais eficazes e uma qualidade de vida melhor durante o tratamento, para isso buscam marcadores tumorais que possam proporcionar um prognóstico mais assertivo para cada tipo de neoplasia. Em câncer oral, um dos marcadores estudados é a proteína HIF-1α.

Em nosso estudo, encontramos uma associação da positividade da expressão citoplasmática de HIF-1α com o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral. Segundo Burrows *et al.* (2010), uma intensa expressão de HIF-1α, principalmente nas lesões desdiferenciadas, estaria relacionada com uma pior taxa de sobrevida. Sabe-se ainda, que a expressão de HIF-1α pode estar associada ao estágio T, envolvimento de linfonodos, diferenciação histológica e densidade de microvasos (ZHU et al., 2010).

Outro fato conhecido, é que a imunexpressão nuclear de HIF-1α seria mais

fortemente evidenciada nas neoplasias orais e que a imunomarcagem dessa proteína teve uma relação significativa de acordo com o tamanho do tumor, metástase para linfonodos cervicais e estadiamento clínico da lesão, sugerindo que a expressão de HIF-1 α exerce um papel importante da carcinogênese oral, viabilizando seu uso como um recurso na predição da taxa de sobrevida e da progressão tumoral (ECKTER et al., 2010).

Observamos ainda, que o aumento da expressão de HIF-1 α esteve associado ao estadiamento clínico, e estudos anteriores demonstraram que quanto maior a classificação do estadiamento, pior o prognóstico do paciente (UICC, 2019). Ainda, de acordo com Kurokawa *et al.* (2003), superexpressão de HIF-1 α aumentou com o estadio do tumor, além de estar correlacionada com a profundidade da invasão do tumor, metástases de linfonodos, metástases a distância, estágio pTNM e invasão linfática.

Outra observação importante foi uma interrelação do aumento de expressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α , ou seja, mais forte a intensidade de expressão nuclear de HIF-1 α , maior o score da expressão citoplasmática de HIF-1 α e o inverso é verdadeiro. A ativação da HIF-1 α pode começar através de diferentes proteínas se ligando aos seus receptores na membrana nuclear (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2017). O sítio ativo dessa proteína é um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD), atuando como um sensor de oxigênio (GORLACH, 2009). Um estímulo celular externo desencadeia uma cascata de vias de sinalização no interior da célula, que induz a expressão de HIF-1 α (FUKUDA et al., 2002), mas sob condições de hipóxia, a atividade das proil-hidroxilases (PHD) diminui, estabilizando a HIF-1 α e com isso, havendo acúmulo no citoplasma para ser fosforilada. Uma vez fosforilada, a HIF-1 α transloca-se para o núcleo, formando o complexo HIF-1 α / HIF-1 β , que se liga a uma sequência de DNA específica, expressando a proteína HIF-1 α (ZHANG, 2015).

Além disto, a expressão de HIF-1 α exerce efeito significativo na progressão tumoral, devido a isso, pacientes com alta expressão de HIF-1 α apresentam uma taxa de sobrevida 3,49 vezes menor quando comparada a neoplasias com baixa expressão dessa proteína (OLIVEIRA et al., 2011). Acredita-se que a expressão de HIF-1 α , venha a ser um determinante para o fenótipo tumoral, sugerindo que seja um indício de fenótipo maligno com maior potencial de agressividade (ECKTER et al., 2012).

5 | CONCLUSÃO

Com este estudo, verificamos uma associação entre a expressão da proteína HIF-1 α com estadiamento clínico e grau de diferenciação, além de demonstrar uma interrelação do aumento de expressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α .

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho pela disponibilização das amostras da Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço (<http://www.gencapo.famerp.br/>). À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (83757490/18, 80706487/18 e 83965671/18), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

REFERÊNCIAS

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A.; et al. **Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto.** Revista Brasileira Cancerologia, v. 53, n. 1, p. 63-9, 2007.

BURROWS, N.; RESCH, J.; COWEN, R. L.; et al. **Expression of hypoxia-inducible fator 1 alpha in thyroid carcinoma.** Endocrine Related Cancer, v. 17, n. 1, p. 61-72, 2010.

CHINTALA, S.; NAJRANA, T.; TOTH, K.; et al. **Prolyl hydroxylase 2 dependent and Von-Hippel-Lindau independent degradation of Hypoxia-inducible factor 1 and 2 alpha by selenium in clear cell renal cell carcinoma leads to tumor growth inhibition.** BioMed Cancer, v. 12, n. 1, p. 293, 2012.

DE LIMA, P. O. **Condição hipóxica e prognóstico no carcinoma epidermóide oral.** Pesquisa anticâncer, v. 34, n. 2, pág. 605-612, 2014.

ECKERT, A. W.; SCHUTZE, A.; LAUTNER, M. H. W.; et al. **Correlação da expressão de proteínas relacionadas à hipóxia com o prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide oral.** Cirurgia Oral e Maxilofacial, v. 16, n. 2, pág. 189-196, 2012.

ECKERT, A. W.; SCHUTZE, A.; LAUTNER, M. H. W.; et al. **HIF-1alpha is a prognostic marker in oral squamous cell carcinomas.** International Journal Biological Markers, v. 25, n. 2, p. 87-92, 2010.

FERNÁNDEZ-TORRES, J.; MARTÍNEZ-NAVA, G. A.; GUTIÉRREZ-RUÍZ, M. C.; et al. **Papel da via de sinalização do HIF-1 α na osteoartrite: revisão sistemática.** Revista Brasileira de Reumatologia, v. 57, n. 2, p. 162-173, 2017.

FUKUDA, R.; HIROTA, K.; FAN, F.; et al. **Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells.** Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 41, p. 38205-38211, 2002.

GORLACH, A. **Regulation of HIF-1 α at the transcriptional level.** Current pharmaceutical design, v. 15, n. 33, p. 3844-3852, 2009.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019.

KUROKAWA, T.; MIYAMOTO, M.; KATO, K.; et al. **Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1 α (HIF-1 α) in oesophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage.** British journal of cancer, v. 89, n. 6, p. 1042-1047, 2003.

LI, Y. X.; ZHANG, L.; SIMAYI, D.; et al. **Human papillomavirus infection correlates with inflammatory Stat3 signaling activity and IL-17 level in patients with colorectal cancer.** PLoS One, v. 10, n. 2, p. e0118391, 2015.

LYDIATT, D. D. **Cancer of the oral cavity and medical malpractice.** The Laryngoscope, v. 112, n. 5, p. 816-819, 2002.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. **Significado prognóstico de biomarcadores imunohistoquímicos no carcinoma epidermóide oral.** Jornal internacional de cirurgia oral e maxilofacial, v. 40, n. 3, pág. 298-307, 2011.

SANTOS, M.; MERCANTE, A. M. C.; LOURO, I. D.; et al. **HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity.** PLoS One, v. 7, n. 9, p. e45228, 2012.

SEMENZA, G. L. **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** Nature reviews cancer, v. 3, n. 10, p. 721-732, 2003.

SILVEIRA, A.; GONÇALVES, J.; SEQUEIRA, T.; et al. **Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives.** Brazilian journal of epidemiology, v. 15, n. 1, p. 38-48, 2012.

UICC. **O que é TNM?**. 2019. Disponível em: <<https://www.uicc.org/>> . Acessado em: 20 de set. de 2020.

WANG, G. L.; JIANG, B. H.; RUE, E. A.; et al. **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** Proceedings of the national academy of sciences, v. 92, n. 12, p. 5510-5514, 1995.

ZHANG, F.; LUO, W.; LEI, G. **Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis.** Joint Bone Spine, v. 82, n. 3, p. 144-147, 2015.

ZHU, G.; TANG, Y.; LI, L.; et al. **Hypoxia inducible factor 1 α and hypoxia inducible factor 2 α play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma.** Clinical Cancer Research, v. 16, n. 19, p. 4732-4741, 2010.

CAPÍTULO 10

ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE NOVOS ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AHR), COM POTENCIAL EFICÁCIA ATEROPROTETORA EM FUMANTES

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 11/02/2021

Isaque Antonio Galindo Francischini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto, Brasil
[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/
visualizacv.do?id=K2461978J6](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K2461978J6)

Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto, Brasil
[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/
visualizacv.do?id=K4798640Z5](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4798640Z5)

RESUMO: Doenças cardíacas são resultantes de lesões ateroscleróticas que acabam por obstruir o fluxo sanguíneo normal, e atualmente são responsáveis por 31% das mortes que ocorrem ao redor do mundo. Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, e conseqüentemente a progressão para um quadro de doença cardiovascular, é o tabagismo, já que os principais componentes da fumaça do cigarro são moléculas que atuam como agonistas do receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR), este sendo responsável pelo controle de fatores de transcrição diretamente envolvidos na evolução da aterosclerose. Os antagonistas deste receptor atualmente reportados apresentam severas limitações que os impedem de serem utilizados na terapêutica, sendo as principais

delas alosterismo, atividade agonista parcial, tendência a biotransformação e citotoxicidade. O motivo dessas limitações se deve principalmente ao fato da ausência de informações acerca da estrutura tridimensional do receptor, em complexo ou não com ligantes, dificuldade essa que pode ser explicada por se tratar de um receptor citosólico, o que dificulta sua resolução por cristalografia de raios-X. O estudo atual, portanto, se baseou nos ligantes já reportados na literatura com atividade antagonista ao receptor, bem como em algumas estruturas proteicas homólogas tridimensionalmente resolvidas, para construir um padrão farmacofórico comum a esses ligantes, e a partir disso realizar triagens virtuais em uma base de dados de compostos naturais, o que resultou na descoberta de 4 novos compostos, com ótimas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas in silico, os quais podem contribuir para o avanço dos estudos relacionados aos inibidores de AhR.

PALAVRAS - CHAVE: Aterosclerose, AhR, Triagem Virtual, Química Medicinal Computacional, Produtos Naturais.

COMPUTACIONAL DEVELOPMENT OF NEW ANTAGONISTS OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR), WITH POTENTIAL ATEROPROTECTIVE EFICACY IN SMOKERS

ABSTRACT: Heart disease is the result of atherosclerotic lesions that end up obstructing normal blood flow, and are currently responsible for 31% of deaths that occur around the world. One of the main risk factors for the development of atherosclerosis, and consequently the

progression to cardiovascular disease, is smoking, since the main components of cigarette smoke are molecules that act as aryl hydrocarbon receptor agonists (AhR), which is responsible for the control of transcription factors directly involved in the evolution of atherosclerosis. The currently reported antagonists of this receptor have severe limitations that prevent them from being used in therapy, the main ones being allosterism, partial agonist activity, tendency to biotransformation and cytotoxicity. The reason for these limitations is mainly due to the fact that there is no information about the three-dimensional structure of the receptor, in complex or not with ligands, a difficulty that can be explained by the fact that it is a cytosolic receptor, which makes it difficult to resolve by X-ray crystallography. The current study, therefore, was based on ligands already reported in the literature with antagonistic activity to the receptor, as well as on some three-dimensionally resolved homologous protein structures, to build a pharmacophoric pattern common to these ligands, and from then perform virtual screenings on a data on natural compounds, which resulted in the discovery of 4 new compounds, with excellent pharmacokinetic and pharmacodynamic properties *in silico*, which can contribute to the advancement of studies related to AhR inhibitors.

KEYWORDS: Atherosclerosis, AhR, Virtual Screening, Computational Medicinal Chemistry, Natural Products.

1 | INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares decorrem de eventos agudos isquêmicos resultantes do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas nas artérias responsáveis pelo suprimento sanguíneo local (Hopkins, 2013). Dados epidemiológicos apontam que essas afecções respondem por 31% da mortalidade brasileira (Ministério da Saúde, 2010) e mundial (Mendis et al., 2011), o que destaca a aterosclerose como um grave problema de saúde pública.

A aterosclerose é definida como uma doença inflamatória vascular que se desenvolve em condições de hipercolesterolemia (aumento dos níveis séricos de colesterol carregado por lipoproteínas de baixa densidade, LDL) e acomete segmentos específicos da árvore arterial, especialmente pontos de bifurcação e ramificação de artérias elásticas e musculares de médio e grande calibre, onde a perturbação do fluxo sanguíneo laminar leva à perda do efeito ateroprotetor do estresse de cisalhamento laminar (Maiolino et al., 2013). O processo aterogênico ocorre em quatro estágios: (1) disfunção endotelial e inflamação vascular; (2) deposição, retenção e modificação de LDL no espaço subendotelial e formação de células espumosas; (3) formação de lesões fibrogordurosas e remodelamento arterial; e (4) precipitação de eventos agudos isquêmicos (Hopkins, 2013). O primeiro estágio resulta de alterações fenotípicas em células endoteliais, deflagradas por estímulos agressivos, como hipercolesterolemia e tabagismo (Libby et al., 2011). Esses estímulos induzem estresse oxidativo vascular, no qual espécies reativas de oxigênio (ERO) reduzem a biodisponibilidade de moléculas de óxido nítrico (NO) produzidas por células endoteliais, levando à disfunção endotelial (Xanthoulea et al., 2009). Dadas as

propriedades vasoprotetoras e antiinflamatórias do NO, a redução de sua biodisponibilidade ativa o fenótipo pró-trombótico de células endoteliais (Sprague & Khalil, 2009), que passam a expressar moléculas de adesão (ICAM-1) e adquirem permeabilidade aumentada a macromoléculas (Maiolino et al., 2013).

A partir daí, se inicia o segundo estágio do processo aterogênico, no qual partículas de LDL penetram na parede arterial, onde são retidas à matriz extracelular subendotelial (Tabas et al., 2007) e parcialmente oxidadas por ERO derivadas de células vasculares (Skalén et al., 2002). As LDL minimamente modificadas/oxidadas (mmLDL) estimulam células endoteliais a produzirem citocinas (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) que recrutam monócitos à parede vascular e induzem sua diferenciação em macrófagos, que, por sua vez, promovem a oxidação completa das mmLDL (Parhami et al., 1993).

As LDL completamente oxidadas (oxLDL) são internalizadas por macrófagos na tentativa falha de fagocitose, resultando na formação de células espumosas, que compõem as lesões ateroscleróticas iniciais (estrias gordurosas) (Henriksen et al., 1981). Em resposta à ativação de células endoteliais, plaquetas são ativadas e recrutadas ao endotélio inflamado, onde liberam fatores de crescimento que estimulam a migração de CMLV da túnica média para o espaço subendotelial, dando início ao terceiro estágio do processo aterogênico. No espaço subendotelial, as CMLV proliferam e produzem colágeno, o que leva ao desenvolvimento de uma capa fibrosa que recobre o núcleo lipídico da estria gordurosa, formando uma placa fibrogordurosa crescente (Maiolino et al., 2013). Quando essa placa atinge um estágio avançado de remodelamento expansivo, passa a obstruir o fluxo sanguíneo, originando os eventos isquêmicos do quarto estágio (Little et al., 1988).

O tabagismo ativo ou passivo tem sido epidemiologicamente estabelecido como fator de risco predominante para a aterosclerose (Kunitomo et al., 2009). De fato, a exposição à fumaça de cigarro aumenta em sete vezes o risco de doença arterial periférica (Heliövaara et al., 1978; Hughson et al., 1978) e em duas a cinco vezes o risco de doença arterial coronariana com eventos cardíacos subjacentes (Doll & Peto, 1976; Doll et al., 4 1980; Piegas et al., 2003), como seqüelas de eventos aterogênicos. Em estudo longitudinal, Howard et al. (1998) observaram que a progressão da aterosclerose aumenta em 50% em fumantes ativos e em 20% em fumantes passivos. Por fim, 69% do total de mortes anuais atribuídas à exposição passiva à fumaça de cigarro nos Estados Unidos é decorrente de eventos cardíacos isquêmicos causados por lesões ateroscleróticas coronarianas (Glantz & Parmley, 1991). Com base nessas evidências, e considerando que a prevalência do tabagismo no Brasil é de 24% (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007), é possível denotar a importância do desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para atenuar a progressão da aterosclerose em fumantes.

Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a exposição à fumaça do cigarro acelera o processo aterogênico envolvem a ativação de receptores para hidrocarbonetos arila (AhR) por dibenzo-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzo-furanos policlorados (PCDF),

bifenilos policlorados co-planares (Co-PCB) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) (Kasai et al., 2006; Hanieh, 2014). Todas essas substâncias são contaminantes presentes na fumaça do cigarro, e dentre elas, as mais potentes e seletivas na ativação do AhR são a PCDD 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e o PAH benzo(a)pireno (BaP) (Marinkovic et al., 2010; Kerley-Hamilton et al., 2012). O AhR atua como fator de transcrição e está expresso em todos os tipos celulares envolvidos no processo aterogênico, incluindo células endoteliais, CMLV, monócitos/macrófagos, leucócitos e plaquetas. Em ausência de ligante, o AhR existe como complexo citosólico dimerizado a duas moléculas da chaperona proteína de choque térmico 90 (Hsp90), a uma molécula da co-chaperona de 23kDa p23, a uma molécula da proteína de interação com AhR (AIP) e a uma molécula da tirosina-quinase c-Src (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Barouki et al., 2012). Esse complexo estabiliza o AhR numa conformação de alta afinidade para ligantes, previne sua degradação proteolítica e impede sua translocação nuclear (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Barouki et al., 2012; Hanieh, 2014). Mediante interação com agonistas (como a TCDD e o BaP), o AhR libera a c-Src para o citosol, que, por sua vez, deflagra vias de sinalização não-genômicas (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010), como a ativação da montagem do complexo NAD(P)H oxidase e subsequente produção de ERO (Sampaio et al., 2007).

A interação com o ligante também induz à exposição da sequência de localização nuclear (NLS) do AhR, que permite a translocação do complexo AhR-ligante ao núcleo. Aí, a chaperona é deslocada de seu sítio de ligação pelo translocador nuclear de AhR (Arnt), que, então, se dimeriza com o AhR (Soshilov & Denison, 2008). A partir dessa interação, o heterodímero AhR/Arnt se associa com elementos responsivos a xenobióticos (XREs) no DNA, e regula a expressão de genes responsivos (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Barouki et al., 2012; Hanieh, 2014), incluindo genes que regulam a síntese de fatores pró-aterogênicos, como a enzima do citocromo P450 1A1 (CYP1A1), cuja expressão gênica (síntese de RNAm) é induzida por ativação de AhR em células vasculares (Conway et al., 2009; Majkova et al., 2011). A liberação da c-Src para o citosol, mediante ativação de AhR, culmina com o acúmulo de ERO derivadas do complexo NAD(P)H oxidase na parede vascular (Sallée et al., 2014). Somado a esse mecanismo, a indução da síntese de por ativação de AhR também leva ao estresse oxidativo endotelial (Majkova et al., 2011), uma vez que a biotransformação de coPCB, presentes na fumaça do cigarro, por CYP1A1 induz ao desacoplamento de seu ciclo catalítico, gerando ERO (Schlezinger et al., 2006). Em conjunto, as ERO geradas por ativação de AhR reduzem a produção endotelial e a biodisponibilidade vascular de NO (Sallée et al., 2014), participam da modificação oxidativa de partículas de LDL retidas na matriz (Kunitomo et al., 2009), ativam a síntese de MCP-1 em células endoteliais (Majkova et al., 2009) e induzem à migração de CMLV (Kerzee & Ramos, 2000), eventos cruciais durante o processo aterogênico (Hopkins, 2013). Por mecanismos independentes da geração de ERO, a ativação de AhR induz à expressão de ICAM-1 em células endoteliais (Osterling et al., 2008), favorecendo a ativação do fenótipo

pró-trombótico dessas células durante o 1º estágio do processo aterogênico (Hopkins, 2013).

Além disso, a ativação de AhR induz ao acúmulo de colesterol por macrófagos por induzir à expressão de interleucina 8 (IL-8) (Wu et al., 2011) e por mecanismos não-genômicos mediados por c-Src (Vogel et al., 2004), favorecendo sua diferenciação em células espumosas durante o 2º estágio do processo aterogênico (Hopkins, 2013). Por fim, a ativação de AhR induz à expressão de metaloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9) em CMLV (Meng et al., 2009), responsáveis pela migração dessas células ao espaço subendotelial para formação das lesões fibrogordurosas durante o 3º estágio do processo aterogênico (Hopkins, 2013).

A partir dessa interação, o heterodímero AhR/Arnt se associa com elementos responsivos a xenobióticos (XREs) no DNA, e regula a expressão de genes responsivos (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Barouki et al., 2012; Hanieh, 2014), incluindo genes que regulam a síntese de fatores pró-aterogênicos, como a enzima do citocromo P450 1A1 (CYP1A1), cuja expressão gênica (síntese de RNAm) é induzida por ativação de AhR em células vasculares (Conway et al., 2009; Majkova et al., 2011).

A caracterização da participação do AhR na progressão da aterosclerose induzida por exposição à fumaça de cigarro tem sido evidenciada por meio da utilização de antagonistas desses receptores. Em geral, compostos fenólicos planares, predominantemente derivados de flavonóides, exibem propriedades antagonistas sobre AhR (Henry et al., 1999). Dentre eles, os mais utilizados em ensaios funcionais são: alfa-naftoflavona (α -NF) (Wilhelmsson et al., 1994); 3'-metoxi-4'-nitroflavona (MNF) (Henry & Gasiewicz, 2008); 6,2',4'-trimetoxiflavona (TMF) (Murray et al., 2010); ácido 2-metil-2H-pirazol-3-carboxílico (2-metil-4-o-tolilazo-fenil)- amida (CH-223191) (Kim et al., 2006; Zhao et al., 2010); resveratrol (Casper et al., 1999; de Medina et al., 2005; Mohammadi-Bardbori et al., 2012); e kempferol (Ciolino et al., 1999). Entretanto, esses compostos apresentam sérias limitações em suas propriedades antagonistas, sendo as mais comuns a baixa seletividade, a presença de agonismo parcial, sendo, portanto, capazes de ativar o receptor, a tendência a biotransformação além de apresentarem propriedades citotóxicas (Casper et al., 1999; de Medina et al., 2005; Mohammadi-Bardbori et al., 2012); e kempferol (Ciolino et al., 1999).

Em conjunto, essas limitações constituem um sério problema para a caracterização do papel exercido pelo AhR na fisiopatologia do processo aterogênico, e especialmente para a padronização desses agentes como fármacos ateroprotetores em ensaios pré-clínicos e clínicos.

As limitações do antagonismo exibido pelos compostos supracitados sobre o sistema AhR devem-se à escassez de informações estruturais do domínio de interação com ligantes (ligand binding domain, LBD) desse receptor, uma vez que a análise dos eventos moleculares resultantes da interação de ligantes com o AhR requer informações estruturais tridimensionais detalhadas desse domínio, ainda não descritas (Pandini et al.,

2007).

Para o presente estudo, baseando-se nas técnicas da química medicinal computacional, foram selecionados os inibidores de AhR com atividade descrita na literatura a partir de ensaios experimentais, além da utilização de novas estruturas homólogas a família, presentes no Protein Data Bank (PDB), com o objetivo de derivar um padrão farmacofórico comum, bem como identificar os resíduos responsáveis pela atividade antagonista destas moléculas. A partir do padrão farmacofórico obtido, foi realizada uma triagem virtual em uma base de dados de 100.000 compostos naturais, e posterior aplicação de filtros farmacocinéticos e de toxicidade, além da análise do modo de ligação das moléculas resultantes as proteínas homólogas, permitindo a obtenção de 4 novas moléculas com ótimas propriedades farmacocinéticas e baixa toxicidade, bem como potencial antagonista do AhR.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de antagonistas de AhR reportados na Literatura

Para a realização deste estudo, foram recuperados dentre os 262 antagonistas reportados da base de dados **BindingDB** (em <http://www.bindingdb.org>) os 4 mais potentes, além de outros 2 antagonistas com estruturas reportadas em uma patente (Sherr et al., 2019), sendo que as estruturas dessas moléculas podem ser visualizadas na Figura 1.

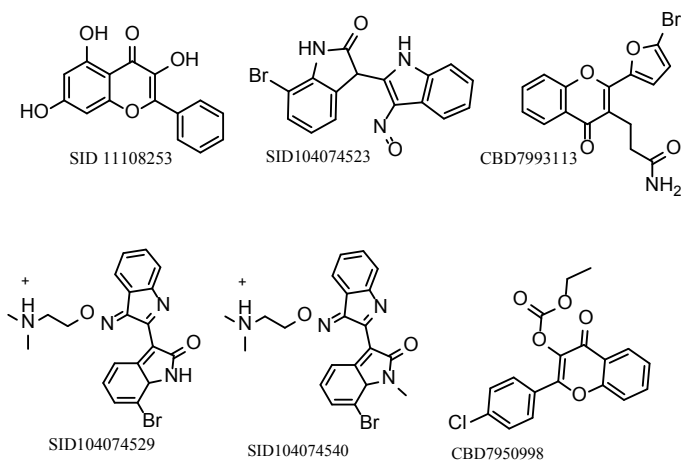


Figura 1: Estruturas de antagonistas do receptor AhR, selecionadas da literatura.

2.2 Seleção de estruturas homólogas de AhR depositadas no PDB e sobreposição dos modelos selecionado

Em uma busca feita no PDB por estruturas homólogas, foram obtidas inicialmente 14 estruturas. Destas, foram selecionadas duas delas, sendo respectivamente as estruturas PDB ID 5TBM, do domínio PAS-B de humano em complexo com um antagonista de AhR - 79A, bem como a estrutura PDB ID 6E3S, referente ao PAS-B de *Mus musculus* complexada a um agonista de AhR - HNJ401. Estas estruturas foram posteriormente sobrepostas utilizando o *software* SPDBV, e a partir da análise desse alinhamento/sobreposição, feita utilizando o *software* Maestro, foram identificados os resíduos envolvidos somente na interação com o agonista - o resíduo de Tirosina 278, com uma interação *pi-stacking* com o ligante, bem como os resíduos que se ligam somente ao antagonista, no caso correspondendo ao resíduo de Histidina 293, com uma Ligação de Hidrogênio com o respectivo ligante. Também foi identificado que ambos os ligantes interagem com o resíduo de Fenilalanina 254, por meio de uma interação de natureza *pi-stacking*, importante para posicionar/ancorar as moléculas na cavidade/bolsão hidrofóbico do receptor. Esse detalhamento pode ser observado na Figura 2.

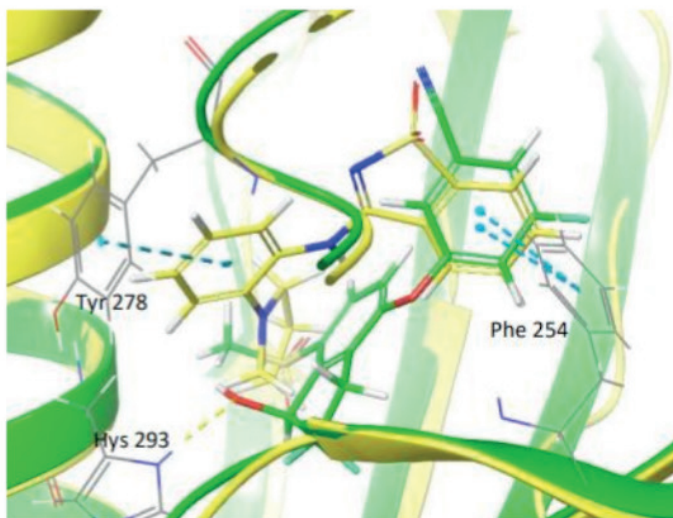


Figura 2: Sobreposição do Antagonista 79 A, (representado em amarelo, na forma de *stick*), ao agonista HNJ 401, em verde, mostrando os resíduos de AhR (em Diagrama *Ribbons*) importantes nas interações.

2.3 Docking de ligantes selecionados para obtenção do potencial modo de ligação

Os ligantes selecionados da literatura foram submetidos a um estudo de *docking*, utilizando o *software* GOLD, para obtenção das poses (conformação + posição) de menor energia, que seriam utilizadas posteriormente para o cálculo do padrão farmacofórico. Para o estudo de *docking* desta etapa, foi definida uma esfera de 7 Å, com as coordenadas sendo (X: - 4,93 ; Z: 7,20; Y: 3,93), utilizando o complexo PDB ID 5TBM para os cálculos. As poses de maior score (ou de menor energia de interação proteína-ligante) foram classificadas a partir da função ChemPLP do GOLD, e podem ser vistas a partir da Tabela 1.

Moléculas	Gold (ChemPLP)	Score
SID104074540	61.476	
SID104074523	53.621	
SID104074529	51.684	
SID11108253	45.776	
CBD7993113	41.595	
CBD7950998	39.980	

Tabela 1: Escores de docking dos antagonistas de Ahr selecionados a partir da literatura.

2.4 Derivação do padrão farmacofórico

As poses de maior escore obtidas do *docking* realizado com o *software* GOLD 4.1, foram utilizadas como *input* no *software* Discovery Studio 4.0, em conjunto com o inibidor cristalográfico do complexo PDB ID 5TBM, para a derivação de um padrão farmacofórico comum entre as estruturas. Com o Discovery Studio se realiza a sobreposição dessas estruturas baseada em características químicas em comum entre os grupamentos ativos e subestruturas, os quais serão classificados como *features*.

2.5 Triagem virtual na base de dados ZINC Naturals, utilizando o padrão farmacofórico gerado

A partir do padrão farmacofórico gerado, este primeiramente foi refinado utilizando o *software* Discovery Studio 4.0, e o modelo cristalográfico PDB ID 5TBM, promovendo uma melhor orientação aos *features* gerados, com o intuito de permitir uma melhor complementariedade com relação aos aminoácidos da cavidade catalítica do receptor. Após esse ajuste, o padrão farmacofórico foi então utilizado para uma triagem virtual na base de dados ZINC Naturals, que contém 100.000 compostos, em busca de estruturas que apresentassem maior coincidência/ajuste ao farmacóforo utilizado.

2.6 Aplicação de filtros ADMETox aos compostos oriundos da triagem virtual

Os compostos que foram recuperados da base de dados ZINC Naturals passaram por uma série de filtros para a obtenção das moléculas com melhores propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas bem como baixa toxicidade. A intenção nesta etapa é a obtenção de moléculas que possam ser classificadas como *hits*, os quais tenham capacidade de prosseguirem nos estudos sem apresentar posteriores propriedades indesejadas. Para a análise das propriedades ADME, ou seja: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção, foi utilizado o *software* QikProp, enquanto que para a análise das propriedades de toxicidade, sendo elas, mutagênicidade, hepatotoxicidade, carcinogênicidade e teratogenicidade, foi empregado o *software* DEREK 2.0.

2.7 Docking das moléculas resultantes da triagem, após aplicação dos filtros ADME/Tox

Por fim, as moléculas que restaram (ou “sobreviveram”) da triagem virtual, e após passarem pelos filtros ADME/Tox, foram inseridas no *software* GOLD, para realização de um estudo de *docking*, utilizando a estrutura cristalográfica PDB ID 5TBM para tal, com o intuito de avaliar como essas moléculas se ligam ao receptor, se realizam interações importantes com o resíduo que liga antagonistas, procurando portanto eliminar moléculas que tenham potencial de se ligarem a resíduos da região que liga agonistas e que iriam causar indesejável ativação do receptor.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padrão farmacofórico obtido

O padrão farmacofórico obtido com auxílio do *software* Discovery Studio apresentou 3 *features*: um hidrofóbico, derivado de uma região em comum às estruturas utilizadas para o cálculo, que são compostas por grupamentos apolares, tais como anéis aromáticos. O outro *feature* se apresentou como aromático, também em virtude dessas estruturas terem como característica a presença de um grupo aromático necessário para a estabilização da molécula na cavidade catalítica, com interação de natureza *pi-stacking* com o resíduo de Fenilalanina 254. Por último, há a presença do *feature* referente a um grupo aceitador de Ligação de Hidrogênio, que corresponde aos grupos carbonila e hidroxila que essas moléculas apresentam, tendo correspondência quando realizamos a análise da cavidade catalítica do modelo cristalográfico PDB ID 5TBM, onde vemos que existe um resíduo de Histidina 293, que atua como doador de Ligação de Hidrogênio para o inibidor cristalográfico 79 A, e portanto é um requisito fundamental para essas moléculas que realizem interação com esse resíduo. Os *features* obtidos podem ser vistos na Figura 3, em sobreposição às estruturas utilizadas para a sua obtenção.

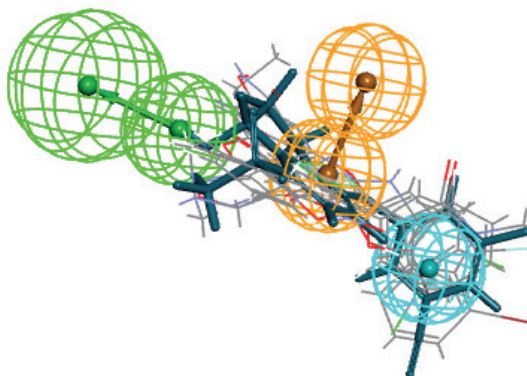


Figura 3: *Features* derivados com o *software* Discovery Studio, em fase com as moléculas utilizadas para sua obtenção, onde as esferas verdes com o vetor apontando na direção oposta correspondem ao grupo aceitador de Ligação de Hidrogênio, enquanto que as esferas laranjas correspondem ao grupamento aromático, e a esfera azul a um grupamento hidrofóbico.

3.2 Triagem virtual na base de dados ZINC Naturals, utilizando o padrão farmacofórico gerado

A partir do padrão farmacofórico obtido, composto por 3 *features*, sendo eles respectivamente um grupo aceitador de Ligação de Hidrogênio, um grupo aromático e um grupo hidrofóbico, foi realizada a triagem virtual na base de dados ZINC Naturals, e dos 100.000 compostos que compõe a base, 87.000 foram recuperados. Logo, o padrão farmacofórico não conseguiu, de fato, fazer grande distinção entre os compostos ali contidos, aumentando a importância das etapas subsequentes da aplicação de filtros ADME/Tox e de estudos de *docking*.

3.3 Aplicação de filtros ADME/Tox aos compostos oriundos da triagem virtual e docking dos melhores candidatos

A partir dos 87.000 compostos que foram recuperados da triagem baseada em padrão farmacofórico, foram aplicados uma série de filtros com o intuito de, ao final do estudo, se obter apenas as moléculas que se mostrassem mais promissoras (*in silico*). O primeiro filtro aplicado, o do *software* Discovery Studio, se trata do valor absoluto de *fit value*, que faz menção ao quão bem uma determinada molécula se encaixa/ajusta ao padrão farmacofórico proposto para a triagem. As 1.000 estruturas de maior escore foram selecionadas para as etapas seguintes, eliminando, portanto, 86.000 compostos. Ainda no mesmo *software*, foi aplicado o filtro de peso molecular, com o intuito de selecionar moléculas com valores menores do que 370 Da. Foram, portanto, selecionadas 270

moléculas, eliminando mais 730. A partir disso, essas moléculas resultantes foram avaliadas quanto às suas propriedades toxicológicas com auxílio do *software* DEREK, com o intuito de analisar propriedades como toxicidade das estruturas, tais como hepatotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, restando 113 moléculas. Após isso, essas moléculas foram avaliadas com o *software* QikProp, investigando suas propriedades farmacocinéticas (ADME), onde foram avaliados: % Human Oral Absorption, que diz respeito à capacidade da molécula de ser absorvida por via oral em humanos, com um valor aceitado acima de 80%; Log P, referente à lipofilicidade das moléculas, importante propriedade na absorção das mesmas por via oral, sendo aceitos valores acima de 1,5 e menores que 5; bem como as propriedades de permeabilidade celular, representadas pelos parâmetros QPLog CACO e QPLog MDCK, com valores considerados ótimos acima de 500. Desta análise, resultaram 4 estruturas com ótimo perfil farmacocinético em potencial, estando essas propriedades descritas na Tabela 2.

Estrutura	%HOA	Log P	QPLog MDCK	QPLog CACO
ZINC04025918	100	3,37	3505	3287
ZINC32123930	100	1,54	1165	1238
ZINC72325083	100	3,85	1475	2748
ZINC85877814	100	2,68	2359	2678

Tabela 2: Propriedades Farmacocinéticas das 4 moléculas selecionadas da triagem virtual

Essas 4 moléculas foram finalmente submetidas a estudos de *docking*, utilizando a estrutura cristalográfica PDB ID 5TBM, sendo analisado o modo de ligação das mesmas no receptor, com o intuito de estabelecer se havia concordância com o inibidor cristalográfico 79A. A estrutura 2D dessas moléculas estão representadas na Figura 4.

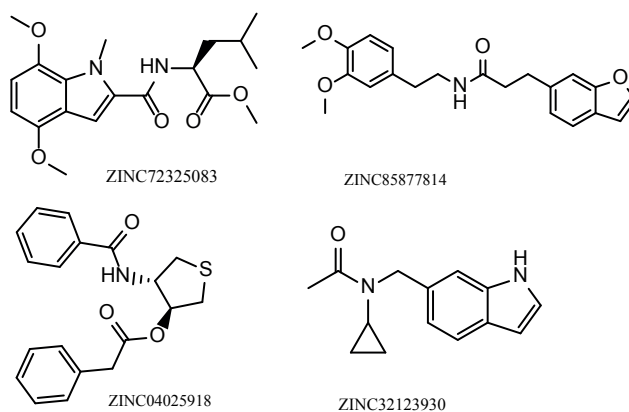


Figura 4: Estruturas 2D das moléculas selecionadas na triagem virtual

Com a realização do *docking* dessas moléculas, foi possível observar que elas mantêm concordância conformacional ao inibidor cristalográfico, interagindo com a região onde está contido o resíduo que liga somente antagonistas - a Histidina 293, não realizando nenhuma interação com o resíduo que liga agonistas - a Tirosina 278, ou com outro resíduo próximo a ele. As conformações das estruturas selecionadas bem como sua sobreposição ao inibidor cristalográfico no sítio catalítico da estrutura cristalográfica PDB ID 5TBM pode ser observada na Figura 5.

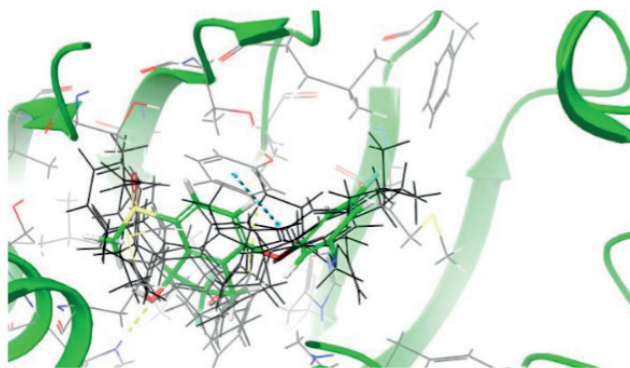


Figura 5: Inibidor cristalográfico (representado em *balls and stick*, na cor verde) sobreposto às moléculas oriundas da triagem virtual (representadas em *stick*, na cor preta), no sítio catalítico da estrutura cristalográfica PDB ID 5TBM, aqui utilizada como referência.

4 | CONCLUSÃO

As técnicas de Química Medicinal Computacional se provaram eficientes para a realização de triagem virtual na busca por novas moléculas capazes de antagonizar o AhR, possibilitando o descobrimento de 4 novas estruturas, em potencial, que apresentaram excelentes propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas bem como baixa toxicidade (*in silico*), devendo agora serem testadas em ensaios biológicos *in vitro*, afim de ser possível realizar a validação experimental de seu potencial inibitório, de fato, além de guiar os próximos passos no planejamento de novos e futuros antagonistas de AhR, com potencial eficácia ateroprotetora em fumantes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à FAPESP pelo financiamento do projeto, bem como à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo laboratório cedido para a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Abel J, Haarmann-Stemmann T. **An introduction to the molecular basis of aryl hydrocarbon receptor biology.** *Biol Chem*, 391, 1235-1248, 2010

Barouki R, Aggerbeck M, Aggerbeck L et al. **The aryl hydrocarbon receptor system.** *Drug Metab Drug Interact*, 27, 3-8, 2012.

Casper RF, Quesne M, Rogers IM et al. **Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity.** *Mol Pharmacol*, 56, 784-790, 1999.

Collman GW, Lundgren K, Shore D et al. **Effects of α -naphthoflavone on levels of sister chromatid exchanges in lymphocytes from active and passive cigarette smokers: dose-response relationships.** *Cancer Res*, 46, 6452-6455, 1986

Ciolino H, Daschner PJ, Yeh GC. **Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially.** *Biochem J*, 340, 715-722, 1999.

Conway DE, Sakurai Y, Weiss D et al. **Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress.** *Cardiovasc Res*, 81, 669- 677, 2009.

Doll R, Peto R. **Mortality in relation to smoking: 20 years' observation on male British doctors.** *Br Med J*, 2, 1525-1536, 1976.

de Medina P, Casper R, Savouret J-F et al. **Synthesis and biological properties of new stilbene derivatives of resveratrol as new selective aryl hydrocarbon modulators.** *J Med Chem*, 48, 287-291, 2005.

Doll R, Grey R, Hafner B et al. **Mortality in relation to smoking: 20 years' observation on female British doctors.** *Br Med J*, 2, 967-971, 1980.

Glantz SA, Parmley WW. **Passive smoking and heart disease: epidemiology, physiology, and biochemistry.** *Circulation*, 83, 1-12, 1991.

Hopkins PN. **Molecular biology of atherosclerosis.** *Physiol Rev* 93, 1317-1542, 2013.

Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. **Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins.** *Proc Nat Acad Sci USA*, 78, 6499-6503, 1981.

Helliövaara M, Karvonen MJ, Vilhunen R et al. **Smoking, carbon monoxide, and atherosclerotic diseases.** *Br Med J*, 1, 268-270, 1978.

Hughson WG, Mann JI, Garrod A. **Intermittent claudication: prevalence and risk factors.** *Br Med J*, 1, 1379-1381, 1978.

Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL et al. **Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.** *JAMA*, 279, 119-124, 1998.

Henry EC, Gasiewicz TA. **Molecular determinants of species-specific agonist and antagonist activity of a substituted flavones towards the aryl hydrocarbon receptor.** Arch Biochem Biophys, 472, 77-88, 2008.

Hanieh H. **Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends.** Biomed Research International, 2014, 14 pages, 2014.

Henry EC, Kende AS, Rucci G et al. **Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation.** Mol Pharmacol, 55, 716-725, 1999.

Kunitomo M, Yamaguchi Y, Kagota S et al. **Biochemical evidence of atherosclerosis progression mediated by increased oxidative stress in apolipoprotein E-deficient spontaneously hyperlipidemic mice exposed to chronic cigarette smoke.** J Pharmacol Sci, 110, 354-361, 2009.

Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K et al. **High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing.** Cancer Res, 66, 7143- 7150, 2006

Kerley-Hamilton JS, Trask HW, Ridley CJA et al. **Inherent and benzo[a]pyrene- induced differential aryl hydrocarbon receptor signaling greatly affects life span, atherosclerosis, cardiac gene expression, and body and heart growth in mice.** Toxicological Sciences, 126, 391-404, 2012.

Kim S-H, Henry EC, Kim D-K et al. **Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3- carboxylic acid (2- methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8- TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor.** Mol Pharmacol, 69, 1871-1878, 2006.

Kerzee JK, Ramos KS. **Activation of c-Ha-ras by benzo(a)pyrene in vascular smooth muscle cells involves redox stress and aryl hydrocarbon receptor.** Mol Pharmacol, 58, 152-158, 2000.

Little WC, Constantinescu M, Applegate RJ et al., **Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease?** Circulation, 78, 1157-1166, 1988.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. **Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.** Nature 473, 317-325, 2011.

Ministério da Saúde. **Cadernos de Informação de Saúde.** Brasil, 2010.

Mendis S, Puska P, Norrving B. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control Organization,** Geneva, 2011.

Maiolino G, Rossitto G, Caielli P et al., **The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts.** Mediators of Inflammation, 2013, 13 pages, 2013

Marinkovic N, Pasalic D, Ferencak G et al. **Dioxins and human toxicity.** Arh Hig Rada Toksikol, 61, 445-453, 2010.

Majkova Z, Smart E, Toborek M et al. **Up-regulation of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 by coplanar PCB77 is caveolin-1-dependent.** Toxicol Appl Pharmacol, 237, 1-7, 2009.

Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U et al. **Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR)**. *Chem Res Toxicol*, 25, 1878-1884, 2012.

Meng D, Lv D-D, Zhuang X et al. **Benzo[a]pyrene induces expression of matrix metalloproteinases and cell migration and invasion of vascular smooth muscle cells**. *Toxicology Letters*, 184, 44-49, 2009.
39.

Murray IA, Flaveny CA, DiNatale BC et al. **Antagonism of aryl hydrocarbon receptor signaling by 6,2',4'-trimethoxyflavone**. *J Pharmacol Exp Ther*, 332, 135-144, 2010.

Oesterling E, Toborek M, Hennig B. **Benzo[a]pyrene induces intercellular adhesion molecule-1 through a caveolae and aryl hydrocarbon receptor mediated pathway**. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232, 309-316, 2008.

Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM et al. **Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate**. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 471-478, 1993.

Piegas LS, Avezum A, Pereira JC et al. **Risk factors for myocardial infarction in Brazil**. *Am Heart J*, 146, 331-338, 2003.

Pandini A, Denison MS, Song Y et al. **Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis**. *Biochemistry*, 46, 696-708, 2007.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **IV diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose**. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88 (Suppl I), 2007.

Sampaio WO, de Castro CH, Santos RAS et al. **Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells**. *Hypertension*, 50, 1093-1098, 2007.

Soshilov A, Denison MS. **Role of the Per/Arnt/Sim Domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor**. *J Biol Chem*, 283, 32995-33005, 2008.

Sallée M, Dou M, Cerini C et al. **The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease**. *Toxins*, 6, 934-949, 2014.

Schlezinger JJ, Struntz WD, Goldstone JV et al. **Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners**. *Aquat Toxicol*, 77, 422-432, 2006.

Sprague AH, Khalil RA. **Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease**. *Biochem Pharmacol* 78, 539-552, 2009.

Skalén K, Gustafsson M, Rydberg EK et al. **Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis**. *Nature*, 417, 750-754, 2002.

Sherr IDH, Roxbury W, Pollastri M, and J. Schlezinger, “(12) United States Patent,” vol. 2, 2019.

Tabas I, Williams KJ, Borén J. **Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.** *Circulation*, 116, 1832-1844, 2007.

Vogel CFA, Sciuolo E, Matsumura F. **Activation of inflammatory mediators and potential role of Ah-receptor ligands in foam cell formation.** *Cardiovasc Toxicol*, 4, 363-373, 2004.

Wilhelmsson A, Whitelaw ML, Gustafsson J-A et al. **Agonistic and antagonistic effects of α -naphthoflavone on dioxin receptor function.** *J Biol Chem*, 269, 19028- 19033, 1994.

Wu D, Nishimura N, Kuo V et al. **Activation of aryl hydrocarbon receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1260-1267, 2011.

Xanthoulea S, Thelen M, Pöttgens C et al. **Absence of p55 TNF receptor reduces atherosclerosis but has no major effect on angiotensin II induced aneurysms in LDL receptor deficient mice.** *PLOS One* 4, e61113, 2009.

Zhao B, DeGroot DE, Hayashi A et al. **CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (dioxin) receptor.** *Toxicol Sci*, 117, 393-403, 2010.

CAPÍTULO 11

IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM GEL DE ALGINATO E PECTINA

Data de aceite: 01/04/2021

Layla de Fátima Gonçalves

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Sabrina de Ávila Rodrigues

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Ponta Grossa, Paraná, Brasil

RESUMO: Este artigo aborda uma versão laboratorial do processo fermentativo alcoólico de escala industrial. Utilizando-se das propriedades químicas de gelificação e encapsulação, duas substâncias foram testadas a fim de formar cápsulas em gel com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram testadas 3 concentrações de alginato 2%, 3% e 4% e concentrações de pectina 0,2%, 0,1%, 0,001% para o aprisionamento das células de *Saccharomyces cerevisiae*. As cápsulas contendo as células imobilizadas foram inoculadas em meio sintético e incubadas a 28°C por 12 dias. O acompanhamento do processo fermentativo foi realizado através da medida o °Brix das amostras diariamente. Como resultados, obteve-se que a pectina influenciou negativamente na formação e aparência das cápsulas, porém a velocidade do consumo de açúcares durante o processo não foi afetada. Somado à isto, conclui-se que o alginato apresenta melhor manipulação para a formação de cápsulas, e sua porcentagem mais adequada para o processo é a de 4%.

PALAVRAS - CHAVE: *Saccharomyces*

cerevisiae. Cápsulas. Fermentação.

YEASTS IMMOBILIZATION IN ALGINATE AND PECTIN GEL

ABSTRACT: This article addresses a laboratory version of the alcoholic fermentation in industrial scale. Using the chemical properties of gelling and encapsulation, two chemical substances were tested in use to form capsules in gel with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Three concentrations of alginate 2%, 3% and 4% and pectin 0.2%, 0.1% and 0.001% were evaluated for the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells. The capsules containing the immobilized cells were inoculated in synthetic medium and incubated at 28°C for 12 days. The fermentation processes was monitored by measuring the °Brix of the samples daily. It is possible to conclude that pectin had a negative influence on the formation and appearance of capsules, however the speed of sugar consumption during the process was not affected.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*. Capsules. Fermentation.

INTRODUÇÃO

Os processos de fermentação alcoólica, de modo geral, são conduzidos por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* disponibilizadas livremente no meio fermentativo. Existem outras formas de condução deste tipo de processo que consistem em aprisionar a levedura em gel poroso. Chamado de encapsulação em matriz

porosa, aplica-se este para trânsito de micro-organismos sem que sejam danificados ou danifiquem o meio externo. Pode ser utilizado qualquer material que apresente capacidade de gelificação, tais como alginato de sódio e pectina (KOVALESKI, 2019).

O alginato de sódio é solúvel em água e se torna insolúvel na presença de cátions bivalentes (GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETI, U., DA SILVA, A. N., 2007), como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , por isso o gotejamento em cloreto de cálcio para o processo de encapsulação celular. Assim, é formado um gel irreversível, que não retorna ao estado líquido com o calor, constituindo uma película esférica porosa. As suas principais aplicações biotecnológicas são biossorções de locais contaminados.

Pectinas são hidrocoloides naturais presentes em plantas superiores que formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido. A pectina também é determinante na firmeza dos vegetais, característica que se estabelece durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (PAIXÃO, LIMA, e PAIVA, 2009). Suas principais aplicações biotecnológicas estão na indústria de cosméticos e alimentícia devido à sua função aglutinante favorecedora à formação de géis.

O método de aprisionamento das células microbianas em gel é o mais utilizado pela sua facilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de retenção celular (GIESE, 2015). Como pode-se utilizar de pectinas para esse processo, o custo também diminui, sabendo-se que estas advêm de plantas.

Dentro de cada cápsula, as leveduras estarão realizando fermentação alcoólica, a fim de gerar energia para seus processos metabólicos. Com isso, terá a formação de CO_2 e etanol. Para garantir que tudo ocorra conforme o desejado, é necessário analisar quais as condições ótimas dessa levedura específica.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da concentração de alginato e pectina na formação das cápsulas e consumo de sacarose no processo fermentativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

As leveduras empregadas neste processo foram *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada marca comercial Fleshman. Para o preparo das leveduras estas foram pesadas (10,034 g) em balança analítica em béquer com capacidade para 250mL e hidratadas com 100mL de água destilada estéril durante 1 hora, antes de serem adicionadas às soluções para encapsulação.

Foram realizados dois experimentos de encapsulação: o primeiro utilizando alginato de sódio (2%,3% e 4%) e o segundo utilizando pectina (0,2%, 0,1%, 0,001%). Para imobilização das leveduras, os procedimentos foram adaptados dos descritos por Kovaleski (2019).

O alginato de sódio foi pesado (3,027g; 4,027g e 2,019g) em 3 diferentes béqueres de 100ml e adicionados à 100ml de água destilada estéril, previamente medida em balão volumétrico para cada béquer. A dissolução foi efetuada em banho maria.

O preparo do meio de cloreto de cálcio foi realizado pesando 2,015g do reagente em béquer de 500ml e misturando com 100ml de água destilada, previamente medida em balão volumétrico. A solução foi autoclavada à 121°C por 15 minutos. Cada solução foi preparada seis vezes, sendo três para encapsulação das amostras de alginato e três para pectina. Todas as soluções foram mantidas refrigeradas até o momento do uso.

Para a formação das cápsulas, foram misturados 20ml da solução de levedura em cada uma das soluções de alginato. O frasco contendo a solução de cloreto de cálcio foi posicionado sobre agitador magnético e, sob constante agitação, foi feito o gotejamento da mistura das soluções de alginato + levedura na solução de cloreto de cálcio, para cada uma das três concentrações. Para controle do gotejamento foi utilizada bomba peristáltica acoplada ao equipamento Lab Plant SD-05.

As soluções de pectina foram preparadas de modo similar ao preparo das soluções de alginato, respeitando as proporções em estudo. Assim como o processo de obtenção das cápsulas, também seguiu o mesmo procedimento de gotejamento da solução pectina + levedura em solução de cloreto de cálcio. Ambas as cápsulas foram mantidas refrigeradas até formação do meio sintético.

Após a obtenção das cápsulas, foi realizado processo fermentativo em meio sintético (42g de sacarose, 1,5g de extrato de levedura, 0,21g de $MgSO_4$, 0,36g de NH_4Cl e 0,285g de KH_2PO_4 em 300mL de água destilada - pH final 4,5) esterilizado a 121°C por 15 minutos.

As cápsulas obtidas nos seis processos descritos anteriormente foram inoculadas em Erlenmeyer contendo o meio acima descrito, assim como uma amostra controle foi conduzida com as leveduras livres. Os frascos foram incubados em estufa com controle de temperatura a 28°C.

Para acompanhamento do processo fermentativo, foi realizada a medida do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) no início da fermentação e a cada 24 horas durante 5 dias. No desenvolvimento dos resultados, foi plotado um gráfico com os dados obtidos durante o processo fermentativo. Assim, somando este à teoria sobre os compostos químicos presentes e as diferenças entre os Brix de diferentes concentrações, pode-se avaliar as melhores referências para realizar o método em escala industrial.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em todas as amostras analisadas foi possível constatar a viabilidade das leveduras, ou seja, o processo de encapsulação não provocou a inativação celular. O °Brix inicial das amostras apresentava-se em torno de 13°Brix após os primeiros dias de fermentação. Todas apresentaram queda expressiva deste valor, atingindo valores próximos a 4°Brix.

Percebe-se queda constante no valor do BRIX em todas as concentrações de alginato (Gráfico 1) e pectina.

Além da constância apresentada, o gel de 4% de alginato também foi o que obteve menores valores de °Brix no final do processo, indicando melhor rendimento em relação aos demais.

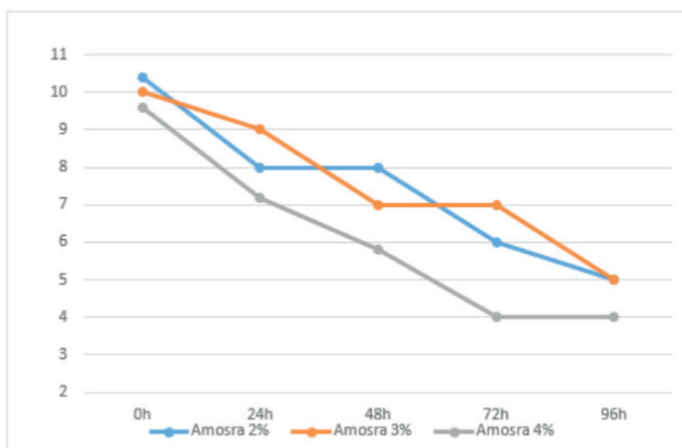


Gráfico 1. Valores de °Brix das amostras de caldo fermentado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* immobilizadas em diferentes concentrações (2%, 3% e 4%) de gel de alginato de cálcio.

Fonte: Autoria própria.

Quanto maior a concentração de alginato no gel, mais moléculas ficam concentradas naquele mesmo meio, gerando menor porosidade da capsula. Assim, a levedura fica com menor difusão de oxigênio, obrigando-a a entrar para o método fermentativo. Somado a isto, tem-se o fato de que a matriz gélica protege o microrganismo de todos os cátions, ânions e outros eletrólitos utilizados no meio sintético (KOVALESKI, 2019).

Quanto à pectina, seu uso isolado como agente encapsulante não resultou na formação de esferas homogêneas (Figura 1). Levando em consideração sua composição química, a estrutura deste composto pode ser extremamente heterogênea entre as espécies de vegetais, entre tecidos e até mesmo partes do fruto de onde é proveniente. Isso interfere no controle de sua absorção e porosidade (PAIXÃO et al., 2009)



Figura 1. Aparência das cápsulas feitas com gel de pectina após dois dias em estufa.

Fonte: Autoria própria.

As amostras testadas neste experimento com imobilização em pectina apresentaram rápido consumo de açúcares, atingindo o máximo de consumo em 24 horas - fato este que pode ser desfavorável dependendo do processo onde é aplicado, já que o tempo rápido de fermentação favorece a formação alcoólica, porém não a de compostos secundários que contribuem com formação de aroma e sabor (CARVALHO, 2017).

Nas próximas etapas desta pesquisa está previsto a análise da interação de alginato com pectina em diferentes concentrações, assim como a verificação da influência dos parâmetros fermentativos na resistência e durabilidade das capsulas. O uso de leveduras selecionadas e a aplicação em processo fermentativo para obtenção de bebida alcoólica com posterior caracterização físico-química e sensorial, a ser submetida ao comitê de ética da UTFPR.

CONCLUSÕES

Foi possível promover a imobilização da *Saccharomyces cerevisiae* em géis de alginato e de pectina mantendo a viabilidade celular. As cápsulas obtidas foram aplicadas em processos fermentativos com consumo de até 70% da sacarose.

Apesar de possibilitar a imobilização, a pectina formou imobilizados de aparência disforme diferentemente das esferas obtidas com alginato.

A imobilização em gel de alginato de sódio a 4% apresentou maior consumo de açúcares comparado às demais amostras no processo fermentativo.

Em função da suspensão das atividades presenciais na UTFPR, em decorrência da pandemia, não foi possível concluir todas as atividades previstas no plano de trabalho do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio moral e financeiro durante toda a minha caminhada escolar para que eu chegasse até aqui, especialmente à minha mãe e irmãs. Agradeço também à Professora Doutora Sabrina, pela oportunidade concedida, e minhas colegas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, R. F. **Fermentação alcoólica**. Disponível em: <http://revistaeletronicadequimica.blogspot.com/2010/05/fermentacao-alcoolica.html>. Acesso em: 25 jul. 2020.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de microrganismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. *Série Tecnológica Ambiental CETEM*, p. 47, 2015.

INTRUTEMP. **O que é o refratômetro**. 2020. Disponível em: [https://instrutemp.com.br/o-que-e-refratometro/#:~:text=Refrat%C3%B4metro%20\(Pt\)%20ou%20refrat%C3%B4metro%20\(,refra%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20subst%C3%A2ncia%20transl%C3%BAcida.&text=O%20uso%20mais%20comum%20de,preparados%2C%20mel%20e%20outros%20alimentos.](https://instrutemp.com.br/o-que-e-refratometro/#:~:text=Refrat%C3%B4metro%20(Pt)%20ou%20refrat%C3%B4metro%20(,refra%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20subst%C3%A2ncia%20transl%C3%BAcida.&text=O%20uso%20mais%20comum%20de,preparados%2C%20mel%20e%20outros%20alimentos.) Acesso em: 25 jul. 2020

KOVALESKI, G. **Estudo de imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

MONTEIRO, R. F. G., ***Saccharomyces cerevisiae* – O modelo**. Disponível em: <http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/micologia/genetica-e-biologia-molecular-de-fungos/saccharomyces-cerevisiae-o-modelo/> Acesso em: 25 jul. 2020

PAIXÃO, J. A., LIMA, M. S., PAIVA, E. P., **Pectina: Propriedades químicas e importância da parede celular de frutos durante o processo de maturação** - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2009.

GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETI, U., DA SILVA, A. N., **Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto - SP, Brasil, 2007.

CAPÍTULO 12

CONTRACEPTIVOS ORAIS COMBINADOS E A BIOLOGIA DA INSULINA

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 18/02/2021

Janaina de Oliveira Chaves

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0002-6062-8938

Cremilda do Amaral Roso de Oliveira

Universidade Estácio de Sá
Teresópolis, RJ.
ORCID: 0000-0003-1672-2166

Helene Nara Henriques Blanc

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus UFRJ-Macaé
Macaé, RJ.
ORCID: 0000-0001-5729-9785

Rosane Aparecida Ribeiro

Universidade Estadual de Ponta Grossa
Ponta Grossa, PR.
ORCID: 0000-0003-0839-8124

RESUMO: Os contraceptivos hormonais surgiram no século passado como alternativa eficaz para o planejamento da gravidez. As diferentes formulações utilizam estrogênios e progestinas sintéticos, isolados ou combinados com o objetivo de manter constante a concentração circulante destes esteroides sexuais femininos, inibir a secreção pulsátil dos hormônios gonadotróficos, e consequentemente, a ovulação. O contraceptivo oral combinado (COC) se destaca como método

de escolha entre as usuárias. Porém com o passar das décadas, observações clínicas proveram informações importantes de que a utilização prolongada dos esteroides sexuais sintéticos pode estar relacionada com o maior risco ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, hipertensão, prejuízos hemostáticos, resistência à insulina e intolerância à glicose. A insulina é o hormônio essencial para a manutenção da homeostase da glicose e de outros nutrientes. Os esteroides sexuais regulam a secreção de insulina e a sensibilidade ao hormônio nos tecidos-alvo. Contudo, as ações dos COCs sobre os processos envolvidos na biologia do hormônio insulina ainda são pouco explorados. Esta revisão discute as principais formulações de COCs, e as ações dos estrogênios e progestinas endógenos e sintéticos sobre a secreção, ação e metabolismo da insulina.

PALAVRAS - CHAVE: Contraceptivo hormonal, Estrogênio, Pâncreas Endócrino, Progesterona, Homeostase da glicose.

COMBINED ORAL CONTRACEPTIVES AND THE INSULIN BIOLOGY

ABSTRACT: Hormonal contraceptives have emerged in 20th century as an effective alternative for pregnancy planning. Isolated or combined synthetic estrogens and progestin are used in the different pharmaceutical formulations. The maintenance of circulating concentration of synthetic sex steroids inhibits the pulsatile secretion of gonadotrophic hormones, and consequently, the ovulation. The combined oral contraceptive (COC) stands out as a method of choice among users. However, over the

decades, clinical observations have provided important information that prolonged use of synthetic steroids may be related to the increased risk to some types of cancer, hypertension, thromboembolism, insulin resistance and glucose intolerance. Insulin is an essential hormone for nutrient homeostasis. Sex steroids regulate insulin secretion and sensitivity. However, the actions of COCs on insulin biology are still little explored. This review discusses the main formulations of COCs, and the actions of endogenous and synthetic estrogens and progestins on insulin secretion, action and metabolism.

KEYWORDS: Hormonal contraception, Endocrine pancreas, Estrogen, Glucose homeostasis, Progesterone.

1 | INTRODUÇÃO

A inserção progressiva da mulher no mercado de trabalho estimulou o desenvolvimento de métodos para o planejamento familiar. Assim, os contraceptivos hormonais proporcionaram o controle da natalidade de forma segura e reversível. O mercado disponibiliza diferentes formas farmacêuticas de contraceptivos hormonais, como os comprimidos (ou pílula), anéis vaginais, adesivos transdérmicos, implantes subdérmicos, formas injetáveis e dispositivos intrauterinos (DE LEO et al., 2016; FEBRASGO, 2015). Porém, apesar da escolha do método ser individual, ela só deve ser utilizada após avaliação e orientação criteriosa de um profissional de saúde.

Os contraceptivos hormonais utilizam compostos sintéticos derivados dos hormônios esteroides sexuais femininos, estrogênio e progesterona (P4), que podem ser encontrados de forma combinada ou isolada. Em 2019, 151 milhões de mulheres em idade reprodutiva (de 15 a 49 anos) no mundo faziam uso de contraceptivos orais (UNITED NATIONS, 2019). No Brasil, estima-se que entre 2013-2014, 28,5% da população feminina em período fértil adotou o uso desta formulação (FARIAS et al., 2016). Embora seja o método contraceptivo com menor taxa de insatisfação, a utilização prolongada de alguns tipos de contraceptivos orais combinados (COCs) tem sido relacionada ao aumento do risco à alguns tipos de câncer, às doenças cardiovasculares (BRITO; NOBRE; VIEIRA, 2011; DE LEO et al., 2016), à resistência à insulina e intolerância a glicose (GODSLAND et al., 1992; JANDRAIN et al., 1990; SCHEEN et al., 1993).

Além das ações clássicas dos esteroides sexuais femininos para a promoção e manutenção da capacidade reprodutiva e das características sexuais secundárias, estes hormônios regulam o metabolismo intermediário por ações diretas e indiretas. Neste contexto, tanto os estrogênios quanto a P4 regulam a secreção, ação e/ou *clearance* da insulina (ALONSO-MAGDALENA et al., 2008; BRYZGALOVA et al., 2006; HAMPTON et al., 2018; LEE et al., 2020; MUSATOV et al., 2007; PICARD et al., 2002; SANTOS et al., 2016; SIMONCINI et al., 2000; WADA et al., 2010). Quando um ou mais desses processos da biologia da insulina são prejudicados, há a ruptura da homeostase da glicose e de outros nutrientes e desenvolvimento de condições como a resistência à insulina e/ou intolerância

à glicose que podem culminar com o desenvolvimento do *Diabetes Mellitus* do tipo 2 (LEE et al., 2013; MARINI et al., 2013; PETERSEN; SHULMAN, 2018). Contudo, ainda é pouco explorado se a manutenção da concentração de estrogênios e progestinas sintéticas no organismo das usuárias de COC, podem promover prejuízos sobre a secreção e/ou ação da insulina. Desta forma, esta revisão da literatura discute as principais formulações de COCs, as ações dos estrogênios e progestinas endógenos e sintéticos sobre a secreção, ação e metabolismo da insulina.

2 | HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS FEMININOS E SEUS RECEPTORES

Nas mulheres os estrogênios: 17 β -estradiol (E2) e estrona são sintetizados a partir do colesterol pelos ovários e em pequenas quantidades no tecido adiposo e córtex da suprarrenal. A ação hormonal clássica dos estrogênios é relacionada às isoformas α e β do receptor de estrogênio (ER α e ER β). Após a interação do estrogênio aos ERs, estes dimerizam e no núcleo se ligam a regiões específicas do DNA (ácido desoxirribonucleico) denominadas elementos de resposta ao estrogênio (ERE), regulando assim a expressão gênica (Fig.: 1; ARNAL et al., 2017). Os estrogênios também desencadeiam ações não-genômicas via interação com o ER de membrana plasmática acoplado a proteína G (GPER30; Fig.: 1), ou com receptores de outros hormônios, como alguns receptores para os fatores de crescimento (PROSSNITZ; BARTON, 2011).

As progestinas são esteroides produzidos pelos ovários e em menor quantidade pelas glândulas adrenais, sendo a P4, a progestina endógena prevalente em humanos. A P4 apresenta ações clássicas genômicas desencadeadas pela sua ligação às isoformas A, B e C dos receptores intracelulares de P4 (PR-A, PR-B e PR-C; Fig.: 1; GRIMM; HARTIG; EDWARDS, 2016). A P4 também promove ações não-genômicas via interação com receptores de membrana, como o componente 1 ou 2 do receptor de membrana para a P4 (PGRMC1 e PGRMC2; Fig.: 1) e as isoformas α , β e γ dos receptores de P4 acoplados à proteína G (mPR α , mPR β e mPR γ ; Fig.: 1). Além disso, esta progestina ou seus metabólitos podem deflagrar ações via interação com o receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA-A; Fig.: 1), receptores de mineralocorticoides (MR), glicocorticoides (GR), estrogênios (ER) e androgênios (PETERSEN et al., 2013).

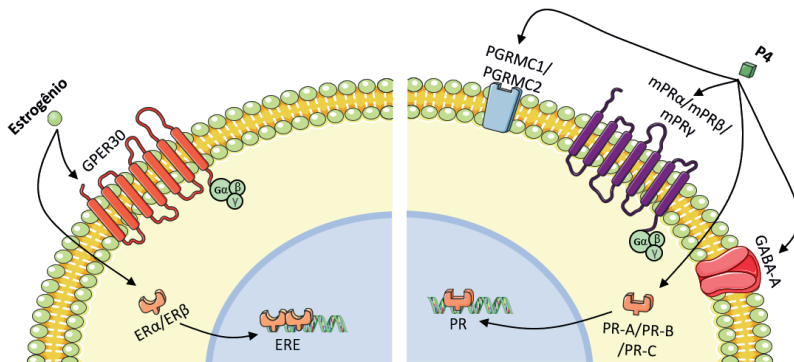


Figura 1: **Principais receptores para os estrogênios ou progesterona (P4).** Abreviações: **ERa**: receptor de estrogênio α ; **ERb**: receptor de estrogênio β ; **GPER30**: receptor de estrogênio acoplado a proteína G; **PR-A**: receptor de P4 tipo A; **PR-B**: receptor de P4 tipo B; **PR-C**: receptor de P4 tipo C; **PGRMC1**: componente 1 do receptor de membrana para a P4; **PGRMC2**: componente 2 do receptor de membrana para a P4; **mPRa**: receptor de P4 acoplado à proteína G α ; **mPRb**: receptor de P4 acoplado à proteína G β ; **mPRg**: receptor de P4 acoplado à proteína G γ ; **GABA-A**: receptores do ácido γ -aminobutírico do tipo A. A elaboração da figura foi realizada com algumas imagens disponíveis no site *Smart Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>). *Vide texto para descrição.*

2.1 Composição dos contraceptivos orais combinados

Os COCs são constituídos por estrogênio e progestina sintéticos e podem ser administrados por esquema cíclico ou contínuo. Eles contribuem ao controle da natalidade por exercerem retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise, o que impede o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas e a ovulação. Os COCs ainda dificultam a fecundação e a implantação por aumentarem o muco cervical, reduzirem a motilidade das tubas uterinas e a receptividade endometrial (FEBRASGO, 2015).

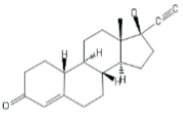
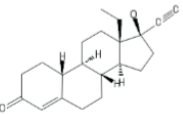
As formulações de COC apresentam como estrogênios sintéticos: o etinilestradiol (EE; é o mais utilizado nas formulações), o mestranol e o valerato de estradiol (FEBRASGO, 2015). O EE é sintetizado a partir do E2, o qual teve a adição de um grupo etinil (C_2H_2) no C17, resultando em redução do metabolismo hepático de primeira passagem e maior afinidade ao ER α do ao ER β (BRUNTON et al., 2012). É importante ressaltar que a concentração de EE foi reduzida nas diferentes formulações conforme a associação de altas concentrações de estrogênios ao maior risco de ações adversas nas usuárias (DE LEO et al., 2016).

As progestinas sintéticas presentes nos COCs derivam de modificações da 17- α -hidroxiprogesterona (progestina endógena) ou da 19-nortestosterona (esteróide sintético produzido a partir da testosterona). Algumas progestinas derivadas da 17- α -hidroxiprogesterona são o acetato de ciproterona e o acetato de megestrol. Os derivados da 19-nortestosterona são subdivididos em estranos (18 carbonos) e gonanos

(17 carbonos; BRUNTON et al., 2012). Ao longo dos anos, variações estruturais induziram diferenças importantes na atividade de cada progesterona, a fim de melhorar seu perfil contraceptivo e oferecer menores ações adversas (VIGO; LUBIANCA; CORLETA, 2011).

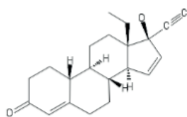
As progesteronas sintéticas são classificadas em gerações conforme sua ordem de síntese e molécula de origem (Tab.: 1). Na 1ª geração destaca-se o noretinodrel (Tab. 1), a noretindrona e os estranos derivados da 19-nortestosterona, e que apresentam um grupo etinil no C17 e remoção do grupo metil do C19. No entanto, estas progesteronas possuem alta ação androgênica, sendo associadas a cistos ovarianos e sangramento irregular. Com o intuito de reduzir tais efeitos foram sintetizadas as progesteronas de 2ª geração, das quais se ressalta o norgestrel e o levonorgestrel (Tab.: 1) que foram sintetizados a partir da adição do grupo acetato no C3 e/ou no C17, e substituição do grupo metil por etil no C13 da 19-nortestosterona. Porém, efeitos adversos ainda foram relatados, como cefaleia, náuseas, vômitos e aumento da pressão arterial associada à ação androgênica e progesteronal. Assim, as progesteronas de 3ª geração, gestodeno (Tab.: 1), desogestrel e norgestimato foram sintetizadas, porém quando associadas ao EE foram relacionadas ao risco de tromboembolismo (BRUNTON et al., 2012).

Foram posteriormente sintetizadas as progesteronas de 4ª geração, dentre as quais destaca-se a drospirenona (DRSP) que é derivada da 17- α -espironolactona (Tab.: 1), fármaco poupador de K⁺ com ação diurética (GOLAN, 2009). Dispõe da estrutura química de 19 carbonos semelhante ao núcleo dos esteroides, com dois grupos metileno (-CH₂-), um ligado ao C6 e C7 e o outro ligado ao C15 e C16 e adição de um grupo carbo lactona no C17 (Tab.: 1). Apresenta ação antiandrogênica e antiminerlocorticoide, porém com propriedades farmacológicas similares à P4 endógena, sendo agonista dos PRs (SITRUK-WARE, 2006).

Progesterona/ Estrutura química	Ações gonadotróficas e em receptores para esteroides
1ª geração Noretinodrel 	Ações progesterogênica, antiestrogênica e androgênica muito fortes. Ação forte antagonotrófica e estrogênica. Fraca ação antiandrogênica, glicocorticoide e antiminerlocorticoide*.
2ª geração Levonorgestrel 	Forte ação progesterogênica, antagonotrófica, antiestrogênica e androgênica. Fraca ação estrogênica, antiandrogênica, glicocorticoide e antiminerlocorticoide*.

3ª geração

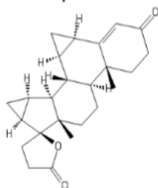
Gestodeno



Forte ação progestogênica, antigonadotrópica, antiestrogênica, androgênica glicocorticoide e antimineralocorticoide. Fraca ação estrogênica e antiandrogênica*.

4ª Geração

Drospirenona



Forte ação progestogênica, antigonadotrópica, antiestrogênica, antiandrogênica e antimineralocorticoide. Fraca ação estrogênica, androgênica e glicocorticoide**.

Conforme *VIGO; LUBIANCA; CORLETA (2011) ou **SITRUK-WARE; NATH, 2011). Estruturas químicas desenhadas com auxílio do site Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). *Vide texto para descrições.*

Tabela 1: Principais progestinas sintéticas presentes nas diferentes formulações farmacêuticas de COC.

2.2 Indicações, Benefícios e Efeitos Adversos do Uso de COC

A utilização de COC tem livre indicação para mulheres abaixo dos 40 anos e com mais de 6 semanas pós-parto. Porém nos demais casos, como em mulheres que sejam tagistas, tenham dislipidemias e riscos de desenvolverem desordens venosas, a avaliação médica será mais criteriosa na averiguação de se existe combinação hormonal que possa ser adotada. Os COCs podem ser alternativas ao tratamento da dismenorreia, acne, sintomas da tensão pré-menstrual, endometriose, adenomiose e síndrome dos ovários policísticos (FEBRASGO, 2015). Mas, ao longo dos anos, a utilização prolongada de COC, dependendo da sua composição, foi relacionada ao maior risco para desenvolvimento de alguns tipos de câncer, de hipertensão arterial, de tromboembolismo e de prejuízos no metabolismo intermediário (BRITO; NOBRE; VIEIRA, 2011; DE LEO et al., 2016; GODSLAND et al., 1992; JANDRAIN et al., 1990; SCHEEN et al., 1993).

O primeiro COC lançado no mercado era constituído por 150 µg de mestranol e 10 µg noretinodrel, e foi associado a efeitos adversos, como sangramentos irregulares, náuseas, enxaqueca, ganho de peso e episódios de tromboembolismo venoso (DE LEO et al., 2016). Na tentativa de evitar tais eventos, as progestinas e a concentração do estrogênio sintético foram modificados. Porém, ainda houveram relatos que a associação do EE com a noretindrona causava náusea, tontura, sangramento irregular, cistos ovarianos, e dependendo da concentração, maior risco de câncer de mama (VIGO; LUBIANCA; CORLETA, 2011). A associação EE e levornorgestrel foi relacionada ao risco de acne, hirsutismo, ganho de peso e alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos

(DRAGOMAN, 2014). As progestinas de 3ª geração derivadas do gestodeno, apesar de terem menor potencial androgênico foram relacionadas ao risco de tromboembolismo venoso quando associadas ao EE (FARRIS et al., 2017).

A associação EE com DRSP, progestina com ação antiandrogênica e antiminerlocorticoide, teve o objetivo de atenuar a retenção hídrica que eleva o peso corporal e pode ser fator para a descontinuação do uso dos COCs. Este COC tem demonstrado eficácia contra a dismenorreia, sintomas da tensão pré-menstrual, melhoria da acne e oleosidade cutânea. Contudo, pesquisas populacionais associaram o uso do COC de EE e DRSP com trombose venosa profunda e tromboembolismo (DE LEO et al., 2016).

Com relação ao metabolismo intermediário há estudos que demonstraram que dependendo da concentração dos esteroides sintéticos, bem como a razão estrogênio/progestina das diferentes formulações de COCs, as usuárias podem apresentar mudanças na secreção, ação e/ou depuração da insulina (BECK et al., 1975; GODSLAND et al., 1992; JANDRAIN et al., 1990; SCHEEN et al., 1993). Porém os mecanismos pelos quais algumas formulações de COCs poderiam desencadear modificações na fisiologia do hormônio insulina não estão esclarecidos. É possível que a mudança do padrão cíclico fisiológico dos esteroides gonadais endógenos, para a manutenção da concentração constante dos estrogênios e progestinas sintéticos, que ocorre em alguns tipos de regime de administração, possa promover modificações em todas as etapas envolvidas na biologia da insulina, visto que isoladamente os estrogênios e a P4 podem deflagar diferentes ações sobre a célula β pancreática e os tecidos-alvo da insulina. Nas próximas seções consideraremos estes aspectos e o estado da arte com relação aos efeitos dos COCs sobre a secreção, ação e o metabolismo da insulina.

3 | BIOLOGIA DA INSULINA

3.1 Secreção de Insulina e as Ações dos Esteroides Sexuais Femininos Sobre a Função da Célula - β Pancreática

A insulina é o único hormônio que regula, ou seja, reduz a concentração plasmática de glicose e outros nutrientes. Além disso, a insulina é essencial para a manutenção da multiplicação, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. O gene da insulina está localizado no cromossomo 11 e é expresso nas células β das ilhotas pancreáticas. O RNAm transcrito direciona a tradução da pró-insulina que após modificação pós-traducional, origina o peptídeo-C e a insulina ativa, a qual é composta por 2 cadeias polipeptídicas, a cadeia A e a cadeia B que estão ligadas por pontes dissulfeto (TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018).

A insulina é secretada pelas células β em resposta ao aumento da concentração plasmática de nutrientes, em especial da glicose. A glicose no líquido extracelular é

transportada para a célula β através do transportador de glicose (GLUT)-2 e GLUT-1 (Fig.: 2). No citoplasma a glicose é fosforilada pela glicocinase (GCK) e segue a via glicolítica e fosforilação oxidativa o que aumenta a razão ATP (adenosina trifostato)/adenosina difostato intracelular. O ATP inativa os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) o que reduz o efluxo de K^+ que despolariza a membrana plasmática. A ativação subsequente dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, permite o influxo de Ca^{2+} que libera o processo de exocitose dos grânulos que contém insulina (Fig.: 2; CAMPBELL; NEWGARD, 2021).

Os estrogênios e a P4 podem tanto estimular quanto inibir a secreção de insulina (Fig.: 2). O E2 em concentrações fisiológicas via ativação do ER- β e do receptor para o peptídeo natriurético atrial causa o fechamento dos canais de K_{ATP} , despolarização da membrana e conseqüente influxo de Ca^{2+} para a célula β (Fig.: 2; NADAL et al., 1998; SORIANO et al., 2009). O E2 via interação com o GPER aumenta a expressão gênica e proteica do GLUT-2 e GCK (BIAN et al., 2019). A ativação do GPER também aumenta o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma das células β e ativa vias envolvidas na multiplicação e sobrevivência celular (SHARMA; PROSSNITZ, 2011). O E2 ao interagir com o ER- α das células β aumenta a expressão de fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular (YUCHI et al., 2015) e síntese da insulina (ALONSO-MAGDALENA et al., 2008).

Apesar de ser descrita a presença dos receptores para P4 nas ilhotas pancreáticas (DOGLIONI et al., 1990; ZHANG et al., 2014), as ações da P4 sobre a fisiologia da célula β ainda são contraditórias. Redução (STRAUB et al., 2001) ou nenhuma modificação (COSTRINI; KALKHOFF, 1971) na liberação da insulina, foram relatadas em ilhotas de roedores incubadas com P4. Mas, a administração de P4 por 3 semanas a ratas aumentou a secreção de insulina em resposta à glicose (ASHBY; SHIRLING; BAIRD, 1978, 1981; COSTRINI; KALKHOFF, 1971) e à agentes que potencializam a secreção (ASHBY; SHIRLING; BAIRD, 1978). Posteriormente, foi demonstrado na linhagem de células β *MIN-6* que a interação do PGRMC1 com o receptor para o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), é essencial para que esta incretina potencialize a secreção de insulina em resposta à glicose (Fig.: 2; ZHANG et al., 2014). Porém, há dados que indicam possível ação da P4 na disfunção e morte das células β , visto que a utilização de antagonistas para os PRs, ou a deleção destes receptores, protegeu linhagem de células β e roedores de prejuízos na secreção de insulina (PICARD et al., 2002; ZHOU et al., 2013).

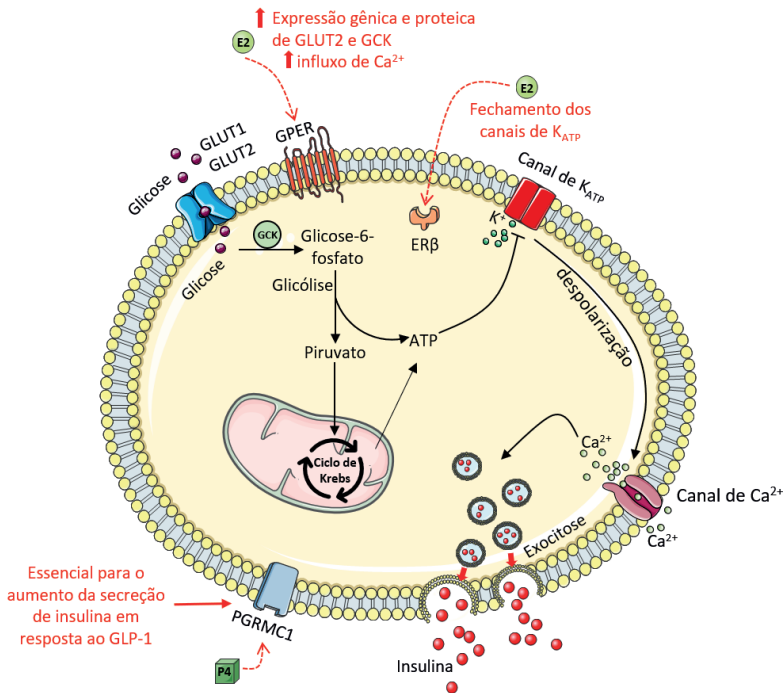


Figura 2: **Representação dos principais componentes da célula β envolvidos na liberação de insulina em resposta ao aumento da glicose no líquido extracelular.** A glicose é transportada através do GLUT-2 e GLUT-1 para o citoplasma da célula β . A GSK3 fosforila o açúcar que segue metabolismo completo gerando aumento na concentração de ATP. Este inibe os canais de K_{ATP} , o que reduz o efluxo de K^+ , despolarização da membrana e ativação dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O aumento de Ca^{2+} intracelular estimula a exocitose das vesículas que contém insulina. A elaboração da figura foi realizada com algumas imagens disponíveis no site *Smart Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>). *Vide texto para descrição das ações do E2 e P4 sobre a célula secreção de insulina.*

3.1.1 Ações dos COCs sobre a Fisiologia da Célula β Pancreática

As ações isoladas do E2 e da P4 sobre a célula β inferem a possibilidade de que a utilização das diferentes formulações de COCs poderia modificar o funcionamento do pâncreas endócrino. Mulheres que utilizaram o COC composto por mestranol e noretindrona apresentaram redução da secreção de insulina estimulada por arginina (BECK et al., 1975). Porém, mulheres que utilizaram o COC composto por EE e desogestrel ou EE e acetato de ciproterona apresentaram aumento da concentração circulante de peptídeo-C sem mudanças na insulinemia (JANDRAIN et al., 1990). Como o peptídeo-C é secretado pela célula β em quantidade equimolar à da insulina, e não sofre remoção hepática significativa (CAMPBELL; NEWGARD, 2021; DUCKWORTH; HAMEL, 2011; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018), este peptídeo é um dos melhores indicadores para avaliar a secreção de insulina. Em acordo, GODSLAND et al. (1992) observaram aumento na secreção de

insulina em resposta à glicose em mulheres que utilizaram COCs compostos por EE e levonorgestrel ou EE e desogestrel. Recentemente, foi observado que a administração do COC composto por EE e DRSP à camundongos fêmeas por 35 dias aumentou a insulinemia. As ilhotas pancreáticas isoladas destas fêmeas exibiram maior secreção de insulina em concentrações basais e estimulatórias de glicose. Em experimento com células b da linhagem *INS-E* com EE ou DRSP foi demonstrado que estes esteroides sintéticos, isolados ou combinados, aumentam a secreção de insulina, indicando que a ação insulínica mantida pela concentração circulante constante do COC de EE e DRSP pode mudar a sensibilidade das células b à glicose e causar hiperinsulinemia (OLIVEIRA et al., 2019). Portanto, a manutenção da concentração constante de estrogênios e progestinas podem ter ações importantes sobre a fisiologia do pâncreas endócrino. Contudo, os estudos clínicos não abordam quais processos celulares são modificados na célula b e se tais modificações poderiam aumentar o risco para sua disfunção, condição que pode contribuir para o desenvolvimento da intolerância à glicose e diabetes (ERION; CORKEY, 2018).

3.2 Ação da Insulina e as Ações dos Esteroides Sexuais Femininos sobre a Sinalização da Insulina

Nos tecidos-alvo a insulina interage com o receptor de insulina (IR). Este receptor de membrana é constituído por 2 subunidades α (IR- α) totalmente extracelulares, e 2 subunidades β (IR- β) que são proteínas integrais de membrana. A interação da insulina com o IR- α libera a atividade tirosina quinase do IR- β , o que resulta em sua autofosforilação (GUTMANN et al., 2018). Subsequentemente o IR- β fosforila e ancora proteínas citosólicas, sendo uma delas os substratos do receptor de insulina (IRS). Os IRSs ativos formam sítios de ancoragem para a ativação de proteínas como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que fosforila o fosfatidilinositol bifosfato da membrana e produz fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Este fosfoinosítideo recruta para a membrana e ativa a proteína quinase dependente de PIP3 (PDK1), que por sua vez, fosforila o resíduo treonina (Thr) 308 da proteína quinase B/Akt. Para a máxima atividade da Akt, também ocorre a fosforilação do resíduo serina (Ser473) pelo componente 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2; MANNING; TOKER, 2017).

A Akt é uma serina-treonina quinase que deflagra processos importantes para a regulação da homeostase nutricional, como: a estimulação da glicólise; a inibição da produção hepática de glicose por estimular a síntese de glicogênio e inibir a glicogenólise e a gliconeogênese; o aumento do transporte de glicose no músculo e tecido adiposo pela translocação do GLUT-4 para a membrana; o aumento da síntese de proteínas; a estimulação da lipogênese e a inibição da lipólise; e no sistema nervoso central, a indução da saciedade e ativação de eferências neurais que regulam o metabolismo da glicose nos tecidos periféricos. Além disso, a Akt ativa processos de sobrevivência, crescimento e multiplicação celular em todos os tecidos (MANNING; TOKER, 2017; PETERSEN;

SHULMAN, 2018; PLUM; BELGARDT; BRÜNING, 2006).

Os estudos indicam ações importantes dos estrogênios sobre a sinalização da insulina. Camundongos com deleção do ER- α e ER- β apresentaram hiperglicemia de jejum, maior produção hepática de glicose e redução do transporte de glicose no músculo (BRYZGALOVA et al., 2006). Foi demonstrado que o ER- α interage com a subunidade regulatória de 85 kDa (p85) da PI3K resultando na ativação da via PI3K/Akt (SIMONCINI et al., 2000), o que fosforila e inativa o fator de transcrição *Forkhead box protein O1*, contribuindo para a inibição da produção hepática de glicose (YAN et al., 2019). A ativação do ER- β no tecido adiposo reduz a atividade transcricional do fator adipogênico: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α (FORYST-LUDWIG et al., 2008). O E2 interage com o ER- α no núcleo ventromedial do hipotálamo para manter o gasto energético normal (MUSATOV et al., 2007). Por outro lado, dependendo da concentração o E2 pode interagir com a insulina e com o IR e reduzir a interação hormônio-receptor, o que poderia contribuir para a resistência à insulina (ROOT-BERNSTEIN; PODUFALY; DILLON, 2014).

A contribuição da P4 sobre a ação da insulina e homeostase nutricional ainda são pouco exploradas. HAMPTON et al. (2018) demonstraram que o PGRMC1 interage com o IR aumentando sua translocação para a membrana plasmática, porém reduz a interação insulina com o IR (Fig.: 3). Além disso, em células tumorais o PGRMC1 aumenta a translocação do GLUT-4 e GLUT-1 (HAMPTON et al., 2018). Em hepatócitos a P4 via interação com PGRMC1 aumenta a produção hepática de glicose por estimular a gliconeogênese (LEE et al., 2020). Em adipócitos foi demonstrado que a P4 reduz a ativação da via IR/PI3K/Akt e a translocação do GLUT-4 (WADA et al., 2010).

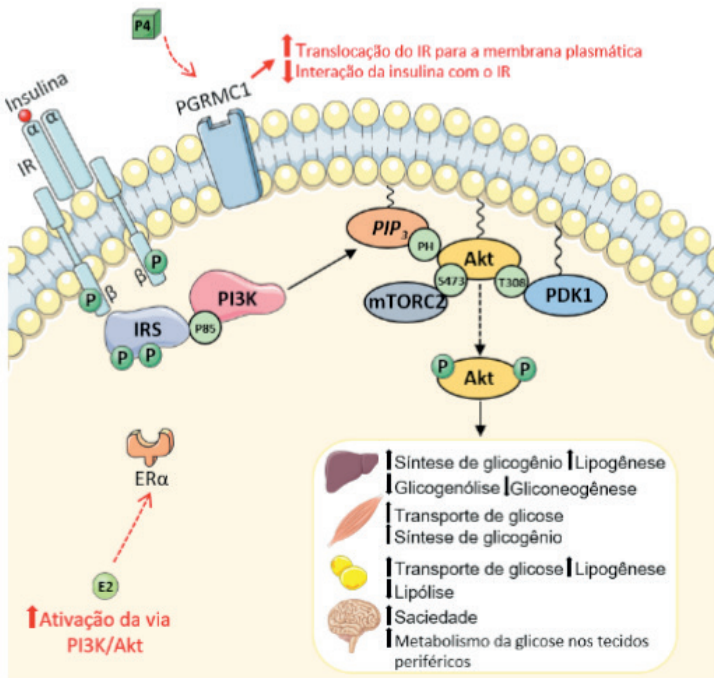


Figura 3: **Representação da interação da insulina com o IR, ativação da via de sinalização IR/PI3K/Akt e seus principais efeitos no fígado, músculo, tecido adiposo e sistema nervoso central.** Algumas ações do E2 e P4 sobre a via IR/PI3K/Akt. A elaboração da figura foi realizada com algumas imagens disponíveis no site *Smart Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>). Vide texto para abreviações e descrições.

3.2.1 Ações dos COCs Sobre a Sinalização da Insulina

As diversas ações que os estrogênios e a P4 isolados exercem sobre a sinalização da insulina, remetem ao questionamento se a utilização dos COCs poderia modificar as ações da insulina e desencadear alterações na homeostase da glicose nas usuárias. Estudos clínicos observaram que usuárias de COCs compostos por EE levonorgestrel, EE e desogestrel ou EE e noretindrona apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina (GODSLAND et al., 1992). Em ensaios pré-clínicos utilizando camundongos fêmeas tratadas com EE e DRSP por 35 dias não foram observadas modificações na tolerância à glicose ou sensibilidade à insulina, porém, o COC reduziu a expressão proteica do IR no fígado (OLIVEIRA et al., 2019). Assim, são necessárias mais investigações que demonstrem a expressão das proteínas envolvidas na sinalização da insulina nos tecidos-alvo do hormônio, para que possa ser comprovado se as diferentes formulações de COC, poderiam resultar em modificações moleculares que aumentam o risco à resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes.

3.3 Clearance da Insulina e a Contribuição dos Esteroides Sexuais Femininos e dos COCs para o metabolismo da insulina

A insulina é um hormônio hidrofílico que circula livre no plasma e tem meia-vida estimada em torno de 4 à 6 minutos. Após a insulina interagir com o IR e deflagrar a sinalização intracelular, o hormônio é dissociado do IR e pode ser hidrolisado (DUCKWORTH; HAMEL, 2011). O metabolismo da insulina é essencial para a homeostase da glicose e alterações no seu *clearance* contribuem para a intolerância à glicose e diabetes (LEE et al., 2013; MARINI et al., 2013). A insulina liberada pelas ilhotas pancreáticas segue via circulação porta ao fígado, e nesta primeira passagem o órgão extrai e hidrolisa 50% da insulina. O restante atinge a circulação sistêmica, sendo 50% desta insulina depurada pelos rins, e o restante é metabolizada principalmente pelo músculo em menor quantidade pelo tecido adiposo e outros tecidos. Além disso, na segunda passagem pelo fígado, o órgão pode remover até 30% da insulina circulante (Fig.: 4; DUCKWORTH; HAMEL, 2011; MEIER; VELDHUIS; BUTLER, 2005).

O metabolismo da insulina pode iniciar-se com a hidrólise da insulina ligada ao IR pela enzima degradadora de insulina (IDE) localizada na face extracelular da membrana plasmática. Mas, como a IDE também é citoplasmática, o processo geralmente ocorre intracelularmente. Assim, o complexo insulina-IR é endocitado e nos endossomos a IDE hidrolisa ao meio as cadeias A e B do hormônio, de forma a liberar duas metades N- e C-terminais inativas que ainda contém as pontes dissulfeto intercadeia (MANOLOPOULOU et al., 2009). A acidificação progressiva dos endossomos desencadeia a dissociação das moléculas remanescentes de insulina que ainda estão ligadas ao IR. Neste processo, o IR pode ser reciclado para a membrana plasmática ou juntamente com os fragmentos e/ou moléculas de insulina intactas, prosseguir para a hidrólise nos lisossomos (Fig.: 4; DUCKWORTH; HAMEL, 2011).

Estudos sobre às ações dos esteroides sexuais femininos no metabolismo da insulina são escassos. O E2 parece ser importante para manter a expressão da IDE no fígado, visto que em camundongos fêmeas ovariectomizadas foi observado que a redução do E2 circulante aumenta a expressão da IDE no fígado e o *clearance* da insulina (Fig.: 4; SANTOS et al., 2016). Contudo há indícios de que a administração de E2 e/ou P4 aumentam a expressão da IDE no útero e neurônios, efeito que estaria relacionado à regulação de processos de crescimento e sobrevivência celular, mas não ao metabolismo da insulina, visto que a IDE hidrolisa outras proteínas (JAYARAMAN et al., 2012; UDRISAR et al., 2005; ZHAO et al., 2011).

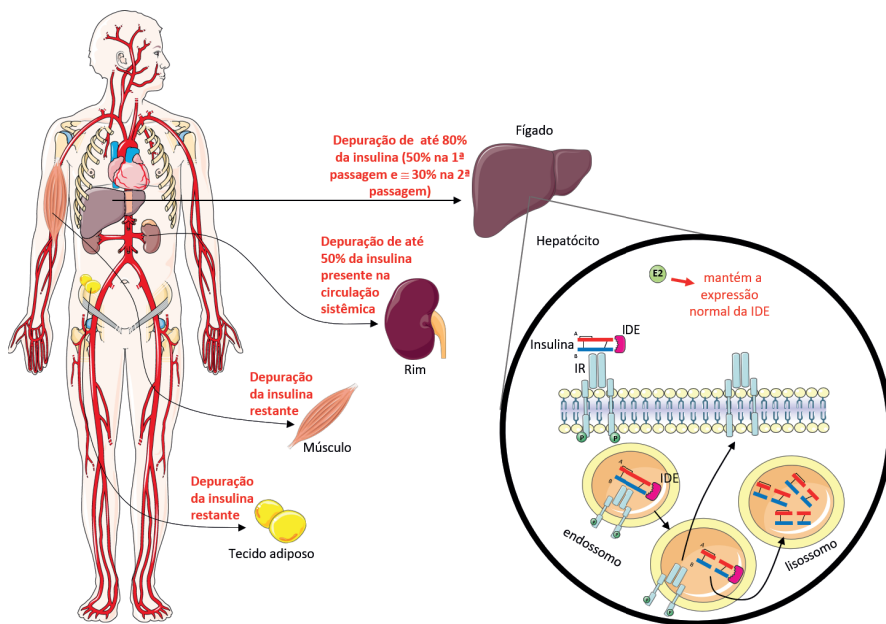


Figura 4: Representação dos principais órgãos envolvidos na remoção e *clearance* da insulina, e dos processos que promovem a hidrólise intracelular do hormônio. Efeito do E2 sobre a expressão proteica da IDE. A elaboração da figura foi realizada com algumas imagens disponíveis no site *Smart Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>). *Vide texto para abreviaturas e descrição.*

Dados da literatura sobre as ações dos COCs sobre o *clearance* da insulina também são contraditórios. Foi relatado tanto redução quanto aumento na depuração de insulina em usuárias do COC contendo EE e desogestrel (GODSLAND et al., 1992; JANDRAIN et al., 1990). Mulheres que utilizaram por um ano o COC composto por EE e acetato de ciproterona tiveram aumento do *clearance* da insulina (SCHEEN et al., 1993). Em camundongos fêmeas que receberam o COC contendo EE e DRSP por 35 dias foi observado redução do *clearance* da insulina, o que contribuiu para a hiperinsulinemia induzida pela administração deste COC nos roedores (OLIVEIRA et al., 2019).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os esteroides sexuais femininos são importantes para a normal secreção, ação e depuração da insulina. Apesar dos estudos clínicos com usuárias de COCs demonstrarem que algumas formulações promovem alterações moderadas sobre aspectos da biologia da insulina, estas evidências alertam que a utilização prolongada dos COCs pode aumentar o risco para prejuízos na homeostase da glicose nas usuárias. Como estudos com mulheres que utilizam os diferentes COCs a longo prazo são difíceis de serem conduzidos, a descrição dos mecanismos pelos quais os COCs podem modificar o funcionamento do

pâncreas endócrino e dos tecidos-alvo da insulina, poderiam ter avanços científicos se mais estudos pré-clínicos com modelos experimentais fossem realizados, possibilitando posterior abordagem pontual nos ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ALONSO-MAGDALENA, P. *et al.* **Pancreatic insulin content regulation by the Estrogen receptor ER α** . PLoS ONE, v. 3, n. 4, p. e2069, 2008.

ARNAL, J. F. *et al.* **Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: From tissue specificity to medical implications**. Physiol Rev, v. 97, p. 1045–1087, 2017.

ASHBY, J. P.; SHIRLING, D.; BAIRD, J. D. **Effect of progesterone on insulin secretion in the rat**. J Endocrinol, v. 76, n. 3, p. 479–486, 1978.

ASHBY, J. P.; SHIRLING, D.; BAIRD, J. D. **Effect of progesterone on the secretion and peripheral action of insulin and glucagon in the intact rat**. J Endocrinol, v. 88, n. 1, p. 49-55, 1981.

BECK, P. *et al.* **Effect of contraceptive steroids on arginine-stimulated glucagon and insulin secretion in women: I-lipid physiology**. Metabolism, v. 24, n. 9, p. 1055–1065, 1975.

BIAN, C. *et al.* **17 β -estradiol regulates glucose metabolism and insulin secretion in rat islet β cells through GPER and Akt/mTOR/GLUT2 pathway**. Front Endocrinol, v. 10, p. 531, 2019.

BRITO, M. B.; NOBRE, F.; VIEIRA, C. S. **Contracepção hormonal e sistema cardiovascular**. Arq Bras Cardiol, v. 96, n. 4, p. e81-e88, 2011.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Artmed, 2012. 2112p.

BRYZGALOVA, G. *et al.* **Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: Insulin sensitivity in the liver**. Diabetologia, v. 49, p. 588–597, 2006.

CAMPBELL, J. E.; NEWGARD, C. B. **Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion**. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 22, p. 142–158, 2021.

COSTRINI, N. V.; KALKHOFF, R. K. **Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion**. J Clin Invest, v. 50, p. 992–999, 1971.

DE LEO, V. *et al.* **Hormonal contraceptives: Pharmacology tailored to women's health**. Hum Reprod Update, v. 22, n. 5, p. 634–646, 2016.

DOGLIONI, C. *et al.* **Immunocytochemical localization of progesterone receptors in endocrine cells of the human pancreas**. Am J Pathol, v. 137, n. 5, p. 999–1005, 1990.

DRAGOMAN, M. V. **The combined oral contraceptive pill- recent developments, risks and benefits**. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v. 28, n. 6, p. 825–834, 2014.

DUCKWORTH, W. C.; HAMEL, F. G. Insulin Degradation and Insulin-Degrading Enzyme. *In: Handbook of Physiology, The Endocrine System, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. Wiley Online Livrary, 2011. cap. 7, p. 177-193.

ERION, K.; CORKEY, B. E. **β -Cell Failure or β -Cell Abuse?** *Front Endocrinol*, v. 9, e532, 2018.

FARIAS, M. R. et al. **Utilização e acesso a contraceptivos orais e injetáveis no Brasil**. *Rev Saúde Pública*, v. 50, supl. 2, p. 1s-14s, 2016.

FARRIS, M. et al. **Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 2. effects on hemostasis**. *Exp Rev Clin Pharmacol*, v. 10, n. 10, p. 1129–1144, 2017.

FEBRASGO - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. **Manual de Anticoncepção**. 2015. 285p. Disponível em: <https://central3.to.gov.br/arquivo/494569>. Acesso em: 11 fev 2021.

FORYST-LUDWIG, A. et al. **Metabolic actions of estrogen receptor beta (ER β) are mediated by a negative cross-talk with PPAR γ** . *PLoS Genetics*, v. 4, n. 6, p. e1000108, 2008.

GODSLAND, I. F. et al. **Insulin resistance, secretion, and metabolism in users of oral contraceptives**. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 74, n. 1, p. 64–70, 1992.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 972p.

GRIMM, S. L.; HARTIG, S. M.; EDWARDS, D. P. **Progesterone Receptor Signaling Mechanisms**. *J Mol Biol*, v. 428, n. 19, p. 3831–3849, 2016.

GUTMANN, T. et al. **Visualization of ligand-induced transmembrane signaling in the full-length human insulin receptor**. *J Cell Biol*, v. 217, n. 5, p. 1643–1649, 2018.

HAMPTON, K. K. et al. **Insulin receptor plasma membrane levels increased by the progesterone receptor membrane component 1**. *Mol Pharmacol*, v. 94, p. 665–673, 2018.

JANDRAIN, B. J. et al. **Effects of ethinyl estradiol combined with desogestrel and cyproterone acetate on glucose tolerance and insulin response to an oral glucose load: A one-year randomized, prospective, comparative trial**. *Am J Obst Gynecol*, v. 163, n. 1 part2, p. 378–381, 1990.

JAYARAMAN, A. et al. **17 β -Estradiol and progesterone regulate expression of β -amyloid clearance factors in primary neuron cultures and female rat brain**. *Endocrinology*, v. 153, n. 11, p. 5467–5479, 2012.

LEE, C. C. et al. **Insulin clearance and the incidence of type 2 diabetes in hispanics and African Americans: The IRAS family study**. *Diab Care*, v. 36, n. 4, p. 901–907, 2013.

LEE, S. R. et al. **Progesterone increases blood glucose via hepatic progesterone receptor membrane component 1 under limited or impaired action of insulin**. *Sci Rep*, v. 10, p. 16316, 2020.

MANNING, B. D.; TOKER, A. **AKT/PKB Signaling: Navigating the Network**. *Cell*, v. 169, n. April 20, p. 378–381, 2017.

MANOLOPOULOU, M. *et al.* **Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme**. *J Biol Chem*, v. 284, n. 21, p. 14177–14188, 2009.

MARINI, M. A. *et al.* **Decreased Insulin Clearance in Individuals with Elevated 1-h Post-Load Plasma Glucose Levels**. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. e77440, 2013.

MEIER, J. J.; VELDHIJS, J. D.; BUTLER, P. C. **Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans**. *Diabetes*, v. 54, n. 6, p. 1649–1656, 2005.

MUSATOV, S. *et al.* **Silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome**. *PNAS*, v. 104, n. 7, p. 2501–2506, 2007.

NADAL, A. *et al.* **Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor**. *FASEB J*, v. 12, p. 1341–1348, 1998.

OLIVEIRA, C. A. R. *et al.* **Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to β -cell hypersecretion and reduction in insulin clearance**. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 190, p. 54–63, 2019.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance**. *Physiol Rev*, v. 98, n. 4, p.2133–2223, 2018.

PETERSEN, S. L. *et al.* **Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions**. *Front Neurosci*, v. 7, e164, 2013.

PICARD, F. *et al.* **Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to β -cell proliferation**. *PNAS*, v. 99, n. 24, p. 15644–15648, 2002.

PLUM, L.; BELGARDT, B. F.; BRÜNING, J. C. **Central insulin action in energy and glucose homeostasis**. *J Clin Invest*, v. 116, n. 7, p. 1761–1766, 2006.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. **The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease**. *Nat Rev Endocrinol*, v. 7, n. 12, p. 715–726, 2011.

ROOT-BERNSTEIN, R.; PODUFALY, A.; DILLON, P. F. **Estradiol binds to insulin and insulin receptor decreasing insulin binding in vitro**. *Front Endocrinol*, v. 5, p. 118, 2014.

SANTOS, R. S. *et al.* **Lacking of estradiol reduces insulin exocytosis from pancreatic β -cells and increases hepatic insulin degradation**. *Steroids*, v. 114, p. 16–24, 2016.

SCHEEN, A. J. *et al.* **Effects of a 1-year treatment with a low-dose combined oral contraceptive containing ethinyl estradiol and cyproterone acetate on glucose and insulin metabolism**. *Fertility and Sterility*, v. 59, p. 797–802, 1993.

- SHARMA, G.; PROSSNITZ, E. R. **Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic β -cells.** *Endocrinology*, v. 152, n. 8, p. 3030–3039, 2011.
- SIMONCINI, T. *et al.* **Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase.** *Nature*, v. 407, p. 538–541, 2000.
- SITRUK-WARE, R. **New progestagens for contraceptive use.** *Hum Reprod Update*, v. 12, n. 2, p. 169–78, 2006.
- SITRUK-WARE, R.; NATH, A. **Metabolic effects of contraceptive steroids.** *Rev Endocr Metab Disord*, v. 12, n. 2, p. 63–75, 2011.
- SORIANO, S. *et al.* **Rapid regulation of KATP channel activity by 17 β -estradiol in pancreatic β -cells involves the estrogen receptor β and the atrial natriuretic peptide receptor.** *Mol Endocrinol*, v. 23, n. 12, p. 1973–1982, 2009.
- STRAUB, S. G. *et al.* **Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action.** *Biosci Rep*, v. 21, n. 5, p. 653–666, 2001.
- TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. **The cell biology of systemic insulin function.** *J Cell Biol*, v. 217, n. 7, p. 2273–2289, 2018.
- UDRISAR, D. P. *et al.* **Androgen- and estrogen-dependent regulation of insulin-degrading enzyme in subcellular fractions of rat prostate and uterus.** *Exp Biol Med*, v. 230, p. 479–487, 2005.
- UNITED NATIONS - DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. POPULATION DIVISION. **Contraceptive use by method 2019: data booklet.** 2019. 25p. Disponível em: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un_2019_contraceptiveusebymethod_databooklet.pdf. Acesso em: 11 fev 2021.
- VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. E. **Progestógenos: farmacologia e uso clínico.** *Femina*, v. 39, n. 3, p. 127–137, 2011.
- WADA, T. *et al.* **Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 298, p. E881–E888, 2010.
- YAN, H. *et al.* **Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor Foxo1.** *Diabetes*, v. 68, p. 291–304, 2019.
- YUCHI, Y. *et al.* **Estrogen receptor α regulates β -cell formation during pancreas development and following injury.** *Diabetes*, v. 64, p. 3218–3228, 2015.
- ZHANG, M. *et al.* **Progesterone receptor membrane component 1 is a functional part of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor complex in pancreatic β cells.** *Mol Cell Prot*, v. 13, n. 11, p. 3049–3062, 2014.
- ZHAO, L. *et al.* **17 β -Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ER β /PI3-K pathway in hippocampus: Relevance to Alzheimer's prevention.** *Neurobiol Aging*, v. 32, n. 11, p. 1949–63, 2011.
- ZHOU, R. *et al.* **Blockage of progesterone receptor effectively protects pancreatic islet beta cell viability.** *Steroids*, v. 78, p. 987–995, 2013.

CAPÍTULO 13

CONDIÇÕES TÉRMICAS E SANITÁRIAS EM ILHAS DE REFRIGERAÇÃO DE SUPERMERCADOS E O RISCO DE TRANSMISSÃO DE SALMONELOSE

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 26/12/2020

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva

Centro Universitário do Triângulo – UNITRI
Uberlândia – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/1121388507923862>

Daniely Souza Paz

Universidade Luterana do Brasil – ILES/ULBRA
Itumbiara – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/7085595195424637>

Kimberly Soares Brito Bratfich

Universidade Luterana do Brasil – ILES/ULBRA
Itumbiara – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/4467031486535747>

Letícia das Graças Silva

Centro Universitário do Triângulo – UNITRI
Uberlândia – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/2536593466636226>

Rogério Alves Rodrigues

Instituto Federal Goiano – IF Goiano,
Morrinhos – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/2435123185094001>

RESUMO: O *Codex Alimentarius* acompanha a cadeia de alimentos desde a produção primária até o consumidor final, destacando os controles de higiene fundamentais em cada etapa. A Salmonelose Aviária, disseminada mundialmente, é uma das principais zoonoses de importância em saúde pública. O armazenamento dos alimentos na temperatura correta é de

extrema importância para que a conservação seja feita de modo adequado, sendo também essencial para que seja preservada a vida útil dos produtos alimentícios e para a prevenção das Doenças Transmitidas por Alimentos, em especial, a Salmonelose. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a temperatura e as condições higiênico-sanitárias nas ilhas de refrigeração de quatro supermercados de um município do interior do Estado de Goiás. Trata-se de um estudo de campo que utilizou para a coleta de dados o registro das temperaturas nas ilhas de refrigeração, onde ficam expostos frangos resfriados para comercialização. Os resultados indicaram que três supermercados apresentaram condições térmicas e sanitárias de armazenamento dentro dos padrões exigidos pela legislação e, somente, um supermercado apresentou condições de armazenamento térmico inadequadas. O supermercado “A” se mostrou com melhores condições térmicas de armazenamento para manter o alimento refrigerado, no entanto, as condições de higiene e sanitárias no local de exposição dos produtos estavam inadequadas. Concluiu-se que a saúde dos consumidores pode estar exposta a sérios riscos devido às inadequações de temperaturas e das condições higiênico-sanitárias no armazenamento desses produtos perecíveis, fazendo-se necessário uma fiscalização eficaz pelos órgãos de Vigilância em Saúde, para que seja assegurado ao consumidor um alimento de qualidade sanitária.

PALAVRAS - CHAVE: *Salmonella* spp. Vigilância. DTA's. Saúde pública.

ABSTRACT: Codex Alimentarius accompanies the food chain from primary production to the final consumer, highlighting the fundamental hygiene controls at each stage. Avian Salmonellosis, disseminated worldwide, is one of the main zoonoses of importance in public health. Storing food at the correct temperature is of utmost importance so that preservation is carried out in an appropriate manner, and essential to preserve the shelf life of food products and to prevent Foodborne Diseases, in particular, Salmonellosis. The present work aimed to evaluate the temperature and the hygienic-sanitary conditions in the refrigeration islands of four supermarkets in a city in the interior of the State of Goiás. This is a field study that used data collection to record the temperatures in the refrigeration islands, where chilled chickens are exposed for sale. The results indicated that three supermarkets had thermal and sanitary conditions of storage within the standards required by legislation and only one supermarket had inadequate thermal storage conditions. Supermarket “A” showed better thermal storage conditions to keep the food refrigerated, however, the hygiene and sanitary conditions at the product exhibition site were inadequate. It was concluded that the health of consumers might be exposed to serious risks due to inadequate temperature and hygienic-sanitary conditions in the storage of these perishable products, making effective inspection necessary by the Health Surveillance bodies, so that it is ensured consumer of health-quality food.

KEYWORDS: *Salmonella* spp. Surveillance. DTA's. Public health.

INTRODUÇÃO

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) destaca que é direito das pessoas terem a expectativa de que os alimentos que consomem sejam seguros e adequados para o consumo. Nesse sentido, os princípios gerais do *Codex Alimentarius* (do latim Lei ou Código dos Alimentos) estabelecem uma base sólida para garantir a higiene dos alimentos e, quando apropriado, devem ser usados em conjunto com os códigos de práticas de higiene específicos e com as diretrizes sobre critérios microbiológicos. Esse documento acompanha a cadeia de alimentos desde a produção primária até o consumidor final, destacando os controles sanitários fundamentais em cada etapa (OPAS, 2006).

Quando a temperatura, a umidade e outros controles ambientais de acondicionamento não se encontram regulados, os alimentos, como as carnes, ficam particularmente vulneráveis à sobrevivência e ao crescimento de agentes patogênicos e microrganismos responsáveis pela deterioração (SILVA et al., 2020). Desse modo, as doenças e os danos provocados por alimentos deteriorados são, na melhor das hipóteses, desagradáveis, e, na pior das hipóteses, fatais (OPAS, 2006).

A *Salmonella* spp. possui grande importância em saúde pública, pois é reconhecida como a bactéria de maior potencial zoonótico relacionada às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) e de maior prevalência nos casos de intoxicação alimentar por produtos de origem avícola, especialmente os carnes. Por esse motivo, devido ao aumento de consumo e da produção de carne aviária, houve a criação de alguns programas sanitários como, por exemplo, o Programa de Redução de Patógenos (GOUVÊA et al., 2012; TESSARI

et al., 2008).

De acordo Maldonado (2008), alguns produtos de origem animal como carnes, leite e ovos estão envolvidos em DTA's, especialmente, por apresentarem características epidemiológicas favoráveis à veiculação de *Salmonella* spp. A Salmonelose Aviária é a DTA de maior preocupação em saúde pública, pois tem sido responsável por custos elevados para o controle, prevenção e tratamento, atingindo tanto países desenvolvidos como países em desenvolvimento.

Shinohara et al. (2008) afirmam que, no homem, a infecção por *Salmonella* spp. ocorre geralmente pelo consumo de carne de frango e ovos, e que a manifestação mais comum é um quadro patológico gastrointestinal e infeccioso com sintomas de dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito. Geralmente, nos casos não complicados, a melhora do quadro ocorre em dois a três dias, não necessitando de hospitalização e tratamento com antibióticos. No entanto, a doença provoca afastamento laboral e pode ser letal em crianças, idosos ou imunocomprometidos, devido à menor resistência desses às infecções. Além disso, a Salmonelose veiculada por alimentos de origem aviária está fortemente relacionada à transmissão de genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Segundo Souza et al. (2014), o setor supermercadista caracteriza-se pela mediação entre a indústria e o consumidor, sendo o elo na cadeia de comercialização de produtos alimentícios. Dessa forma, é responsável pela manutenção da qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor, através do controle e da promoção das condições satisfatórias de temperatura, limpeza, rotatividade dos estoques e ventilação, para garantir a conquista e manutenção de bons padrões de higiene (MACEDO et al., 2000). O armazenamento dos alimentos na temperatura correta, especialmente dos de origem animal, é de fundamental importância para que a conservação seja feita adequadamente, sendo essencial para evitar as DTA's no homem, além de contribuir para a preservação da vida útil dos produtos alimentícios (LISTON, 2008).

Dentro do sistema de produção avícola, as aves e seus subprodutos podem ter várias fontes de infecção por *Salmonella* spp., como as aves de reposição, incubatórios, ambiente de criação, abatedouro, pessoas, pássaros, falhas na biossegurança, manejo, instalações e ração, entre outros. A contaminação pode ocorrer desde a granja, transporte, abate e se estender até o processo de industrialização, sendo que a maioria dos estudos aponta que as aves já vêm infectadas da própria unidade de produção (CARDOSO e TESSARI, 2008).

Dentro da cadeia epidemiológica da Salmonelose Humana, uma irregularidade na temperatura de armazenamento de carcaças de frangos em supermercados é passível de favorecer a proliferação da *Salmonella* spp. em carcaças previamente infectadas nas granjas ou nos abatedouros, provocando um aumento da carga *Salmonella* spp. e outras bactérias ubíquias capaz de desencadear um processo patológico. Segundo Pollonio (1999), o armazenamento em temperaturas incorretas pode aumentar a susceptibilidade

à DTA's devido à proliferação de bactérias, além de provocar descoloração interna do produto, depressões na superfície e morte de tecidos, falta de sabor e aroma, além de manchas na carne.

Nesse contexto, verificou-se a necessidade de buscar informações sobre a temperatura de armazenamento de carcaças de frangos disponíveis para o consumo em supermercados, como das condições higiênico-sanitárias das ilhas de refrigeração onde ficam expostas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a temperatura de armazenamento e as condições higiênico-sanitárias das ilhas de refrigeração de quatro supermercados de um município do interior do Estado de Goiás e comparar com as determinações da legislação em vigência. A justificativa desse estudo se faz pela importância de se regular a temperatura de comercialização de carnes de frango em supermercados, que poderá estar fora do padrão de armazenamento determinado pela legislação em vigor e, assim, favorecer a proliferação de *Salmonella* spp. em carcaças previamente contaminadas pela bactéria na fase de produção ou de abate. De acordo com o *Codex Alimentarius*, há a necessidade e preocupação da sociedade em se obter uma alimentação segura.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo exploratório-descritivo, através de uma pesquisa de campo, em quatro supermercados, identificados como supermercados A, B, C e D. Cada unidade varejista era pertencente a redes diferentes supermercadista de uma cidade do interior do Estado de Goiás. No período entre 17 a 23 de maio de 2016, foi realizada uma visita diária em cada supermercado, nos horários entre doze e quatorze horas, perfazendo um total de sete aferições no período de observação.

Durante as visitas, foram realizadas a leitura da temperatura registrada no termostato fixo na ilha de resfriamento, com o registro da temperatura de armazenamento preconizada pelo fabricante e contida nas embalagens dos produtos, bem como uma inspeção das condições higiênico-sanitárias das ilhas de resfriamento, mediante as normas de boas práticas higiênicas.

Ao final do período de observação, fez-se a comparação dos resultados com os critérios estabelecidos pela legislação vigente, contidos na Instrução Normativa da Diretoria de Vigilância Sanitária – DIVISA/SVS – Nº 4 de 15 de dezembro de 2014, que regulamenta que as carnes de frango refrigeradas devem ser armazenadas ilhas de refrigeração com temperatura entre 0 °C e 7 °C, e com boas condições higiênicas (BRASIL, 2014) e, ainda, fez-se a comparação com a temperatura inscrita na embalagem, recomendada pelo frigorífico produtor.

RESULTADOS

Os resultados apontaram que todos os supermercados apresentaram irregularidades em relação à temperatura de armazenamento dos frangos, quando comparados com os critérios definidos pela legislação e pelo fabricante, constatando temperaturas abaixo ou acima dos limites permitidos, como mostrado nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Ordem de aferição	Temperatura no termostato na Ilha de Resfriamento (°C)	Temperatura indicada na Embalagem (°C)
1ª	-2	7
2ª	-1	7
3ª	-1	7
4ª	-1	7
5ª	0	7
6ª	0	7
7ª	0	7

Tabela 1- Leitura da temperatura da ilha de resfriamento e temperatura indicada pelos fabricantes no supermercado A.

Ordem de aferição	Temperatura no termostato na Ilha de Resfriamento (°C)	Temperatura indicada na Embalagem (°C)
1ª	10	4
2ª	10	4
3ª	10	4
4ª	10	4
5ª	10	4
6ª	10	4
7ª	10	4

Tabela 2- Leitura da temperatura da ilha de resfriamento e temperatura indicada pelos fabricantes no supermercado B.

Ordem de aferição	Temperatura no termostato na Ilha de Resfriamento (°C)	Temperatura indicada na Embalagem (°C)
1ª	-3,7	4
2ª	-2,4	4
3ª	-1,9	4
4ª	-3	4
5ª	-4	4
6ª	-1,9	4
7ª	-3	4

Tabela 3- Leitura da temperatura da ilha de resfriamento e temperatura indicada pelos fabricantes no supermercado C.

Ordem de aferição	Temperatura no termostato na Ilha de Resfriamento (°C)	Temperatura indicada na Embalagem (°C)
1ª	-15	4
2ª	-15	4
3ª	-24	4
4ª	-15	4
5ª	-15	4
6ª	-18	4
7ª	-3	4

Tabela 4- Leitura da temperatura da ilha de resfriamento e temperatura indicada pelos fabricantes no supermercado D.

Em relação aos padrões higiênico-sanitários das ilhas de resfriamento, verificou-se que, nos supermercados B, C e D, as condições de embalagens estavam intactas e sem sujidades, ou seja, seguiam as boas práticas higiênico-sanitárias no local de armazenamento e ambiente de exposição dos produtos. Somente no supermercado A, ou seja, 25% dos estabelecimentos avaliados, a forma de armazenamento tornou o alimento inseguro para consumo, como observado no quadro 1 e no gráfico 1.

Supermercado	Inspecção nas Ilhas de Resfriamento	Observação
A	Embalagens imersas em sangue, presença de insetos e poeira, além de algumas embalagens se apresentarem rompidas	Produtos NÃO apropriados ao consumo
B	Produtos em boas condições higiênicas	Produtos apropriados ao consumo
C	Produtos em boas condições higiênicas	Produtos apropriados ao consumo
D	Produtos em boas condições higiênicas	Produtos apropriados ao consumo

Quadro 1- Inspecção das condições higiênico-sanitárias nas Ilhas de Resfriamento dos supermercados.

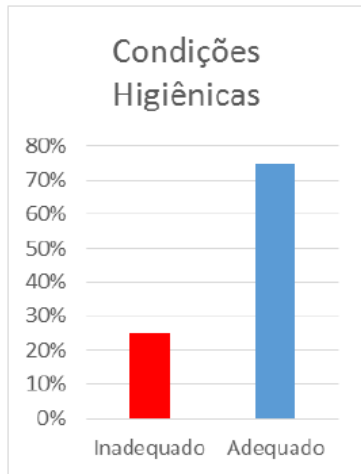


Gráfico 1- Percentual de inadequação e adequação dos produtos nas ilhas de resfriamento dos supermercados para consumo, em relação às condições higiênico-sanitárias.

DISCUSSÃO

A Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 de 15 de dezembro de 2014 é o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação. Esse documento aborda que as carnes refrigeradas devem ser armazenadas entre 0 °C e 7 °C ou conforme recomendação do frigorífico produtor, em boas condições higiênicas (BRASIL, 2014). Nesta pesquisa, os resultados apontaram que todos os supermercados apresentaram irregularidades em relação à temperatura de armazenamento dos frangos, quando comparados com os critérios definidos pela legislação e pelo fabricante, constatando temperaturas abaixo ou acima dos limites permitidos, como mostrado nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Em particular, no supermercado B, a situação se faz mais crítica, pois a temperatura de armazenamento estava acima do limite máximo permitido, conforme a tabela 2, ou seja, 3 °C acima da temperatura preconizada pela legislação e 6 °C acima da temperatura preconizada pelo fabricante que é 4 °C, o que favorece a proliferação de bactérias psicrófilas facultativas como é o caso da *Salmonella* spp. O armazenamento de alimentos a temperaturas acima de 10 °C podem permitir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos nos alimentos, colocando em risco a segurança dos produtos e sua vida útil. Portanto, é importante considerar que todos os alimentos acondicionados em temperaturas acima de 7 °C sejam inutilizados para o consumo pelo supermercado, pois temperaturas elevadas aumentam as chances de multiplicação microbiana e compromete a integridade dos alimentos. Os equipamentos de resfriamento deverão ser utilizados de maneira que os produtos sejam mantidos na faixa de temperatura regulamentada (LISTON,

2008).

Os supermercados A, C e D, foi possível constatar que as temperaturas aferidas estavam abaixo do limite mínimo (Tabelas 1, 3 e 4), que apesar de não estarem de acordo com os critérios estabelecidos, não fornecem risco de proliferação de enterobactérias causadoras de DTA's, uma vez que as carcaças estavam sendo mantidas em temperatura de congelamento. Segundo Tessari et al. (2008), para manter a qualidade de produtos perecíveis, é necessário que as temperaturas dos equipamentos da rede de frio sejam mantidas dentro da faixa regulamentada, para isso torna-se necessário o uso de termostatos, e que os mesmos sejam aferidos e mantidos em regime de manutenção periódica. O termostato é uma ferramenta que facilita o trabalho de fiscalização e controle da temperatura dos equipamentos.

Em relação aos padrões higiênico-sanitários das ilhas de resfriamento, verificou-se que, nos supermercados B, C e D, as condições de embalagens estavam intactas e sem sujidades, ou seja, seguiam as boas práticas higiênicas no local de armazenamento e ambiente de exposição dos produtos. Somente no supermercado A, ou seja, 25% dos estabelecimentos avaliados, a forma de armazenamento tornou o alimento inseguro para consumo, como mostra o quadro 1 e o gráfico 1. Nesse supermercado, observou-se que os produtos expostos estavam em contato com outros sem divisórias apropriadas, e ainda, na presença de sangue, insetos, umidade e poeira, além de algumas embalagens se apresentarem rompidas. Segundo Maldonado (2008), essas condições favorecem a proliferação de *Salmonella* spp. em produtos previamente contaminados pela bactéria na fase de produção ou de abate e ocasionando perdas econômicas e riscos à saúde da população.

De acordo com as condições térmicas e sanitárias encontradas, é necessário uma vigilância epidemiológica e sanitária municipal mais efetiva na fase de conservação e de condicionamento térmico destes produtos, além do controle das condições higiênicas praticadas pelo terceiro setor. A Organização Pan-Americana de Saúde recomenda, sempre que possível, a adoção de um enfoque baseado no Sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP), para aumentar segurança alimentar, conforme descrito no Sistema HACCP e nas Diretrizes para sua Aplicação (OPAS, 2006).

CONCLUSÃO

Os resultados observados permitem concluir que a saúde da população do município onde o estudo foi realizado pode estar em risco. As temperaturas encontradas nas ilhas de resfriamento, acima do limite superior preconizado pela Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 de 15 de dezembro de 2014, permitem a proliferação de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, entre outros patógenos. As carcaças de frango podem ser previamente contaminadas pela enterobactéria na fase de produção ou durante o abate, fazendo-se

necessário uma vigilância epidemiológica e sanitária mais eficaz na fase de conservação e de condicionamento térmico destes produtos, além do controle das condições higiênicas praticadas pelo terceiro setor.

As precárias condições de higiene também podem favorecer a proliferação de *Salmonella* spp., pois a presença de sangue é um ótimo meio de cultura para as enterobactérias e os insetos são importantes vetores mecânicos de patógenos. Além disso, quando a temperatura, a umidade e outros controles ambientais não se encontram regulados, as carnes ficam particularmente vulneráveis à sobrevivência e ao crescimento de *Salmonella* spp. e outros microrganismos responsáveis pela deterioração destes produtos.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa DIVISA/SVS nº 4 de 15 de dezembro de 2014. **Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção.** Diário Oficial do Distrito Federal nº 31, Brasília, 11 fev 2015.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. **Salmonela na Segurança dos Alimentos e na Avicultura.** Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola. São Paulo, SP. Número 80. 27/08/2008. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=80. Acesso em: 25/05/2016.
- GOUVÊA, R.; SANTOS, F. F.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M.; PEREIRA, V. L. A. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico do Saber, **Isolamento Bacteriológico e PCR na Detecção de Salmonella spp. em Peito de Frango de Estabelecimento Varejista.** Goiânia, v.8, n.15. p. 1129 – 1135.2012.
- LISTON, P.H. **Avaliação da Temperatura na Rede de Frio em Mercados no Município de Pinhais-PR.** 2008. 86 p. Monografia (Pós-Graduação “Lato Sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Curitiba/PR. Disponível em: <http://www.qualittas.com.br/documentos/Avaliacao%20da%20Temperatura%20%20Paulo%20Henrique%20Linston.PDF>. Acesso em 25 de maio de 2016.
- MACEDO, J. A. B. et al. Avaliação da Temperatura de Refrigeração nas Gôndolas de Exposição de Derivados Lácteos em Supermercados da Região de Juiz de Fora/MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.55, n.315, p.41-47, julho/agosto/2000. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br/TEMPERATURADEREFRIGERACAO.pdf>>.
- MALDONADO, A. G. **Ocorrência de Salmonella spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo:** Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Higiene dos Alimentos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Food and Agriculture Organization of the United Nations. – Brasília, 2006
- POLLONIO, M. A. R. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário e Aspectos Organizacionais para Supermercados de Pequeno e Médio Porte.** São Paulo: Metha,1999. 154p.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, S. E. L.; PAZ, D. S.; BRATIFICH, K. S. B.; SEBASTIÃO, C.; SILVA, L. G.; RODRIGUES, R. A. Armazenamento térmico de frangos resfriados em supermercados e o risco de transmissão de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 11, p. 87.679-87.687, nov. 2020.

SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 107-112, 2014.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. N. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2557 – 2560, 2008.

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE SOFOROLÍDIOS EM COSMÉTICOS

Data de aceite: 01/04/2021

Giovanna Amaral Filipe

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR

RESUMO: Com a evolução do mercado de cosméticos, a procura por ingredientes ativos multifuncionais com qualidade e características sustentáveis, tem sido o objetivo dos pesquisadores. Nesse sentido, os sofrorolípídios se destacam como biomoléculas para aplicação em produtos cosmeceúticos pelas suas propriedades biológicas, biodegradabilidade e sustentabilidade. Os sofrorolípídios são glicolípídios constituído por uma sofrorse e uma cadeia de ácido graxo e a produção está relacionada com o microrganismo utilizado e as condições de fermentação, que refletem no rendimento e na variação estrutural dos sofrorolípídios. As estruturas definem as suas propriedades e a possível área de aplicação. Este capítulo descrever a produção de sofrorolípídios,

suas propriedades e aplicações na área de cosmetologia.

PALAVRAS - CHAVE: sofrorolípídios, cosmeceúticos, antimicrobiano, antioxidante, hidratante .

ABSTRACT: With the evolution of the cosmetics industry, the search for high quality multifunctional active ingredients with sustainable characteristics has been the aim of the researchers. In this sense, sophorolipids stand out as biomolecules for application in cosmeceutical products due to their biological properties, biodegradability and sustainability. Sophorolipids are glycolipids composed of a sophorosis and a fatty acid chain and its production is related with the used microorganism and the fermentation conditions, which reflect on the yield and the structural variation of the sofrorolípídios. The structures define its properties and the possible application area. This chapter describes the production of sofrorolípídios, its properties and applications in the field of cosmetology.

KEYWORDS: sophorolipid, cosmeceutical, antimicrobial, antioxidant, moisturizer.

1 | INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPIC) tem abordado questões ligadas a biotecnologia e química verde reconhecendo importância de produções que foquem na sustentabilidade do planeta. Dessa forma, o direcionamento de pesquisas com produtos de propriedades biológicas e novas substâncias,

que garantam uma produção mais limpa e sustentável são essenciais. Segundo dados da ABIHPEC, de 2019, o mercado de produtos naturais tem ganhado espaço em todo o território nacional, com expectativa de faturamento de US\$ 25,11 bilhões até 2025. Os consumidores estão buscando os benefícios do cosmético natural, principalmente em produtos para a pele, com previsão de crescimento de 5% a 10% nos próximos anos.

Com a busca por novos ingredientes, os surfactantes industriais como lauril sulfato de sódio e lauril sulfato de amônio, amplamente utilizados como ingredientes em cosméticos, deixam de ser interessantes. Os biosurfactantes naturais representam menores problemas ambientais, sendo biodegradáveis, não tóxicos e atendem à demanda ambiental, social e econômica da sociedade atual. Sendo assim, um dos biosurfactantes, os soforolipídios têm sido estudados e produzidos devido às características sustentáveis além das propriedades biológicas, oferecendo grande potencial para a aplicação como ingrediente ativo em formulações cosmeceúticas.

Os soforolipídios são compostos por um açúcar (sofrose) e um ácido graxo de cadeia longa, produzidos principalmente por leveduras não patogênicas, destacando *Starmerella bombicola* com bons rendimentos. Essas moléculas apresentam como propriedades biológicas a alta permeação e compatibilidade com a pele, propriedades hidratantes, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

Destacando a propriedade antimicrobiana dos soforolipídios e relacionando com infecções bacterianas da pele como a acne, que é um exemplo de doença crônica da pele, que acarreta em deformações dermatológicas e possui efeitos psicológicos aos pacientes. A doença é ocasionada por diversos fatores, entre eles o envolvimento da bactéria oportunista *Cutibacterium acnes*, juntamente com um desequilíbrio geral de outros microrganismos da pele, os quais ativam as defesas do sistema imunológico do hospedeiro, causando inflamação cutânea. Logo, o uso de ingredientes com atividade antimicrobiana em formulações cosmeceúticas é uma inovação tecnológica com vantagens para o mercado.

Considerando a busca por moléculas sustentáveis, bioativas e multifuncionais para aplicação em formulações cosmeceúticas, esse capítulo tem como objetivo descrever a produção de soforolipídios, bem como as suas propriedades biológicas e inovadoras para aplicações na indústria cosmética.

2 | SOFOROLIPÍDIOS: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOSÍNTESE

Os soforolipídios são biosurfactantes microbianos, pertencentes à classe dos glicolipídios. Estruturalmente, eles foram identificados por Asmer *et al.* (1988) como glicolipídio constituído pelo dissacarídeo sofrose (O- β -D-glicopiranosil-2-1- β -D-glicopiranosose) unido por ligação β -glicosídica com o carbono terminal (ω) ou sub-terminal ($\omega-1$) de uma cadeia de ácido graxo. Durante a fermentação, uma mistura de formas ácidas e/ou lactônicas são produzidas, onde a cauda de ácidos graxos pode estar livre na primeira

forma ou esterificada com o carbono da soforose na segunda variação apresentando uma estrutura de anel fechado.

A levedura *Starmerella bombicola* se destaca como boa produtora de soforolípídios, predominando a forma lactônica diacetilada (posição 6', 6''), com cadeia de ácidos graxo monoinsaturada (C18:1) quando usado o substrato hidrofóbico ácido oleico (SILVEIRA *et al.*, 2019). Entretanto, utilizando a mesma cepa de levedura, com mudança do substrato para gordura residual de frango, foi identificado como predominante em 73,55% de soforolípídios ácidos monoacetilados (C18:2) e 26,44% da forma lactônica diacetilada (C18:1) (FONTOURA *et al.*, 2020).

A alteração do meio de produção leva a formação de diferenças estruturais da molécula e estão relacionadas ao padrão de acetilação, comprimento da cadeia, saturação, posição da hidroxilação do ácido graxo e as proporções das formas ácidas e lactônicas. Essas variações refletem também nas propriedades físico-químicas e biológicas, o que direciona para a aplicação em áreas como agricultura, alimentos, biorremediação, cosméticos, farmacêuticas entre outras (MA *et al.*, 2020).

A biossíntese de soforolípídios começa ao final da fase exponencial e início da fase estacionária do crescimento do microrganismo, com uma fonte de carbono hidrofílica e uma lipofílica e em condições de nitrogênio limitante. Primeiramente, é necessária a disponibilização dos ácidos graxos a partir de substratos lipofílicos, fornecidos ao meio de produção que podem ser metabolizados na via de β -oxidação, quando há necessidades energéticas ou de atuar como precursor para a síntese de soforolípídios (ROELANTS *et al.*, 2019). A incorporação dos ácidos graxos aos soforolípídios pode ser direta quando na presença de ácidos graxos de 16 a 18 carbonos, devido à especificidade da enzima monooxigenase, enquanto que substratos de cadeia carbônica menores são alongados (através de Acetil-CoA) ou metabolizados pela β -oxidação (ZERHUSEN *et al.*, 2019).

Posteriormente, ocorre a incorporação de duas moléculas de glicose (fonte hidrofílica) pelas glicosiltransferases, dando origem aos soforolípídios ácidos não acetilados. As variações estruturais como as acetilações ocorrem pela enzima acetiltransferase utilizando Acetil-CoA. A formação de derivados lactônicos acontece após o transporte para o espaço extracelular, por uma proteína transportadora e uma reação de esterificação pela lactonaesterase (ROELANTS *et al.*, 2019).

3 | PRODUÇÃO DE SOFOROLÍPIDIOS E MICRORGANISMOS

A produção de soforolípídios está relacionada com a composição do meio de cultura, o microrganismo utilizado e as condições do processo fermentativo. A maioria das pesquisas sobre produção de soforolípídios utiliza substratos de primeira geração, como glicose e óleos vegetais, mas também tem um número crescente de pesquisas com substratos residuais de segunda geração (DRAKONTIS e AMIN, 2020).

Van Bogaert *et al.* (2011) descreveram que uma produção eficiente ocorre utilizando glicose como fonte hidrofílica, óleos, alcanos e ácidos graxos como fonte hidrofóbica e uma fonte de nitrogênio. Também pode ser adicionado, outras substâncias como citrato (composto tamponante) e sais minerais como Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Na^+ que auxiliam no crescimento do microrganismo. A produção ocorre em tempos tardios característica de um metabólito secundário, em temperaturas de 25°C a 30 °C e pH próximo de 3,5 sob condições de oxigenação entre 50 e 80 mM $O_2 L^{-1} h^{-1}$ ideal para o funcionamento da enzima monooxigenase.

Kurtzman *et al.* (2010) realizaram análise filogenética e fermentação com glicose, ácido oleico, extrato de levedura e sais como substratos para a produção de sofrorolipídios por 26 espécies de leveduras. Baseado nas análises filogenéticas as melhores produções foram para *Candida apícola* (52,7 g.L⁻¹); *S. bombicola* (48,9 g.L⁻¹); uma nova espécie *Candida sp. NRRL Y-27208* (20,1 g.L⁻¹); *Candida stella* (11,9 g.L⁻¹) e *C. riidocensis* (8,3 g.L⁻¹).

Outros microrganismos produtores de sofrorolipídios tem sido descritos como a *Wickerhamiella domercqiae* que alcançou uma produção de 40,7 g.L⁻¹ em meio com glicose e ácido oleico (LIU *et al.*, 2016); *Rhodotorula bogoriensis* (51,0 g.L⁻¹) em glicose e extrato de levedura (SOLAIMAN *et al.*, 2015a) e *Rhodotorula babjevae* (16,6 g.L⁻¹) em glicose e meio mineral (SEN *et al.*, 2017). Entretanto, o microrganismo mais estudado como bom produtor é a levedura não patogênica, *Starmerella bombicola*, devido aos altos rendimentos de produção e conversão eficiente de substrato em produto (Van Bogaert *et al.*, 2011).

Além da composição do meio e da espécie de microrganismo utilizada, o processo fermentativo é de extrema importância para se obter uma produção elevada. Zhang *et al.*, (2018) estudaram sistemas de batelada, batelada alimentada e com reciclagem de células utilizando *C. albicans* O-13-1, obtendo produções elevadas de 104,7 a 484,0 g.L⁻¹ de sofrorolipídios e determinando a importância de se estudar o mecanismo para a produção da biomolécula.

Estudos mais recentes têm buscado a otimização de processos fermentativos de produção dos sofrorolipídios, visto que o aumento de escala eleva significativamente os custos de produção, o que ainda é um desafio. Estratégias adotadas por pesquisadores para a diminuição de custos de produção são utilização de substratos de baixo custo, ferramentas estatísticas de otimizações e uso de cepas modificadas geneticamente (QUEIROZ *et al.*, 2019). A Tabela 1 descreve os estudos recentes com a utilização de substratos simples e residuais utilizando *S. bombicola*.

Tipo de fermentação	Substratos e condições de fermentação	Produção	Referência
Erlenmeyer Batelada	Glicose, gordura de frango, extrato de levedura e ureia; 30°C; 150 rpm por 120 h	39,8 g.L ⁻¹	Minucelli <i>et al.</i> , 2016
Erlenmeyer Batelada	Glicose, óleo de peixe, extrato de levedura e sais; 25°C; 180 rpm por 168h	21,8 g.L ⁻¹	Hoa <i>et al.</i> , 2017
Erlenmeyer Batelada	Glicose, óleo de petróleo, extrato de levedura e ureia; 30°C; 180 rpm por 120h	26 g.L ⁻¹	Shah <i>et al.</i> , 2017
Biorreator Batelada Alimentada	Hidrolisado de palha de milho e resíduo de óleo (graxa amarela); 25 °C, 500 rpm por 168 horas	52,1 g.L ⁻¹	Samad <i>et al.</i> , 2017.
Biorreator De Leito Fixo Sólido	Melaço e ácido esteárico; 30°C, 75% de umidade por 384 h	0,211 g.g substrato	Jimenez-Peñalver <i>et al.</i> , 2018.
Biorreator Batelada	Glicose, resíduo de óleo de girassol, extrato de levedura, ureia e sais; 30°C; 550 rpm por 192h	51,5 g.L ⁻¹	Jadhav <i>et al.</i> , 2019
Biorreator Batelada Alimentada	Glicose, comida desperdiçada hidrolisada e ácido oleico 30°C; 1600 rpm por 92 h	115,2 g L ⁻¹	Kaur <i>et al.</i> , 2019
Biorreator Batelada Alimentada	Glicose, ácido oleico e extrato de levedura 30°C, 450 rpm por 288h	69,83 g L ⁻¹	Silveira <i>et al.</i> , 2019.
Biorreator Batelada	Glicose, ácido oleico e extrato de levedura 30°C; 450 rpm por 120h	67,0 g L ⁻¹	Hipólito <i>et al.</i> , 2020.
Biorreator Batelada Alimentada	Glicose, biodiesel, extrato de levedura, peptona e sais 25°C por 144h	224 g L ⁻¹	Kim <i>et al.</i> , 2020.

* valores de produção máxima encontrado. Fonte: Próprio autor

Tabela 1. Produção de sofrorolipídios por *Starmerella bombicola* variando as condições de fermentação

Entre os fatores importantes para o rendimento e produção dos sofrorolipídios, além das condições de fermentação, as etapas de purificações e caracterizações são necessárias para as futuras aplicações. A separação dos sofrorolipídios do meio fermentativo tem sido feita utilizando solventes orgânicos (acetato de etila e hexano) e quantificação por gravimetria (peso seco) ou cromatografia líquida de alta eficiência. A caracterização da molécula pode ser por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou espectroscopia de massas, onde é possível a identificação das diferentes formas estruturais dos sofrorolipídios (FONTOURA *et al.*, 2020).

4 | PROPRIEDADES COSMECÊUTICAS DOS SOFOROLIPÍDIOS

As propriedades biológicas e cosmecêuticas dos sofrorolipídios são de interesse dos pesquisadores para aplicação industrial. Hillion *et al.* (1998) descreveram em uma patente a atividade de inibição radicais livres, atividade de inibição da elastase e atividade anti-inflamatória dos sofrorolipídios em uma formulação cosmética.

Outras patentes foram depositadas por Borzeix (1999) que desenvolveu o uso de soforolipídios como agente estimulante do metabolismo de fibroblastos dérmicos e síntese de colágeno. Maingault (1999) utilizou os soforolipídios como ativo terapêutico em formulações cosmeceúticas para tratamentos de pele (propriedades despigmentantes e descamativas) e também Pellecier e André (2004) utilizou como agente regulador de adipócitos subcutâneas.

Além das propriedades citadas, outros estudos têm se destacado para aplicações dessas moléculas em produtos cosmeceúticos, como a atividade anticâncer (MOHAMED *et al.*, 2019), antimicrobiana (SILVEIRA *et al.*, 2018, 2019, 2020; FONTOURA *et al.*, 2020) e antifúngica (HIPÓLITO *et al.*, 2020).

Devido as suas propriedades e características, os soforolipídios apresentam potencial como ingrediente ativo a ser aplicado em formulações cosmeceúticas, destacando principalmente as suas propriedades de solubilidade e permeação na pele, antioxidante e antimicrobiana.

4.1 Solubilidade e Permeação na pele

A solubilidade dos soforolipídios varia de acordo com o pH do meio. Essas moléculas se tornam insolúveis em pH inferiores a 5, aumentando a solubilidade em valores de pH de 5,6-5,8, se tornando totalmente solúvel em pH 6,0. Entretanto, valores maiores que 7,0 – 7,5 acontece a hidrólise dos grupos acetil da estrutura do soforolipídios, tornando-os instáveis (VAN BOGAERT *et al.* 2011; VARVARESOU e IAKOVOU 2015).

A permeação de biossurfactantes através da pele está relacionada a semelhança estrutural com a membrana celular. A taxa relativa de difusão de compostos na bicamada lipídica das células depende de afinidades dos compostos em contato, assim substâncias lipofílicas atravessam membranas mais facilmente que compostos hidrofílicos. O uso de substâncias lipofílicas em cosméticos como loções, géis e cremes possibilita a permeação dos princípios ativos da formulação oferecendo a ação desejada às células, podendo ainda aumentar a umidade da pele de acordo com a formulação (VECINO *et al.*, 2017).

4.2 Atividade antioxidante

Produtos com propriedades antioxidantes podem retardar os efeitos cutâneos dos radicais livres e desperta o interesse social e industrial. O excesso de radicais livres e o estresse oxidativo causados por desequilíbrios no organismo pode acarretar mudanças fisiológicas e bioquímicas na pele humana, sendo relacionados a fatores de envelhecimento, inativação de enzimas e peroxidações lipídicas ocasionando rugas (FRIES e FRASSON, 2010).

Hillion *et al.* (1998) desenvolveram formulações de emulsão de fase aquosa e de fase oleosa, contendo soforolipídios produzido em diferentes óleos vegetais (azeite, óleo de amêndoas doce, óleo de noz e óleo de coco hidrogenado) e comprovaram sua ação

antioxidante. Os soforolipídios produzidos apresentaram efeito antioxidante de 97% a 100% nas concentrações de 0,028% e 2,5% (p/v) respectivamente, verificados pela técnica de ressonância paramagnética eletrônica. As formas ácidas apresentaram captura de radicais livres de 98% com 0,0092% de soforolipídios (p/v). Os soforolipídios foram eficientes também para proteger células de fibroblastos contra radicais gerados por luz ultravioleta na concentração de 0,125g/mL.

Yang *et al.* (2012) estudaram a atividade antioxidante de soforolipídios de *S. bombicola* produzidos com óleo de soja e ácido oleico pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Os resultados mostraram uma atividade antioxidante de 15 a 60% com concentrações de 3,125 mg/mL até 50 mg/mL de soforolipídios. Hoa *et al.* (2017) realizaram a produção de soforolipídios utilizando óleo de peixe e avaliaram a atividade antioxidante pelo mesmo método, tendo com porcentagem de inibição 10 a 80% e a concentração inibitória de 4,45 mg/mL.

4.3 Atividade antimicrobiana

Espécies microbianas que residem permanentemente na pele, estão em equilíbrio dinâmico com o tecido do hospedeiro e são constituídas de bactérias Gram-positivas *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter*, e principalmente *Staphylococcus epidermidis* (cerca de 90%). No entanto, alguns patogênicos podem estar presentes como *Staphylococcus aureus* relacionado a dermatites, bem como microrganismos transitórios *Escherichia coli*, *S.aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (VECINO *et al.*, 2017).

Os soforolipídios apresentam potencial antimicrobiano e tem sido estudado esta propriedade desde o final dos anos 1980. Um dos primeiros relatos de soforolipídios como agentes antimicrobianos foi de Lang *et al.* (1989) onde os pesquisadores testaram soforolipídios de *S. bombicola* para bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecium* e *Propionibacterium acne*; Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e para os fungos *Candida albicans* e *Glomerella cingulata*. As formas lactônicas mono e diacetilada apresentaram concentração inibitória mínima de 6 a 15 µg/mL para *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *S. faecium* e a forma ácida inibiu somente *B. subtilis*.

A atividade antimicrobiana dos soforolipídios está relacionada com as suas porções de açúcares e lipídios causando mudanças ou ruptura da membrana celular, induzindo a lise e extravasamento do conteúdo citoplasmático das bactérias alvo. Assim, os soforolipídios, pelas suas características anfífilas, alteram as propriedades das membranas plasmáticas dos patógenos, apresentando assim características germicida contra bactérias Gram positivas e Gram-negativas (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Nos estudos de Fontoura *et al.* (2020) os efeitos de atividade antimicrobiana dos soforolipídios de *S. bombicola* contra patógenos humanos, demonstraram melhores efeitos

contra bactérias Gram positiva do que Gram negativa. Os testes antimicrobianos foram realizados pela técnica de concentração inibitória mínima (MIC) e disco-difusão em ágar, com soforolipídios produzidos por *S. bombicola*. Como resultado, esses soforolipídios apresentaram MIC de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *S. aureus*, *S. mutans* e *E. faecium* e de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *E. coli*, *Salmonella enterica* e *Proteus mirabilis*.

O desequilíbrio fisiológico entre espécies residentes na pele humana, mais especificamente envolvendo o microrganismo *Cutibacterium acnes*, gera o desenvolvimento de acne, uma doença crônica que causa seborreia, dor, lesões e cicatrizes, influenciando também em efeitos psicológicos e no bem-estar do paciente (XU e LI 2019; RAMASAMY *et al.*, 2019). De acordo com Cong *et al.* (2019) *C. acne* possui propriedades virulentas que induzem a degradação do tecido hospedeiro, incluindo liberação de lipases, liases e outros fatores. Os agentes anti-acne comumente usados são os retinóides, peróxido de benzoíla, ácido azelaico, antibióticos e agentes hormonais. Porém, foi observado o desenvolvimento de cepas resistentes a antibióticos e às próprias células inflamatórias do hospedeiro, trazendo dificuldades para os tratamentos dos pacientes.

Pesquisadores como Ashby *et al.* (2011) e Solaiman *et al.* (2015b) estudaram os efeitos de soforolipídios em filmes biopoliméricos contra a bactéria oportunista da acne *Cutibacterium acne*, e demonstraram eficácia na sua utilização. As vantagens desses estudos estão na utilização de tratamentos talvez menos caros que tratamentos hormonais possibilitando novos produtos a serem explorados.

5 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os soforolipídios, são biossurfactantes microbianos com propriedades biológicas importantes e grande potencial como ingrediente ativo para a indústria de cosméticos. A sua estrutura garante atividade antimicrobiana, contra patógenos importantes da pele, além das propriedades antioxidantes contra radicais livres e capacidade hidratante. A compatibilidade estrutural com a pele humana permite uma alta taxa de permeabilização dos soforolipídios, proporcionando a entrada do ativo nas células e assegurando os efeitos desejados na pele.

O desenvolvimento de novos produtos cosméticos inovadores e sustentáveis, com ingredientes naturais, com moléculas bioativas e multifuncionais é de grande importância para a indústria cosmética, assim os soforolipídios são biomoléculas com propriedades biológicas de grande interesse para o desenvolvimento de novas formulações cosmeceúticas além, de ser um composto inovador e sustentável.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq).

REFERÊNCIAS

ASMER, H.-J., LANG, S., WAGNER, F., & WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n.9, p. 1460–1466, 1988.

ASHBY, R. D., ZERKOWSKI, J. A., SOLAIMAN, D. K. Y., & LIU, L. S. Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*. **New Biotechnology**, v.28, n.1, p.24–30, 2011.

BORZEIX, C.F. Use os sophorolipids comprising diacetyl lactones as agent for stimulating skin fibroblast metabolism. **World patente** 99/62479, december 12, 1999.

CONG, T-X. HAO, D.; WEN, X.; LI, X-H.; HE, G., JIANG, X. From pathogenesis of *ace vulgaris* to anti-acne agentes. **Archives of Dermatological Research**, v.311, p.337-349, 2019.

DRAKONTIS, C.E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.48, p. 77-90, 2020.

FONTOURA, I.C.C.; SAIKAWA, G.I.A.; SILVEIRA, V.A.I. Antibacterial Activity of Sophorolipids from *Candida bombicola* Against Human Pathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63 e20180568, 2020.

FRIES, A.T.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, v.10, n.19, p.17-23, 2010.

HILLION, G.; MARCHAL, R.; STOLTZ, C.; BORZEIX, C.F. Use of a sophorolipid to provide free radical formation inhibiting activity or elastase inhibiting activity. **U.S. patente** 5756471, May 26, 1998.

HIPÓLITO, A.; DA SILVA, R.A.A.; CARETTA, T.O.; SILVEIRA, V.A.I.; AMADOR, I.R.; PENAGIO, L.A.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M.A.P.C. Evaluation of antifungal activity os sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.29, 101797, 2020.

HOA, N.L.H.; LOAN; L.Q; SANG.V.T. Production and characterization os sophorolipids by *cândida bombicola* using catfish fat. **Natural sciences and technology**, v. 14, n. 9, p.152-159, 2017.

JADHAV, J. V., PRATAP, A. P., & KALE, S. B. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. **Process Biochemistry**, 2019.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; CASTILLEJOS, M.; KOH, A.; GROSS, R.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. et al Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v.172, p.2735–2747, 2018.

KAUR, G.; WANG, H.; TO, M. H.; ROELANTS, S. L. K. W.; SOETAERT, W.; & LIN, C. S. K. Efficient sophorolipids production using food waste. **Journal of Cleaner Production**, v.232, p.1–11, 2018.

KIM, J.-HUN; OH Y.-RI; HWANG, J.; JANG, Y.-AH.; LEE, S.S.; HONG, S.H.; EOM, G.T. Value-added conversion of biodiesel into the versatile biosurfactant sophorolipid using *Starmerella bombicola*. **Cleaner Engineering and Technology**, v.1, 100027, 2020.

KURTZMAN, C. P., PRICE, N. P. J., RAY, K. J., & KUO, T.-M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **Microbiology Letters**, v.311, n.2, p.140–146, 2010.

KOO, J.W.; SOON, P.-H.; AHN, B.-J. Antibacterial effect of sophorolipid and its application in cosmetics. **Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea**, v.34, n.4, p. 317-323, 2008.

LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.91, n.9, p. 363–366, 1989.

LIU, X.; MA, X.; YAO, R.; PAN, C.; HE, H. Sophorolipids production from rice straw via SO₃ micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercquiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. **ABM Express**, v.6, n.1, p. 60, 2016

MA, X.; MENG, L.; ZHANG, H.; ZHOU, L.; YUE, J.; ZHU, H.; YAO, R. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. **App Microbiology and Biotechnology**, v.104, p. 77-100, 2020.

MINUCELLI, T.; RIBEIRO-VIANA, R. M.; BORSATO, D.; ANDRADE, G.; CELY, M. V. T.; OLIVEIRA, M. R.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 2016.

MAINGAULT, M. Utilization os sophorolipids as therapeutically active substances or cosmetic products, in particular for the treatment of the skin. **U.S. patent** 5981497, November 9, 1999.

MOHAMED, S. K.; ASIF, M.; NAZARI, M.V. et al. Atividade antiangiogênica de sofrolipídios extraídos de oleína de palma desodorizada branqueada refinada. **Pub Med**, v.51, n.1, p.45–54, 2019.

PELLECIER, F.; ANDRE, P. Cosmetic use os sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agentes and slimming application. **World patente** 2004/108063, december 16, 2004.

QUEIROZ, C.A.U.; SILVEIRA, V.A.I.; HIPÓLITO, A.; CELLIGOI, M.A.P.C. Perspectivas de aplicação de sofrolipídio. **Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**3, cap.12, p. 103-114, 2019.

ROELANTS, S., SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., LODENS, S., VAN RENTERGHEM, L., & SOETAERT, W. Production and Applications of Sophorolipids. **Biobased Surfactants. Elsevier Inc**, v.3, p. 65–119, 2019.

RAMASAMY, S., BARNARD, E., DAWSON, T. L., & LI, H. The role of the skin microbiota in acne pathophysiology. **British Journal of Dermatology**, 2019.

SAMAD, A.; ZHANG, J.; CHEN, D.; CHEN, X.; TUCKER, M.; LIANG, Y. Sweet sorghum bagasse and corn stover serving as substrates for producing sophorolipids. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.44, n.3, p.353–362, 2017.

- SEN, S.; BORAH, S.N.; BORA, A.; DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1, p.95, 2017.
- SHAH, M.U.H., SIVAPRAGASAM, M., MONIRUZZAMAN, M., TALUKDER, M.M.R., YUSUP, S.B., GOTO, M. Production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* yeast using new hydrophobic substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v.127, p.60–67, 2017.
- SILVEIRA, V.A.I.; FREITAS, C.A.U.Q.; CELLIGOI, M.A.P. Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.6, n.6, p. 88-90, 2018.
- SILVEIRA, V.A.I.; NISHIO, E.K.; FREITAS, C.A.U.Q et al. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21, 101287, 2019.
- SILVEIRA, V.A.I.; MARIM, B.M.; HIPÓLITO, A. GONÇALVES, M.; MALI, S.; KOBAYASHI, R.K.T.; CELLIGOI, A.P.C. Characterization and antimicrobial properties of bioactive package films based on poly(lactic acid)-sophorolipid for the control of foodborne pathogens. **Food Packaging and Shelf Life**, v.26, 100591, 2020.
- SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., CROCKER, N.V. High-titer production and strong antimicrobial activity of sophorolipids from *Rhodotorula bogoriensis*. **Biotechnology Progress**, v.31, n.4, p.867–874, 2015a.
- SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., ZERKOWSKI, J.A., KRISHNAMA, A., VASANTHAN, N. Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different polymer matrices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.3, p.342–348, 2015b.
- VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in Applied Microbiology**, v.61, p. 214–223, 2015.
- VAN BOGAERT, I.N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W.B. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v.46, p.821–833, 2011.
- VECINO, X.J. M.; CRUZ, A. B; MOLDES L.R.R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1549-7801, 2017.
- XU, H., & LI, H. Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, 2019.
- YANG F.; ZHAO, X-H; H. J.; SUN C.; LIU D.; HU F-Q. Estudos preliminares sobre propriedades de superfície e atividades antioxidantes de sofrolipídios. **Science and technology of food industry**, V.33, N.14, 2012.
- ZHANG, Y.; JIA, D.; SUN, W.; YANG, X.; ZHANG, C.; ZHAO, F.; LU, W. Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. **Microbial Biotechnology**, v.11, n.3, p.455–464, 2018.
- ZERHUSEN, C., BOLLMANN, T., GÖDDERZ, A., FLEISCHER, P., GLÜSEN, B., & SCHÖRKEN, U. Microbial Synthesis of Nonionic Long-Chain Sophorolipid Emulsifiers Obtained from Fatty Alcohol and Mixed Lipid Feeding. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2019.

CAPÍTULO 15

A RELEVÂNCIA E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA COMO TERAPÊUTICA ESTÉTICA

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 08/03/2021

Lília Maria Nobre Mendonça de Aguiar

Enfermeira
prevenção, saúde e bem estar
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/3149704261770731> /
<https://orcid.org/0000-0003-2786-2391>

Lulucha de Fátima Lima da Silva

Universidade de Maringá
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/8943071874230659>

Silvia Sousa da Silva

Centro Universitário da Amazônia
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/5819408850309338>

Gicilene Meneses dos Santos

Centro Universitário da Amazônia
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/1031417968998008>

Domingas Machado da Silva

Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/5202168262491743>

Antenor Matos de Carvalho Junior

Hospital Regional do Baixo Amazonas
Waldemar Penna
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/2838717520870004>

Rodrigo Ruan Costa de Matos

Universidade Estadual do Pará
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/8285758012611602>

Joyce Freitas Barbosa Monteiro

Enfermeira Autônoma
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/4602868122980654>

Jocireudo de Jesus Carneiro de Aguiar

Centro Universitário da Amazônia
Santarém, Pará
<http://lattes.cnpq.br/0630231948597108>

RESUMO: A Toxina Botulínica (TB) do tipo A, ou Botox, consiste em uma das substâncias fundamentais no âmbito do rejuvenescimento facial, através de uma técnica injetável pouco invasiva em nível de sua administração. Esse relevante produto estético é produzido por uma bactéria gram-positiva e anaeróbica, *Clostridium botulinum*, o qual atua sobre os neurotransmissores, inibindo, assim, a atividade de algumas funções no organismo. Objetiva-se, através deste, produzir uma revisão bibliográfica descritiva sobre o tema “A relevância e os mecanismos de ação da toxina botulínica como terapêutica estética”. Com a administração da TB, tratamento crescentemente eficiente nas distonias faciais, ocorre a liberação da acetilcolina (Ach) nas sinapses colinérgicas periféricas, promovendo, deste modo, a imobilidade muscular. Sobretudo, quanto mais forte é a força muscular, maior será a dose local da toxina a ser injetada. Sabe-se, portanto, com a introdução da TB como método terapêutico na área da estética, estima-se um eminente grau de satisfação pessoal, além do baixo nível de efeitos colaterais por seu mecanismo de ação terapêutico.

PALAVRAS - CHAVE: Toxina Botulínica. Estética. Efeitos colaterais.

RELEVANCE AND MECHANISMS OF ACTION OF BOTULINIC TOXIN AS AESTHETIC THERAPEUTIC

ABSTRACT: Botulinum Toxin (TB) type A, or Botox, consists of one of the fundamental substances within the scope of facial rejuvenation, through a non-invasive injectable technique in terms of its administration. This relevant aesthetic product is produced by a gram-positive and anaerobic bacterium, *Clostridium botulinum*, which acts on neurotransmitters, thus inhibiting the activity of some functions in the body. The objective is, through this, to produce a descriptive bibliographic review on the theme “The relevance and mechanisms of action of the botulinic toxin as aesthetic therapy”. With the administration of TB, an increasingly efficient treatment for facial dystonias, acetylcholine (Ach) is released in peripheral cholinergic synapses, thus promoting muscle immobility. Above all, the stronger the muscle strength, the higher the local dose of the toxin to be injected. It is known, therefore, with the introduction of TB as a therapeutic method in the field of aesthetics, an eminent degree of personal satisfaction is estimated, in addition to the low level of side effects due to its therapeutic action mechanism.

KEYWORDS: Botulinum Toxin. Aesthetics. Side effects.

1 | INTRODUÇÃO

A toxina botulínica ou Botox (toxina botulínica tipo A), é uma metodologia do ramo da estética utilizada como tratamento das marcas de expressão do terço superior da face (região da testa), indicado, também para eliminar ou diminuir os pés de galinha na região peri-orbicular, rugas que se formam entre as sobrancelhas e as linhas horizontais na testa (BELONI, 2018).

No final da década de 1960, por Alan B. Scott, oftalmologista do Instituto *Smith-Ketthewell Eye Reserch*, em São Francisco, Califórnia, iniciou-se o estudo sobre o Botox. Este profissional estava à procura por uma substância que pudesse ser inserida em músculos hiperativos que ocasionavam a desarmonia ocular no caso do estrabismo infantil, além de outros movimentos anormais para as distonias segmentares. (DRESSLER, 2012).

A aplicação da toxina botulínica na área da estética começou na década de 90, atingindo sua aprovação para uso em rugas dinâmicas no Brasil, pela ANVISA, no ano 2000, comercializada pela marca Botox®. Em 2003 houve aprovação da marca Dysport®, e em 2005 a marca Prosigne®. Desde esse momento, a procura e a oferta deste método só tem se elevado ao longo do tempo (GEMPERLI et al, 2010 e SANTOS; MATTOS e FULCO, 2015).

A TB é elaborada por meio do processo fermentativo da bactéria *Clostridium botulinum*, sendo a primeira toxina microbiana utilizada para tratamento de doenças (SILVA, 2011).

Todas as características de cada tratamento devem ser copiosamente explicadas,

tais como vantagens, desvantagens, benefícios, prejuízos, custos, etc (PEDRON, 2015). A decisão da opção do tratamento ocorre sempre por parte do paciente, sendo indicado o respaldo legal tanto do cliente como do profissional habilitado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nesse sentido, desde a aprovação da TB tipo A em 2002 para usos estéticos os produtos tornaram-se bem estabelecidos neste campo e são, amplamente, aprovados para corrigir rugas em as áreas da glabella e dos olhos (SCHLESSINGER et al., 2017).

No interior do ramo da estética facial, a beleza desperta o sentimento de satisfação que vai além da pessoal, acoplando, entretanto, vários procedimentos que proporcionam a aparência perfeita em indivíduos de ambos os sexos que procuram tecnologias inovadoras, bem como produtos e procedimentos que possam contribuir para a aparência perfeita.

Em referência ao anúncio acima, a pesquisa objetiva realizar uma revisão bibliográfica descritiva do tema “A relevância e os mecanismos de ação da Toxina Botulínica como terapêutica estética”.

2 | METODOLOGIA

Estudo constituído por meio uma revisão bibliográfica descritiva. A pesquisa dos estudos relacionados ao tema foi realizada nas bases de dados eletrônicas SciELO, Portal de Periódicos Capes e Google Acadêmico. Foram selecionados trabalhos nos idiomas português e inglês, publicados no período dos anos 2016 ao ano de 2021, que apresentaram conteúdos relacionadas aos objetivos desta pesquisa e que estavam disponíveis na íntegra para leitura.

Foram utilizados para a busca dos estudos nas bases de dados as seguintes palavras-chave ou Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), em português e inglês com múltiplas combinações: Botulinum Toxins Type A, esthetics, microbotox, rejuvenation.

Foram excluídos do estudo os trabalhos publicados fora do período temporal mencionado, os duplicados, os que não apresentavam texto completo disponível nas bases de dados e aqueles não condizentes com os objetivos propostos. Um total de 253 artigos, relacionados ao tema deste estudo, foram encontrados nas bases de dados eletrônicas utilizadas. Deste total, foram selecionados 36 estudos por atenderem aos critérios de inclusão estabelecidos.

3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Relato cronológico da administração da Toxina Botulínica

A descrição a respeito da Toxina Botulínica teve início no ano de 1817 pelo físico alemão Justinus Kerner, haja vista que o mesmo relacionou os óbitos por intoxicação causada pelo *Clostridium botulinum* em salsichas defumadas. Segundo este profissional,

o veneno dessa toxina interferia na excitação do Sistema Motor e Autônomo. (COLHADO; BOEING; ORTEGA, 2009). Atualmente, a pesquisa sobre tal tratativa vem sendo cada vez mais comprovada no que diz respeito ao seu uso na área da estética.

Após essa descoberta, em 1895, Emile Van Ermengem, encontrou o patógeno “*Clostridium botulinum*”, após um novo surto de botulismo em uma pequena aldeia belga (SILVA, 2011 e COLHADO; BOEING; ORTEGA, 2009).

Em se tratando de harmonização facial, a toxina botulínica é recomendada para limitação da formação de rugas e linhas de expressão. Sua utilização em procedimentos foi aprovada pela ANVISA em 2000 no Brasil e pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2002 nos Estados Unidos (MARCIANO et al., 2014).

Percebe-se, contudo, ao longo dos anos, a TB vem assumindo novas possibilidades terapêuticas no ramo da beleza, favorecendo um destete de suma importância no que tange ao bem estar físico e mental das pessoas.

3.2 Mecanismo de ação

Com base no mecanismo de ação, a toxina teve o início de sua utilização em decorrência do relaxamento muscular, na diminuindo a dor, contribuindo, assim, na melhora da qualidade de vida dos pacientes portadores dessa disfunção (AMANTÉA et al., 2010).

Nesse contexto, de acordo com De Carvalho et al. (2014), à medida que o axônio terminal inicia a trajetória de novos contatos sinápticos, há uma reconstituição da transmissão neuromuscular e retorno gradual à função muscular completa, geralmente com efeitos colaterais mínimos.

Existem 7 tipos de toxina, as quais possuem toxicidades específicas, diferentes tempos de persistência nas células nervosas e diferentes potenciais, entretanto todos os sorotipos da BT, fundamentalmente promovem a inibição da liberação de acetilcolina. (DE CARVALHO et al., 2014).

As TB dos tipos A e B são produzidas em laboratório para sua comercialização. A tipo A é a mais pesquisada, devido sua propriedade de manutenção, toxigenicidade, facilidades na cultura e cristalização em uma forma estável, sendo diluídas em solução salina, associadas à albumina humana, passa por processo de filtração e são liofilizadas, e depois liberadas para serem utilizadas

Essa protease do Botox atuante na desnervação química provisório dos músculos esqueléticos por bloqueio da liberação mediada por Ca^{+2} de acetilcolina das terminações nervosas de neurônios motores alfa e gama. (DE CARVALHO et al., 2017).

A TB figura-se na forma ativa por meio da clivagem de duas cadeias ativas, uma pesada (H) de 100Kda e de uma leve (L) de 50KDa, mutuamente interligada por uma ligação dissulfídica. Sendo assim, diante desse processo, ocorre a indução da neurointoxicação nessas duas cadeias, até mesmo na introdução extracelular desta ssubstância (SWAMINATHAN, 2011).

Ressalta-se, que a cadeia L é varivelmente longa, entre 422 e 445 blocos de peptídeos. Esses são homólogos e se acumulam no compartimento central e amino terminal (DUARTE, 2015).

Cada neurotoxina possui zinco potencialmente ativa, com exceção da BoNT/C (Toxina Botulínica C). Além disso, há também os átomos sem zinco (inativo), o qual dependerá tanto da temperatura quanto do tempo de elaboração de bactérias (DUARTE, 2015).

A atividade catalítica relativa a toxicidade da TB deve-se à cadeia L (leve) e da ligação dissulfídrica dentro da célula e clive uma proteína específica em determinado local. Por outro lado, na cadeia H (pesada), a conexão ocorre na membrana sináptica entre as proteínas existentes. Diante uma cadeia dissulfídrica quebrada, a cadeia L será incapaz de penetrar na membrana sináptica do terminal axônico (COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009).

Observa-se, mediante o mecanismo de ação da TB que, enquanto a cadeia leve, impede a liberação dos neurotransmissores dependentes do cálcio, a partir da função proteolítica do zinco presente na cadeia, que quebra as ligações peptídicas da proteína SNARE, o que impede de liberar os neurotransmissores, como acetilcolina, causando a paralisia do músculo (POSITO, 2009).

Em decorrência da elevada atração pelas sinapses colinérgicas, a TB acaba gerando um bloqueio na liberação de acetilcolina nos terminais nervosos, mas, não ocasiona alteração na condução neural, síntese e armazenamento de acetilcolina (DIAS, 2017).

Diante das literaturas contextualizadas acima, a Figura 2.3, criada por Dias (2017), abaixo, nos mostra exatamente como ocorre a tramitação da Toxina Botulínica na cadeia pesada, a qual associa-se aos receptores extracelulares encontrados nos neurônios colinérgicos, e efetua a internalização desta na parte interna das células pré-sinápticas, auxiliando, consequentemente, na entrada da cadeia leve para o citoplasma da célula.

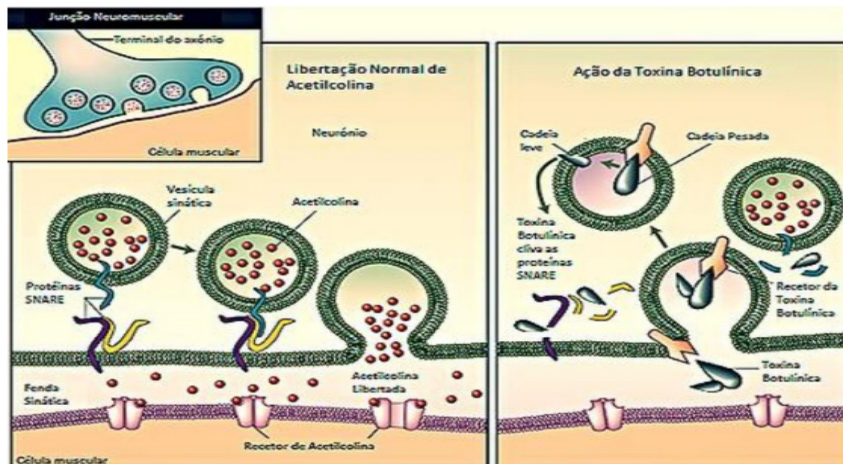


Figura 2.3- Mecanismo de ação da Toxina Botulínica
 Fonte: (DIAS, 2017, apud CORREA, 2019, p.2)

3.3 O uso da Toxina Botulínica nos tratamentos estéticos

A aplicação da TB consiste em um procedimento não cirúrgico, pouco invasivo, estético terapêutico temporário, dose-dependente, potente e eficaz, apropriada para o rejuvenescimento facial, melhora do sorriso gengival, controle da hiperhidrose, rejuvenescimento escrotal e diminuição de queloides e cicatrizes hipertróficas, com um alto índice de eficácia e contentamento pessoal, durante até 6 meses (BRATZ e MALLET, 2016).

A TB, como já mencionado, é utilizada para tratamentos de diversos campos, profissionalmente relatando: odontológicos, oftalmológicos e neurológicos, porém, o que está em evidência é o seu uso em tratamentos estéticos.

Dentre as marcas de Botox disponíveis e aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: Botox®, Xeomin®, Prosigne®, Dysport®, Botulift®. As vias de administração são: intramuscular/intradérmica, conforme protocolo técnico da área a ser tratada. A duração do efeito ocorre de 6 semanas até 6 meses, atingindo os melhores resultados entre 2 a 3 meses (BRATZ e MALLET, 2016).

Os músculos submetidos ao procedimento da aplicação da TB são os seguintes: músculo frontal, corrugador do supercílio, orbicular do olho, próceros, músculo nasal, levantador do lábio superior e da asa do nariz, levantador do lábio, zigomático menor, zigomático maior, levantador do ângulo da boca, bucinador, risório, orbicular dos lábios, depressor do ângulo da boca, depressor do lábio inferior e músculo Mentoniano (OLIVEIRA, 2019).

A figura 3.3 apresentada abaixo nos mostra alguns dos efeitos advindos da

terapêutica estética com a Toxina Botulínica:

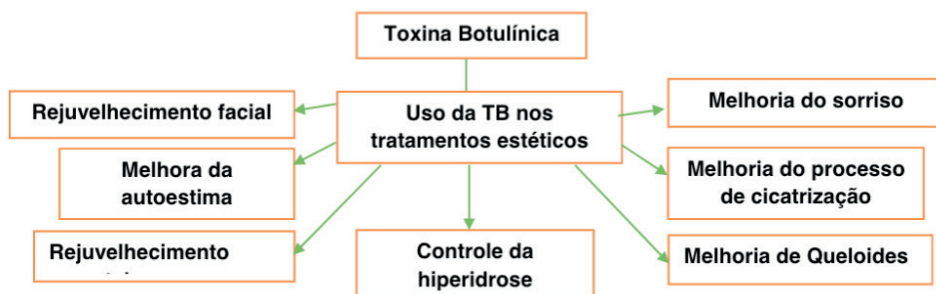


Figura 3.3- Efeitos da terapêutica estética com o uso da Toxina Botulínica

Fonte: (Adaptado de GOUVEIA, et al., 2020, p. 59)

Para que a aplicação seja bem sucedida é preciso seguir um protocolo, iniciando com a avaliação adequada do paciente, levando em conta os aspectos mencionados anteriormente. Em seguida é feito um planejamento, através de uma marcação de onde ocorrerá a aplicação, orientando o cliente a dar sorrisos forçados para melhor avaliar onde necessita de aplicação (SILVA, et al., 2019).

A dosagem usada pode ser de 2U a 3U por ponto para pessoas com 3 a 5 mm de gengiva exposta. A aplicação é feita com uma seringa estéril de 1 ml com resíduo zero acompanhada de uma agulha, também estéril, de 6mm/32 G lembrando que deve ser feita a aplicação igualmente em ambos os lados, caso use um anestésico tópico, sua aplicação deve ser feita de 15 a 20 minutos antes da aplicação (SILVA, et al., 2019).

3.4 Tipos de indicações da Toxina Botulínica

Existem vários tipos de indicações para a aplicação da toxina botulínica, como já referenciado ao longo desse estudo, além de outros que constam abaixo:

- **Distonia:** constitui-se de uma desordem neurológica, causada por contrações do músculo sustentado que geralmente causa movimentos de torção repetitivos e padronizados ou até mesmo movimentos posturais anômalos. O blefarospasmos, distonia oromandibular, cervical e outros são tratados com a TB (JANCOVIC, 2009; COOPER; SPINDLER, 2015).
- **Apraxia da pálpebra:** compreende da incapacidade de realizar movimentos complexos aprendidos na ausência de paralisia, perda de sensibilidade ou de perturbação da coordenação (KAYNAK-HEKIMHAN, 2010).
- **Tremores:** é o funcionamento anormal do sistema nervoso, podendo ter muitas patologias associadas. Caracterizados por uma oscilação rítmica de uma parte

do corpo, sendo classificado segundo a situação em que ocorre, a frequência da oscilação, a distribuição corporal e se está associado a alguma patologia (ABBOUD; AHMED e FERNANDEZ, 2011).

- Hiperidrose: caracterizada por suor abundante, em que as glândulas sudoríparas ecrinas de algumas partes do corpo vão secretar em excesso, quando intensa, pode causar odor por causa da decomposição de células mortas, fungos e bactérias (PEREIRA e SINCLAIR, 2013).
- Espasticidade: decorre da excitabilidade aumentada do estiramento do músculo. O indivíduo apresenta hiperreflexia e outros sinais como: diminuição da força do músculo, hipotrofia, paralisia, movimentos mais lentos, perda de controle dos movimentos, reflexos polissinápticos, sinal de Babinsky e siscinesias; nos casos mais graves e não tratados pode acontecer alterações musculares, fibrose, contraturas e atrofia muscular (SOUZA e CAVALCANTI, 2016).
- Sialorréia: caracteriza-se pelo excesso da produção salivar. Essa hipersalivação é normal em bebês e crianças de até dois anos de idade, depois disso, caso essa condição não se altere, deixa de ser fisiológico e passa a ser considerado um quadro patológico, que pode acarretar outras consequências, como dermatite facial, odor fétido, além de incluir o indivíduo em um contexto discriminatório, afetando diretamente suas relações interpessoais, levando-o a um isolamento e privando-o de convívio social (CORSO et al., 2011)
- Dor: a TB quando usada para o alívio de dores tem bastante eficácia, agindo no enfraquecimento seletivo da musculatura, estabelecendo uma redução sustentada da dor. A melhora efetiva na dor possibilita uma recuperação em longo prazo de melhor qualidade, pois abre espaço para o paciente praticar até mesmo exercícios físicos (SPOSITO, 2004; COLHADO, BOEING e ORTEGA, 2009).
- Bexiga hiperativa: trata-se de um conjunto de sintomas de urgência urinária frequente, noctúria e incontinência urinária (JAYARAJAM; RADOMSKI, 2013).
- Dissinergia do detrusor-esfincter: representa uma pressão excessiva na bexiga e a impossibilidade de esvaziá-la completamente. O aumento da pressão pode causar danos ao detrusor, dano renal ou refluxo uretral (JOST, 2003).
- Espasmo esofágico difuso: resume-se a uma condição onde o esôfago se apresenta hiperativo devido a contrações anormais de propagação ou devido a um vigor exagerado e é normalmente provoca dor e disfagia e regurgitação (ROMAN; KAHRILAS, 2013).
- Nistagmo: são oscilações rítmicas, repetidas e involuntárias de um ou ambos os olhos conjugadamente, nos sentidos horizontal (de um lado para o outro), vertical (de cima para baixo) ou rotatório (movimentos circulares) ambos podem dificultar a focalização das imagens (DUTTON; FOWLER, 2007).

3.5 Consequências do uso exorbitante da Toxina Botulínica

A toxina botulínica é um dos produtos disponíveis no mercado sob controle especial e portaria específica, do contrário, quando executado por profissionais não habilitados ou mal treinados traz como consequências, maus resultados, dúvidas e insatisfações que acabam desacreditando o tratamento (GARCIA et al., 1996).

Sendo assim, os riscos são reduzidos se forem respeitadas as recomendações preconizadas, a técnica correta, conhecimento da anatomia, da face e uso por profissional habilitado. As contraindicações e complicações temporárias podem existir, como pequeno sangramento e edema no local da aplicação; perda de expressão, assimetria, ptose palpebral e cefaléia transitória não considerada patológica, uma vez que ao ser perfurada a musculatura fica dolorida causando uma falsa cefaleia (GARCIA et al., 1996).

Para a administração da TB exige uma gama de conhecimento específico que vai além da anatomia facial, como a fisiologia, a histologia pois cada ser deve ser, tecnicamente e cientificamente avaliado de maneira individualizada, além da prática farmacológica das fórmulas e da destreza manual com agulhas e seringas.

Faz-se necessário, entretanto mencionar, que quanto maior a diluição da TB, maior tende a ser o edema local. Essas complicações regridem de forma espontânea na primeira hora, não havendo necessidade de qualquer tratamento. Em pacientes com flacidez associada, um edema vespertino pode ocorrer, cedendo com o decorrer do dia (SPOSITO, 2004).

A perda funcional muscular, por exemplo, é um efeito colateral muito comum, normalmente ligado ao fato da toxina reduzir a espasticidade, fazendo com que tenha fraqueza muscular, aumentando a presença de quedas, cansaço e causando uma marcha instável.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, o uso da toxina botulínica na experiência profissional estética, considera-se, sem dúvida, em uma técnica de grande importância a nível do potencial de auto estima nos indivíduos em seu modo geral.

Pôde-se perceber, durante o estudo, que existem alguns fatores que podem potencializar os seus efeitos como tratamento precoce, seleção de músculos e pontos a serem aplicados, porém a mais importante delas é o tratamento estético, pois a toxina ajuda na quebra do espasmo muscular causador das rugas.

Observou-se, também, que o mecanismo de ação da toxina botulínica é inibir a liberação excitotóxica da acetilcolina nos terminais nervosos motores, levando a uma diminuição da contração muscular, mas também na ação sobre outros neurotransmissores. Esta propriedade a torna útil, clínica e terapeuticamente, em uma série de condições onde existe excesso de contração muscular.

Relativo a dose de toxina botulínica utilizada, esta varia de acordo com a extensão e a força do músculo a ser tratado. Quanto maior a força muscular ou mais extenso o músculo, maior a dose a ser utilizada.

Em detrimento da terapêutica com injeção de toxina botulínica, além de ter um elevado grau de satisfação, tem um baixo índice de complicações ou efeitos colaterais.

A toxina botulínica, contudo, tem demonstrado ser uma poderosa droga e um agente terapêutico de sucesso, seja ela, na área clínica ou de estética, mas é preciso de cuidado na administração da dosagem, para não ocorrer possíveis complicações. Sendo assim, conclui-se que a TB acarreta melhora da autoimagem e habilidade expressiva, gerando impacto social positivo e maior qualidade de vida para os pacientes submetidos ao tratamento.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, H.; AHMED, A. e FERNANDEZ, H. Essential tremor: choosing the right management plan for your patient. *Cleveland And Clinic Journal Of Medicine*, v.78, n.12, p. 821-828, 2011.

Allergan Produtos Farmacêuticos. Botox: bula para o profissional de saúde. 2019. Acesso em 2020 out 28. Disponível em: https://allergan-web-cdn-prod.azureedge.net/allerganbrazil/allerganbrazil/media/allergan-brazil/botox_bula_profissional.pdf.

AMATÉA, D. V. et al. A utilização da toxina botulínica tipo A na dor e disfunção temporomandibular. *Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM & Dor Orofacial*, v. 3, n. 10, 2010.

AQUINO, J. M. Protocolos de Aplicação de Toxina para Sorriso Gengival: uma revisão de literatura. *Rev. Eletrônica Acervo Saúde*, vol. Supl. 28, e1079 | DOI: [https://doi.org/10.25248/reas.e1079.2019.2019;\(28\)](https://doi.org/10.25248/reas.e1079.2019.2019;(28)):

ARAUJO, U. A. M. **Máscaras inteiriças Tukúna**: possibilidades de estudo de artefatos de museu para o conhecimento do universo indígena. 1985. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Sociais) – Fundação Escola de Sociologia e Política de São Paulo, São Paulo, 1986.

BELONI, P. Toxina botulínica: o que é e para que serve o famoso botox. 2018. Disponível em <https://www.ativosaude.com/estetica/toxina-botulinica/>. Acesso em 25 de janeiro de 2021.

BRATZ, P. D. E. e MALLEY, E. K. V. Toxina Botulínica tipo A: abordagens em saúde. *Rev Saúde & Ciência em Ação*, v. 3, pp, 58-70, 2016.

COLHADO, O. C. G.; BOEING, M.; ORTEGA, L. B. Toxina botulínica no tratamento da dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.59, n.3, p. 366-38, 2009

CORSO, B. L., et al. Abordagem terapêutica na sialorreia em paralisia cerebral: revisão sistemática. *Med Reabil*, v. 30, n. 1, p. 913, fev. 2011.

COOPER, C.A.; SPINDLER, M. Dystonia: a review and update. *Neurological Cases*, v. 2, p. 1-6, 2015.

CORREA, G. K. A. S., et al. Utilização da toxina botulínica tipo A para fins terapêuticos. **Braslian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 26, n. 3, p. 61-65, 2019.

DE CARVALHO, R. C. R.; SHIMAOKA, A. M. e DE ANDRADE, A. P. O Uso da Toxina Botulínica na Odontologia: revisão de literatura. **Revista Ciências e Odontologia**, v. 1, n. 1., 2017.

DRESSLER, D. Clinical application of botulinum toxin. (2012).

DIAS, F. de L. D. O efeito da toxina botulínica tipo a associada ao ácido hialurônico no rejuvenescimento facial. **Faculdade Sudoeste Paulista**, Itapetininga-SP, 2017. Disponível em: <<http://unifsp.edu.br/itapetininga/wpcontent/uploads/2018/09/ADRIANA-FURQUIM-DELIMA-DIAS.pdf>

DUARTE, M. J. da S. **Toxina Botulínica para além da cosmética**. 2015. 87f Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia do Algarve – UAIG. FARO/Portugal, 2015.

DUTTON, J.; FOWLER, A. Botulinum toxin in ophthalmology. **Survey Of Ophthalmology**, v. 52, n. 1, p.13-31, 2007.

GARCIA, A. e FULTON, J. E. Cosmetic denervation of the muscle of facial expression with botulinum toxin a dose response study. **Dermatol Surg**, v. 22, n. 1, p 22-39, 1996.

GEMPERLI, R.; GIMENEZ, R. P.; SALLES A. G.; FERREIRA M. C. Análise retrospectiva das alterações das rugas faciais após aplicações seriadas de toxina botulínica tipo A. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. São Paulo, v. 25, n. 2, p. 297- 303, 2010.

JANKOVIC, J. TREATMENT OF HYPERKINETIC MOVEMENT DISORDERS. **The Lancet Neurology**, V. 8, p. 844-856, 2009.

JAYARAJAN, J. e RADOMSKI, S. B. Pharmacotherapy of overactive bladder in adults: a review of efficacy, tolerability, and quality of life. **Res Rep Urol**, v.6, n.6, p.1-16, 2013.

JOST, W. Pelvic floor and gastrointestinal uses. In Moore, P. e Naumann, M. (Ed). Handbook of botulinum toxin treatment. (2ª). **Oxford, Blackwell Science**, pp.360-362, 2003.

KAYNAK-HEKIMHAN, P. Noncosmetic periorcular therapeutic applications of botulinum toxin. **Middle East Afr J Ophthalmol**, v. 17, n. 2, p. 113-120, 2010.

MARCIANO, A. M. et al. Toxina botulínica e sua aplicação na odontologia. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 4, n. 1, p. 65-75 2014.

OLIVEIRA, G. **Toxina Botulínica e suas complicações**: uma revisão de literatura. 2018. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Int. **Repositório institucional**, Florianópolis, 2019.

PEDRON, I. G. Considerações ético-legais sobre a aplicação de toxina botulínica pelo cirurgião-dentista. **Odontoloia Clínica Científica**, v. 14, n. 4, p. 789-796, 2015.

- PEREIRA, E. e SINCLAIR, R. Hyperhidrosis and bromhidrosis: a guide to assessment and management. **Australian Family Physician**, v. 18, n. 6, p. 785-798, 2013.
- POSITO, M. M. de M. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. **Revista Acta Fisiátrica**, São Paulo, v. 16, n.01, p 25 – 37. 2009.
- RODRIGUES, A. M., et al. O uso da toxina botulínica na síndrome da bexiga hiperativa. **Revista Femina**, v. 37, n. 1, p, 41-45, 2009.
- ROMAN, S. e KAHRILAS, P. Management of spastic disorders of the esophagus. **Nih Public Access Author Manuscrip: Gastroenterol Clin North Am**, v.42, n.1, p. 27-43, 2013.
- SANTOS, C. S.; MATTOS, R. M. de; FULCO, T. O. Toxina botulínica tipo A e suas complicações na estética facial. **Episteme Transversalis**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 73-82, 2015.
- SCHELLINI, S. A.; MATAI, O.; IGAMI, T. Z.; PADOVANI, C. R.; PADOVANI, C. P. Blefarospasmo essencial e espasmo hemifacial: características dos pacientes, tratamento com toxina botulínica A e revisão da literatura. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.69, n.1, p. 23 – 26, 2006
- SCHLESSINGER, J. et al. New Uses of AbobotulinumtoxinA in Aesthetics. **Aesthetic Surgery Journal. Oxford (Inglaterra)**, v.37, n.1, p. 45–58, 2017. Disponível em: doi:10.1093/asj/sjx005. Acesso em: 30 de nov. de 2019.
- SILVA, J. F. N. **A aplicação da Toxina Botulínica e suas complicações**: Revisão Bibliográfica. 2011. 154 f. Dissertação (Mestrado Medicina Legal) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Vila Gaia, 2011.
- SILVA, N. J. M.A. et al. Protocolos de Aplicação de Toxina para Sorriso Gengival: uma revisão de literatura. **Rev Eletrônica Acervo Saúde**, v. 28, n. 16, 2019.
- SOUZA, O. A.; CAVALCANTI, D. S. P. Toxina Botulínica do tipo A: Aplicação e particularidades no tratamento da espasticidade, do estrabismo, do blefaroespasmo e de rugas faciais. Saúde & Ciência em ação: **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 3, ed. 1, p. 58-68, 2016.
- SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica tipo A: propriedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, v. 11, n. supl. 1, 2004.
- SPOSITO, M. M. M. Bloqueios químicos para o tratamento da espasticidade na paralisia cerebral. **Acta fisiátrica**, v. 17, n. 2, p. 68-83, 2010.
- SWAMINATHAN, S. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4467-4485, 2011.

CAPÍTULO 16

UTILIZAÇÃO DE VETORES VIRAIS NA TERAPIA GÊNICA

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 23/02/2021

Edmilson Pereira Barroso

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/8849532021265627>

Synara Suellen Lebre Félix

Centro Universitário Uninorte
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/5115452410524175>

Anna Júlia Lebre Félix

Centro Universitário Uninorte
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/7792948703694412>

Maria Júlia Enes Lebre Félix

Centro Universitário Uninorte
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/9910322877986821>

Gustavo Henrique Sinhoin

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/4256343975766386>

Ylêdo Fernandes de Menezes Júnior

Centro Universitário Uninorte
Rio Branco - Acre
<http://lattes.cnpq.br/716799555739167>

Abigail Gonçalves da Silva

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco – Acre
<http://lattes.cnpq.br/4908230906355213>

Joscleildo Pereira Ferreira

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco – Acre
<http://lattes.cnpq.br/3308698130850697>

Eder Ferreira de Arruda

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco – Acre
<http://lattes.cnpq.br/9314124156008604>

Adem Nagibe dos Santos Geber Filho

Universidade Federal do Acre – UFAC
Rio Branco – Acre
<http://lattes.cnpq.br/6176799923678871>

RESUMO: A inovação tecnológica, capaz de romper o tradicionalismo terapêutico, introduz no cientificismo buscas por resultados precisos. Na área geneticista, por exemplo, utiliza-se a terapia gênica para correção de genes mutados, transferindo material genético com instruções necessárias para bom funcionamento dos genes, por meio de vetores virais. Assim, esse estudo demonstrar o avanço da medicina ao utilizar novas terapêuticas gênicas, através de vetores virais. Para tanto, foi realizada uma narrativa de literatura com buscas nas bases de dados: Scielo, PubMed, Medline, Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde – BVS, utilizando os descritores: Inovação; Edição genômica e Terapia gênica. Foram incluídos estudos nacionais e internacionais, nos períodos de 2002 a 2020. Foi verificado nos estudos realizados, eficiência ao transportar material genético, para células alvo, através de vetores virais, sendo estes, veículos de entrega de DNA ou RNA,

devido característica viral de serem parasitas intracelulares obrigatórios. Dessa forma, os vírus chegam às células específicas para reparo gênico, sendo os mais utilizados: retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados e herpes vírus. Entretanto, foi demonstrado também, a necessidade de acompanhamento minucioso ao tratamento, visto que, os riscos de: infecção, reação de resposta imune e desenvolvimento oncogênicos, não podem ser descartados. Dado o exposto, observa-se que, os avanços na biologia celular, no século XX, inovaram técnicas capazes de beneficiar pacientes com: câncer, infecções, doenças adquiridas e outros distúrbios fisiopatológicos, sendo considerada uma nova alternativa de tratamento. Além disso, os estudos estão inovando técnicas e aprimorando metodologias para abranger mais casos patológicos.

PALAVRAS - CHAVE: Inovação; Edição genômica e Terapia gênica

USE OF VIRAL VECTORS IN GENE THERAPY

ABSTRACT: Technological innovation, capable of breaking the traditional therapeutic approach, introduces in scientific searches for precise results. In the geneticist field, for example, gene therapy is used to correct mutated genes, transferring genetic material with instructions necessary for the proper functioning of genes, using viral vectors. Thus, this study aims to demonstrate the advancement of medicine when using new gene therapies, using viral vectors. For that, a literature narrative was carried out with searches in the databases: Scielo, PubMed, Medline, Google Scholar and Virtual Health Library - VHL, using the descriptors: Innovation; Genomic editing and gene therapy. National and international studies from 2002 to 2020 were included. It was verified in the studies carried out, efficiency in transporting genetic material, to target cells, through viral vectors, which are vehicles of DNA or RNA delivery, due to the viral characteristic mandatory intracellular parasites. Thus, viruses reach specific cells for gene repair, the most used ones being retroviruses, adenoviruses, adenoassociated viruses and herpes viruses. However, it was also demonstrated that there is a need for detailed treatment monitoring, since the risks of: infection, immune response reaction and oncogenic development cannot be ruled out. Given the above, it is observed that the advances in cell biology, in the 20th century, innovated techniques capable of benefiting patients with: cancer, infections, acquired diseases and other pathophysiological disorders, being considered a new treatment alternative. In addition, studies are innovating techniques and improving methodologies to cover more pathological cases.

KEYWORDS: Innovation; Genomic editing and gene therapy.

1 | INTRODUÇÃO

A inovação tecnológica, capaz de romper o tradicionalismo terapêutico, introduz no cientificismo buscas por resultados precisos. Esse tem sido o intuito da medicina desde o conhecimento do ácido desoxirribonucleico (DNA) como unidade básica da hereditariedade. Na área da genética, por exemplo, essa inovação se dá pela capacidade do melhoramento genético por meio das necessidades de novas correções (NOVOA; FRÓES, 2011).

Com as evoluções nas áreas das pesquisas biomoleculares, técnicas capazes de originar moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante estão sendo cada vez

mais desenvolvidas. Esses progressos tiveram uma inovação na área da biotecnologia e da biologia molecular na qual adequaram-se como pilar para a terapia gênica (PAIXÃO, 2019).

A terapia gênica surge como uma importante alternativa para a cura de patologias genéticas e adquiridas. Com isso, a inserção da engenharia de DNA recombinante transformou o campo dos experimentos, uma vez que propicia clonar, sintetizar e projetar novos genes que, inseridos no organismo, é capaz de alcançar a expressão (gene ativo) por meio de alterações em regiões do DNA (LUSTOSA, 2019).

Diante dessas perspectivas, as terapias gênicas utilizam-se do vírus que são vetores usados na medicina para introdução do material genético na célula. Esses são classificados como virais e não virais e são incumbidos de transportar o gene terapêutico aos sítios-específicos, ou seja, servem para o carregamento dos genes geneticamente modificados, tornando-se uma nova possibilidade de tratamento na medicina (ALCANTRA, 2019).

Sendo assim, o presente estudo objetiva demonstrar a terapia gênica na medicina ao utilizar vetores virais, além disso, apresentar os principais vetores utilizados nessa técnica e os aspectos benéficos que essa terapia traz para medicina contemporânea.

2 | METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa. A busca dos artigos foi realizada através da plataforma de pesquisa Scielo, PubMed, Medline, Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde - BVS. Para realização da busca, foram utilizados os descritores “Inovação”; “Edição Genômica” e “Terapia gênica”. Por sua vez, estas publicações foram filtradas visando à obtenção de artigos científicos, dissertações e teses considerando o espaço temporal de 2002 a 2020 que tivessem completos e disponíveis.

3 | TERAPIA GÊNICA

Em 1991, James Watson fez esta declaração: “Muita gente se diz preocupada com a mudança em nossas instruções genéticas. Mas essas [instruções genéticas] são apenas um produto da evolução, moldadas para nos adaptar a certas condições que podem não mais existir. Todos sabemos o quanto somos imperfeitos. Por que não nos tornar mais aptos à sobrevivência? (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Com o entendimento de que muitas patologias decorriam de modificações genéticas e com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, apareceu a opinião de tratar as patologias manipulando e alterando a sequência de genes do DNA das células doentes. Em 1978, David Baltimore, um microbiologista americano, afirmou que seria “o triunfo da medicina se os genes defeituosos pudessem ser silenciados” (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Diante dos avanços tecnológicos e científicos, a terapia gênica é uma das ciências da engenharia genética com o propósito de levar a cura ou prevenir enfermidades ligadas

à hereditariedade ou não, a partir da alteração, substituição ou acréscimo de determinado gene para o tratamento (PIERCE, 2011).

Tendo como referência algumas conquistas e ainda em fase de experimento, a terapia gênica é uma ciência que tem se mostrado bastante promissora e que apresentou muitos avanços nos últimos anos. Segundo Artioli; Hirata; Lancha e Junior (2007), acredita-se que a terapia gênica constitua uma oportunidade terapêutica efetiva para várias doenças.

A terapia gênica tem como marco fundamental a introdução do material genético na forma de DNA, RNA ou oligonucleotídeos nas células-específicas. Os agentes utilizados para esses acessos nas células são nomeados vetores, palavra originária do latim vector, significando “aquele que entrega” (NARDI, 2002).

A adição e a introdução desse material na célula têm função terapêutica e busca regenerar a função de um gene anormal, atribuindo uma nova atividade ou melhorando a funcionalidade dos genes ativos. Dentro dessa ótica, essa terapia tem a finalidade de ser empregada tanto para doenças fenotipicamente genéticas quanto para patologias adquiridas (COCO; HAN; SALLUM, 2009).

Tendo em vista as especificidades, a manipulação do DNA recombinante para terapia gênica se dá pelo isolamento de dois DNA diferentes, uma retirada da célula animal e a outro, de forma viral, em que o transgene - gene de interesse ou gene terapêutico - substitui regiões gênicas de determinados vírus. Sendo assim, o isolamento da molécula de DNA é o primeiro estágio da formação do DNA recombinante (PIMENTA; LIMA, 2015), conforme figura 1.

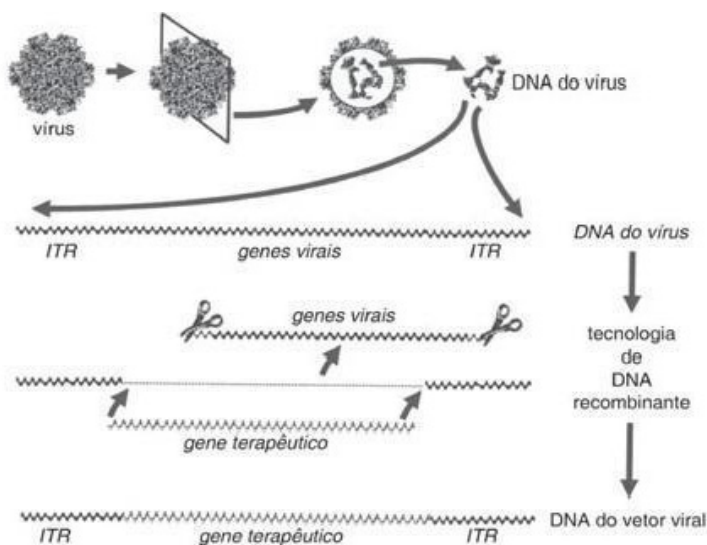


Figura 1: Esquema de manipulação em laboratório de um vírus pela tecnologia de DNA recombinante (LINDEN, 2010).

Com isso, a modificação de genes empregado na terapia gênica é dado pela transferência desse material genético, com genes naturais, genes quiméricos, fragmentos de DNA e ribozimas para as células de um indivíduo. A adição do material genético para a célula específica, seja fora do corpo (*ex vivo*) ou por aplicação direta (*in vivo*), é chamado de transdução e o gene transduzido (CAMPOS *et al.*, 2019).

O gene de interesse (transgene) está inserido em uma molécula de DNA ou RNA e é transferido por um vetor. O método (*in vivo*) é aplicado diretamente no indivíduo, sendo essa técnica considerado eficaz e menos custosa, porém é preciso um estudo minucioso e endereçamento exato para que o gene chegue ao órgão correto e de forma precisa. Já a forma (*ex vivo*) as células são retiradas do paciente, manuseadas e administrada novamente, essa técnica tem em particular por ser dificultosa, no entanto, simples de monitorar (NARDI, 2002), conforme figura 2.

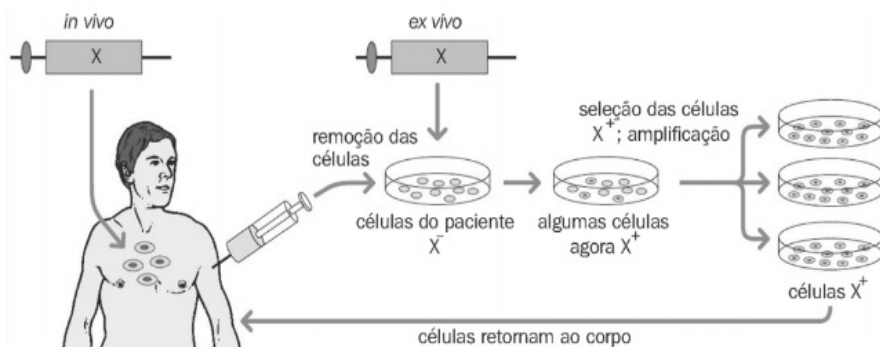


Figura 2: Exemplificação da terapia *In vivo* e *Ex vivo*, (STRACHAN; READ, 2014).

Cabe salientar que, no processo de alteração genética, apenas um ínfimo número de células-alvo adquire e integram de maneira estável o ácido desoxirribonucleico exógeno. Para a recuperação das células remodeladas, faz-se necessário o uso de um efetivo sistema de seleção e regeneração (SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008).

3.1 Os Principais Vetores Virais Utilizados nas Terapias

Os vírus progridem ampliando técnicas aperfeiçoadas para atingir e invadir as células, onde os mesmos utilizam-se da maquinaria celular para expressar seus genes e produzir sua progênie. Essa agilidade de adentrar e exteriorizar seu material genético dentro das células é a essência para o uso dos vírus como vetores (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Esses vetores são os mais utilizados na transferência do material genético (DNA ou RNA) à célula, sendo os principais os retrovírus, os adenovírus e os vírus adenoassociados e mais raramente herpes vírus. Os retrovirais são utilizados desde os testes iniciais,

são manuseados pelos cientistas para que possua meios eficazes de segurança na sua introdução no indivíduo (STRAUSS; COSTANZI, 2007). São um grupo de vírus esféricos de 80-100 nm de diâmetro que utilizam duas fitas idênticas de RNA como material genético (WOLF *et al.*, 2015).

À vista disso, os retrovírus têm como vantagens uma alta taxa de transdução, amplo espectro de células hospedeiro, sistema muito bem estudado e proteínas do vetor que não expressa no hospedeiro. Além disso, infectam com facilidade células mitóticas e pós-mitóticas por períodos prolongados (BRANDÃO, 2015). Possuem um eficiente sistema de transferência de genes, tendo como maior utilidade deste vetor a integração no genoma da célula-alvo oferecendo maior durabilidade da expressão quando às medidas e procedimentos são aplicadas de forma correta e seguras sobre esses vetores (RABELO *et al.*, 2018).

Todavia, possuem suas desvantagens por sua incapacidade de traduzir células que não se dividem, como os neurônios (WOLF *et al.*, 2015), são imunogênicos e caso seja inserido em local indevido no genoma há um risco de ameaça de reversão para tipo selvagem, inativação pelo complemento e baixa taxa de integração (BRANDÃO, 2015). Além disso, embora os vetores retrovirais ofereçam um meio de corrigir doenças genéticas de forma permanente, vale ressaltar que todos vetores apresentam risco de mutagênese por inserção (SINN; SAUTER; MCCRAY, 2005).

Desse modo, uma abordagem em pacientes com deficiências de adenosina desaminase não apresentaram nenhuma alteração de mutagênese (SINN; SAUTER; MCCRAY, 2005). Porém, durante os ensaios clínicos para a imunodeficiência combinada severa ligada ao X (SCID) na França e no Reino Unido, vários pacientes desenvolveram leucemia após o tratamento com um vetor retroviral gama devido à mutagênese de inserção (WOLF *et al.*, 2015).

À medida que a infecção por retrovírus resultaria na integração do gene que ele transporta no genoma do hospedeiro, um adenovírus introduziria o gene que ele transporta no núcleo da célula do indivíduo sem integrar o gene no genoma. Como consequência, o gene inserido seria transcrito e expresso na célula por um certo período de tempo, mas não estará presente no DNA da prole da célula hospedeira após a mesma replicar-se. Esta particularidade dos adenovírus tornou-o proficiente em certas aplicações da terapia gênica (TANI; FAUSTINE; SUFIAN, 2011).

Convém ressaltar que, os adenovírus possuem uma finalidade significativa na transferência de genes suicidas a tumores, embora os vetores adenovírus mostrem excelência e eficiência, devem-se ter um cuidado específico, pois estes induzem uma elevada resposta imunológica que diminui o tempo de expressão do gene de interesse e praticamente impede a reaplicação em um mesmo paciente (MENK; VENTURA, 2007).

No entanto, apesar da versatilidade desse vetor e da existência de uma resposta imunológica, os adenovírus quando manipulados e adaptados melhoram sua especificidade

e aumentam sua eficácia sítio-específico. Como exemplo, na terapia citotóxica, na qual, os adenovírus têm um bom perfil neuropatológico além de compatibilizar com outros agentes citotóxicos tornando-o esta terapia uma modalidade muito promissora com estratégias imunostimuladoras para o tratamento de glioblastoma multiforme - GBM (CANDOLFI, 2014).

Em suma, cabe destacar a relevância dos vetores baseados em herpes vírus, na qual vem se destacando pela sua afinidade altamente elevada por células nervosas. Deste modo, considera-se que a aplicação destes vírus para meios de transferência gênica em células do sistema nervoso seja uma opção suficientemente acessível no futuro (STRAUSS *et al.*, 2018).

Diferentemente, os vírus adenoassociados (AAV) dispõem de certas vantagens em relação aos demais vírus, como inserção célula-alvo, tropismo aumentado e inexistência de patogenicidade. Estes pequenos vírus não estão relacionados a desenvolver doença humana, são moderadamente acessíveis de se obter e pouco ativam o sistema imunológico do indivíduo, ampliando o tempo de expressão do transgene (NARDI, 2002).

Isto nos leva a observar que, o primeiro medicamento a ser lançado no mercado com a tecnologia de vírus adenoassociados, foi em julho de 2012. Trata-se de um vírus adenoassociados de tipo I, designado ALIPOGENE TRIPARVOVEC planejado para transportar o gene humano da lipoproteína lipase. Tal medicamento, objetiva-se tratar de uma patologia rara que é a deficiência em lipoproteína lipase responsável por hipertrigliceridemia, quilomicronemia e risco de pancreatite. A associação risco/benefício demonstrou ser muito promissora, principalmente, nos pacientes com problemas fisiopatológicos (GAUDET; MÉTHOT; KASTELEIN, 2012).

Também é possível destacar que, os números de protocolos envolvendo o uso da técnica de DNA recombinante com vírus adenoassociados vêm crescendo, rente com a popularidade deste vetor. Assim, são vários os benefícios e os principais avanços relacionados ao emprego dos vírus adenoassociados nos protocolos de pesquisas clínicas estão relacionados às patologias diversas, como fibrose cística, artrite reumatoide, hemofilias e dislipidemias (COLOMBO; MELO; MATTER, 2017).

Dessa maneira, as evoluções na biologia molecular, viabilizam o reconhecimento de diversos genes humanos e de seus produtos proteicos significativos, despertam possibilidades de tratamento através da terapia gênica para várias patologias genéticas e não genéticas (BORGES; ROBINSON, 2013).

3.2 Perspectivas na Medicina Contemporânea

A engenharia genética transformou-se no mecanismo apto e eficiente de aprimorar admiravelmente a qualidade de vida, trazendo esperança de cura para patologias antes mesmo de se manifestarem (BOMTEMPO, 2018).

A intervenção genética pode possibilitar excelentes resultados na regeneração

de tecidos lesionados, com modificações fisiopatológicas benéficas para os indivíduos. Análises com engenharia de tecidos e terapia gênica têm sido de grande relevância no tratamento de morbidades e necessidades de reparo ósseo causadas por trauma, patologias e necessidades de movimentos ortodônticos (BATISTA *et al.*, 2020).

Avanços significativos nos últimos anos são diversos, como nas miopatias congênitas, forçando os médicos a revisar e atualizar constantemente esse grupo de patologias. A terapia gênica já é uma realidade e apresenta resultados positivos nesta área, pois, cria uma nova expectativa para pacientes, familiares e especialistas, o que expressa a necessidade de adaptar os protocolos de atendimento, diagnóstico e tratamento de algumas dessas entidades (NATERA BENITO *et al.*, 2019).

Os campos da terapia gênica, terapia com células-tronco e terapia com fatores de crescimento têm sido cientificamente explorados em grande profundidade há bastante tempo, principalmente, nos dias atuais devido aos avanços tecnológicos. Todavia, é necessária mais pesquisa *in vivo*, usando modelos experimentais comprovados, que contemporiza a identificar tratamentos eficientes, livres de efeitos adversos, como inflamação intensa, resposta imune exacerbada e estimulação do desenvolvimento tumoral, entre outros, o que permitirá a passagem segura em estudos clínicos (CAMPO *et al.*, 2019).

Atualmente, existem terapias na fase clínica 1, na China e nos Estados Unidos, fundamentada no sistema de terapia gênica por edição genética, que estão sendo utilizadas em pacientes humanos para tratar câncer intratável ou resistente a intervenções quimioterápicas convencionais. Além disso, muitos cientistas estão pesquisando a viabilidade e eficiência de diversas terapias *ex vivo* com células-tronco para patologias que afetam células sanguíneas, como hemofilia, talassemia alfa e beta, anemia falciforme e outras anemias de origem genética (MARFANY, 2019).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou o primeiro produto, que se utiliza de vírus, para tratamento de Distrofia Hereditária da Retina, ocasionada por uma mutação no gene RPE65, dentre as distrofias hereditárias da retina estão a amaurose congênita de Leber e a retinose pigmentar (BRASIL, 2020).

Logo, a terapia gênica ao utilizar vetores, pode ser empregada para tratar, principalmente, distúrbios hereditários, também pode atuar como recurso terapêutico de doenças adquiridas, tais como cânceres, doenças cardiovasculares e doenças infecciosas (CHIROTTO FILHO; MACHADO, 2019).

4 | CONCLUSÃO

A terapia gênica tem demonstrado grande importância na medicina ao utilizar vetores virais. No entanto, os estudos apontam para a necessidade de acompanhamento minucioso ao tratamento, visto que, os riscos de infecção, reação de resposta imune e oncogênicas, não podem ser descartados. Nesse cenário, observa-se que, os avanços na biologia

celular no século XX, inovaram técnicas capazes de beneficiar pacientes com câncer, infecções, doenças adquiridas e outros distúrbios fisiopatológicos, sendo considerada uma nova alternativa de tratamento, além de outros estudos que estão inovando técnicas e aprimorando metodologias para abranger mais casos patológicos. Logo, os avanços da terapia gênica incentivam a busca por melhorias, aprimoramento dos sistemas de entregas de genes e o conhecimento mais amplo das doenças de interesse.

REFERÊNCIAS

ALCANTRA, R. L. *et al.* **A tecnologia de crispr-cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão.** Revista Brasileira Militar de Ciências, v.5, n.13, p.27-33, 11 dez. 2019.

ARTIOLI, G. G.; HIRATA, R. D. C.; LANCHA JUNIOR, A. H. **Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.13, n.5, p.349-354, 2007.

BORGES, O.; ROBINSON, W. M. **Genética humana.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BOMTEMPO, T. V. **Terapia Gênica y Doping Genético: Diálogos Bioéticos y Biojurídicos.** Revista Latinoamericana de Bioética, v.19, n.36-1, p.75-90, 2018.

BRANDÃO, R. E. L. **Vírus e Retrovírus: contributo para a evolução das espécies,** 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, Portugal, 2015.

BATISTA, R. *et al.* **Gene therapy and its applicability in Dentistry.** Revista Gaúcha Odontológica, v. 68, p.e20200009, Campinas, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1981-86372020000100303&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 15 de abril de 2020.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Dispõe sobre o registro de produto de terapia avançada e dá outras providências.** 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/#/visualizar/414700#%2Fvisualizar%2F414700>. Acesso em 23 de setembro de 2020.

CAMPO, J. O. *et al.* **Hyposialia and Xerostomy Post Irradiation: Innovative Therapies in the Biomolecular Field.** International Journal of Morphology, v.37, n.4, p.1564-1571, 2019.

CANDOLFI, M. **Citotoxic gene therapy for the treatment of brain cancer.** Neurología Argentina, v.6, n.4, p.217-224, 2014.

COLOMBO, G. A.; MELO, G. L.; MATTER, L. B. **Uso de vírus adenoassociado: um avanço na terapia gênica.** Revista interdisciplinar em ciências da saúde e biológicas–RICSB, v.1, n.1, p.47-52, 2017.

COCO, M.; HAN, S. W.; SALLUM, J. M. F. **Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v.72, n.4, p.560-566, 2009.

CHIROTTO FILHO, L. R.; MACHADO, B. F. **Manipulação genética: aplicações das técnicas de terapia gênica.** FOCO: caderno de estudos e pesquisas, n.14, p.61-76, 2019.

GAUDET, D.; MÉTHOT, J.; KASTELEIN, J. **Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency**. Current opinion in lipidology. v.23, n.4, p.310-320, 2012.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. M. A. **Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas**. Einstein (São Paulo). v.15, n.3, p.369-375, 2017.

LUSTOSA, A. L. P. **Potencial do uso da terapia genética no tratamento de doenças**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2019.

LINDEN, R. **Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será**. Estud. av. São Paulo, v.24, n.70, p.31-69, 2010.

MARFANY, G. **Interrogantes y retos actuales de la edición genética**. Revista de Bioética y Derecho, Barcelona, n.47, p.17-31, 2019. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1886-58872019000300003. Acesso em 16 de abril, 2020.

MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. **Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica**. Revista USP. n.75, p.50-61, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13620>. Acesso em: 7 out. 2020.

NATERA BENITO, D. *et al.* **Diagnóstico e tratamento de miopatias congênitas**. Medicina (B. Aires). v.79, n.3, p.82-86, 2019.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. A. **Terapia gênica**. Ciência & saúde coletiva, v.7, n.1, p.109-116, 2002.

NOVOA, M. C.; FRÓES, B. T. **Desafios para a universalização da genética clínica: o caso brasileiro**. Revista Panamericana de Salud Pública. v.29, n.1, p.61–8, 2011.

OLIVEIRA, B. A. *et al.* **Vetores virais para uso em terapia gênica**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua, v.9, n.2, p.57-66, 2018.

PAIXÃO, L. E. **Terapia gênica no tratamento de doenças**. 2019. 51 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

PIMENTA, C. A. M.; LIMA, J. M. **Genética aplicada a biotecnologia**. 1.ed. São Paulo: Erica, 2015.

RABELO, A. C. *et al.* **Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças**. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, v.20, n.3, p.122-127, 2018.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI, S. E. **Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 40, n. 5, p. 601-613, 2007.

STRAUSS, B. E. *et al.* **Perspectives for cancer immunotherapy mediated by p19Arf plus interferon-beta gene transfer**. Clinics. v.73, n.1, p. e479s, 2018.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. **Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais**. Ciência. Rural, Santa Maria, v.38, n.3, p.861-871, 2008.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética molecular humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

SINN, P.; SAUTER, S.; MCCRAY, P. **Gene Therapy Progress and Prospects: Desenvolvimento de vetores lentivirais e retrovirais melhorados - design, biossegurança e produção**. Gene Ther, n.12, p.1089–1098, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302570>. Acesso em: 7 out. 2020.

TANI, J.; FAUSTINE, B.; SUFIAN, J. T. **Updates on current advances in gene therapy**. West Indian med. j. v.60, n.2, p.188-194, 2011.

WOLF, D. A. *et al.* **Gene Therapy for Neurologic Manifestations of Mucopolysaccharidoses**. Expert Opin Drug Deliv. v.12, n.2, p.283–296, 2015.

CAPÍTULO 17

EXPANSION OF SCHISTOSOMIASIS IN A LOCALITY IN SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRAZIL

Data de aceite: 01/04/2021

Aline de Jesus Lustosa Nogueira

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Patologia, Programa de Pós-
Graduação em Saúde e Ambiente, São Luís
– MA
<https://orcid.org/0000-0003-1190-3494>

Renato Juvino de Aragão Mendes

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Patologia, São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0002-3291-5091>

Adalberto Alves Pereira Filho

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte-
MG
<https://orcid.org/0000-0003-0417-0536>

Leandro Schalcher Aguiar

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Biologia, Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade e Conservação,
São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0002-4925-2327>

Iramar Borba de Carvalho Nogueira

Hospital das Clínicas, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife- PE
<https://orcid.org/0000-0001-9576-5388>

Alexandre Nava Fabri

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Patologia, São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0003-2659-8939>

Halana Tereza Marques de Jesus Ambrósio

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Patologia, São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0003-2359-4545>

Karla Regina Freitas Araújo

Universidade Federal do Maranhão
Departamento de Patologia, São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0003-4204-5541>

Ivone Garros Rosa

Universidade Federal do Maranhão,
Departamento de Patologia, São Luís – MA
<https://orcid.org/0000-0001-7634-9821>

ABSTRACT: Schistosomiasis is a parasitic waterborne disease. In the state capital of Maranhão, São Luís, the presence of snails infected with *Schistosoma mansoni* has been recorded in the Vila Embratel neighborhood. This study aimed to investigate the population dynamics of snails of the genus *Biomphalaria* as well as to map breeding sites of snails vectors of schistosomiasis in a locality of São Luís, Maranhão. Mollusks were collected monthly, between November 2016 and October 2017, by active search. They were identified and submitted to the infection verification test for *S. mansoni*. The relation between rainfall and the abundance of snails was analyzed, and a thematic map was drawn up highlighting breeding sites of epidemiological importance. 375 snails were collected, distributed among the species *Biomphalaria straminea* (95.2%), *Physa* spp. (3.5%) and *Pomacea* spp (1.3%). *B. straminea* was the most abundant species. There was no

evidence of infection by *S. mansoni*. There was a significant difference in the abundance of mollusks collected in the rainy and dry seasons and a moderate correlation between rainfall and the abundance of snails in the period of study. It is expected that these results will help to structure the schistosomiasis vector control policy in the capital of Maranhão.

KEYWORDS: *Biomphalaria*, Geoprocessing, Malacology, Public Health Surveillance, Vector Ecology

EXPANSÃO DA ESQUISTOSSOMOSE EM UMA LOCALIDADE DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL

RESUMO: A esquistossomose é uma doença parasitária de veiculação hídrica. Na capital do estado do Maranhão, São Luís, foi constatada a presença de caramujos infetados com *Schistosoma mansoni* no bairro da Vila Embratel. Este estudo objetivou investigar a dinâmica populacional de caramujos do gênero *Biomphalaria* bem como mapear criadouros de caramujos vetores da esquistossomose em uma localidade de São Luís, Maranhão. Os moluscos foram coletados mensalmente entre novembro de 2016 e outubro de 2017, por busca ativa. Foram identificados e submetidos ao teste de verificação de infecção para *S. mansoni*. Foi analisada a relação entre a precipitação pluviométrica e a abundância de caramujos, e elaborou-se um mapa temático destacando os criadouros de importância epidemiológica. Foram coletados 375 caramujos, distribuídos entre as espécies *Biomphalaria straminea* (95.2%), *Physa* spp. (3.5%) e *Pomacea* spp (1.3%). *B. straminea* foi a espécie mais abundante. Não se evidenciou infecção desta por *S. mansoni*. Houve diferença significativa na abundância de moluscos coletados nas estações chuvosa e de estiagem e correlação moderada entre a pluviosidade e a abundância de caramujos no período estudado. Espera-se que estes resultados auxiliem na estruturação da política de controle de vetores da esquistossomose na capital maranhense.

PALAVRAS - CHAVE: *Biomphalaria*, Geoprocessamento, Malacologia, Vigilância em Saúde Pública, Ecologia de Vetores

1 | INTRODUCTION

Schistosomiasis is a parasitic water-borne disease whose etiologic agent, the trematode *Schistosoma mansoni* Sambon, 1908, has a complex life cycle, which occurs through its interaction with intermediate hosts, snails of the genus *Biomphalaria*, and definitive, of which the most epidemiologically important is man (COLLEY et al., 2014; LIRA et al., 2016).

The disease affects 240 million people worldwide. In Brazil, it is recorded in 18 states of the federation, where approximately 1.5 million people are infected with *S. mansoni* (BRASIL, 2019; WHO, 2020). In Maranhão, schistosomiasis is currently registered in 36 of the 217 municipalities (MARANHÃO, 2016). In the state, 29,103 cases of the disease were recorded between 2007 and 2017 (Brasil, 2020).

In Maranhão, the highest prevalence of schistosomiasis in the state has been registered in the region known as Baixada Maranhense, an endemic area for the disease

(CANTANHEDE et al., 2014). Despite the reduction in the number of cases in recent years, São Luís, capital of the state, has neighborhoods that have factors favorable to the expansion of the disease, such as inadequate housing and the lack of basic sanitation and garbage collection services (DAVID et al., 2018).

The presence of the intermediate host is a necessary condition for the parasite's biological cycle to develop. Thus, studies that focus on these hosts are necessary, as they assist in the interpretation of the role they play in the transmission of the disease and in the guidance of control measures directed at these mollusks (BRASIL, 2008).

Despite the importance of studies on population dynamics to understand the mechanisms related to schistosomiasis, there are few works published in Maranhão. In addition, the cases recorded by the State Schistosomiasis Control Program (PCE) do not always demonstrate the actual epidemiological situation of the disease, which reveals the problem of underreporting (TIBIRIÇÁ; GUIMARÃES; TEIXEIRA, 2011).

This study aimed to investigate the population dynamics of snails of the genus *Biomphalaria* and the factors that influence it, in addition to mapping outbreaks of snails vectors of schistosomiasis in a neighborhood on the outskirts of São Luís, Maranhão.

2 | MATERIAL AND METHODS

Study area

The study was carried out in the Vila Embratel neighborhood, located in the western region of the city of São Luís, capital of the state of Maranhão. Three points were selected in Riacho Doce Street for the collection of snails based on data provided by the Department of Epidemiology of the Municipal Health Department, which were named: breeding site A (S 02.56669 °; W 044.30794 °), breeding site B (S 02.56689 °; W 044.30830 °) and breeding site C (S 02.56764 °; W 044.30712 °).

Mollusk collection and identification

The captures were carried out monthly, for a period of 12 months between November 2016 and October 2017, in peridomiliary breeding sites, which contained snails of the genus *Biomphalaria*. The active search technique, adapted from Brasil (2008), was used. For each selected point, the mollusks were collected for one hour. A sampling of 10% of the collected snails was identified according to anatomical and conchiological criteria, based on the dissection techniques described by Brasil (2008).

Schistosoma mansoni infection test

For the analysis of infection with *Schistosoma mansoni*, snails were selected according to the size of the shell. Among the 357 mollusks of the species *Biomphalaria straminea* collected, 285 individuals were selected, which had an average diameter of 8 mm (SD \pm 0.81).

The tests followed the method described by Smith & Terry (1974) and Brasil (2008). The mollusks were weekly exposed to the light of a 60W lamp for 2 hours and then examined under a stereomicroscope (Stem SV6, Zeiss®, Jena, GE).

Rainfall monitoring

A survey of data regarding the index of rainfall accumulated during each month was carried out, as well as variations in rainfall during the survey. These data were acquired from the Geoenvironmental Nucleus of the State University of Maranhão (UEMA).

Breeding sites mapping

The geographic coordinates of the collection points were determined using a GPS device (eTrex 2.0, Garmin®, Chicago, USA) through the decimal UTM coordinate system. Based on this information, a thematic map was made highlighting breeding sites of epidemiological importance, using data referring to the urban network of the neighborhoods, made available by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). For the computational treatment of geographical references, the Geographic Information System (GIS) was used in an ArcGIS environment. The thematic map was made by the National Institute for Research in the Amazon (INPA), at the Federal University of Amazonas (UFAM).

Statistical analysis

In order to verify whether there was a difference between the abundance of mollusks collected in the rainy and dry periods, the Mann-Whitney test was used. Spearman's correlation test was carried out to verify the relationship between rainfall and the abundance of mollusks collected in the following month. For both tests, a significance level of $p < 0.05$ was considered. The Excel 2016® and Statistic 7.0® programs were used.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Most of the neighborhoods on the outskirts of São Luís, like Vila Embratel, developed without any type of planning, presenting a precarious water distribution infrastructure and the absence of a sewage collection network. This situation favors the occurrence of infectious and parasitic diseases such as schistosomiasis. A study by Souza et al. (2008) in Jaboatão dos Guararapes, state of Pernambuco, Brazil, showed that the process of environmental degradation caused by anthropic action favors the establishment of endemic diseases, a situation similar to that observed in Vila Embratel.

The presence of water collections, such as streams and ditches that often overflow and invade houses during rainy periods is one of the problems observed in the neighborhood. Some of these collections are peridomiciliary and serve as breeding sites for mollusks that transmit parasitosis, increasing the risks of contact between these snails and humans (TIBIRIÇÁ; GUIMARÃES; TEIXEIRA, 2011). The water that supplies the breeding

sites comes largely from domestic sewage, so that many of them are permanent. A similar situation was described by Barbosa et al. (2008) in coastal areas of Pernambuco, where the authors stated that there is a seasonal model of exposure to the disease.

In our research, 375 mollusks were collected. 357 of the species *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848 (92.5%), 13 specimens to *Physa* spp. Draparnaud, 1801 (3.5%) and 5 individuals corresponding to *Pomacea* spp. Perry, 1810 (1.3 %). No snails of the species *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, main host species of *Schistosoma mansoni* in São Luis. According to Massara et al. (2012), the record of malacological fauna is important for generating knowledge about the species present in a given location.

B. straminea is described as an intermediate host of *S. mansoni*. The other specimens of limnic mollusks, *Pomacea* spp. and *Physa* spp., usually occur associated with the genus *Biomphalaria* in natural or modified water environments (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Specimens of the species *B. straminea* and the genera *Pomacea* and *Physa* were found in a malacological survey carried out by Cantanhede et al. (2014) in municipalities in the Baixada Maranhense region. It is noteworthy that some characteristics of the Vila Embratel neighborhood, such as wetlands and thick vegetation, resemble the environmental conditions of that region, which may explain the occurrences of the aforementioned mollusks.

The analyzes of infection with *S. mansoni* showed that the mollusks of the species *B. straminea* were not infected by the helminth. The variation in susceptibility of *Biomphalaria* sp. to *S. mansoni* is influenced by several factors, such as the genetic, behavioral and physiological aspects of the mollusks (MONTEIRO, 2017). The species *B. straminea* has natural resistance to infection, presenting generally low rates (GOMES et al., 2018). In a previous analysis of *S. mansoni* infection carried out for the same species and in the same neighborhood, no infected snails were found (OLIVEIRA et al., 2013).

The abundance of snails of the species *B. straminea* followed the periodicity of the rains, being greater in the rainy season. The peak occurred in May (n = 105), in the end of the rainy season. During the dry season, there was a drop in the abundance of mollusks. No snails were found in the months of November and December, which correspond to the end of that period (Figure 1).

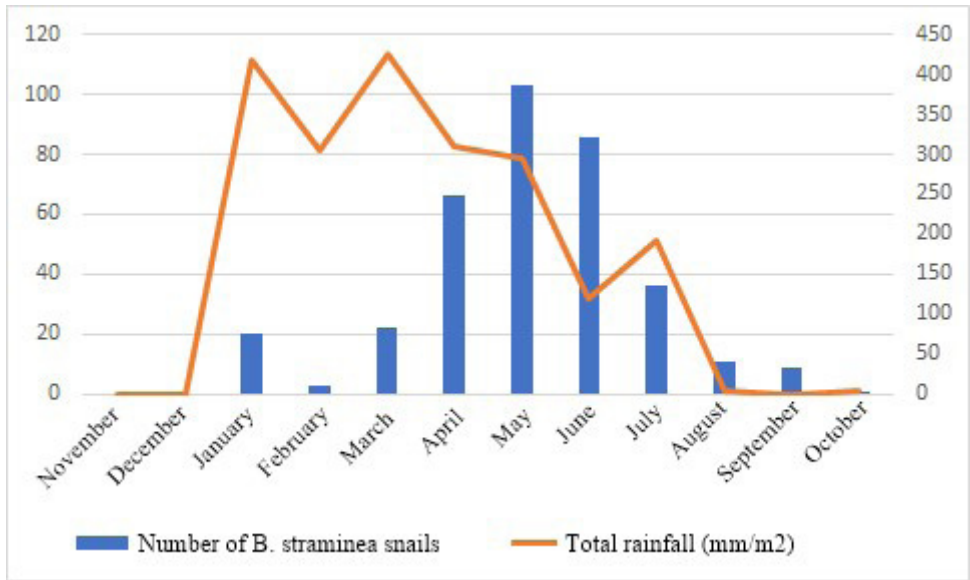


Figure 1: Relationship between total rainfall and abundance of mollusks collected on Riacho Doce Street, Vila Embratel neighborhood, from 2016 to 2017.

A moderate and positive correlation was observed between rainfall and the abundance of snails collected in the studied period ($r = 0.5785$; $p = 0.0487$) and also a significant difference in the abundance of mollusks collected in the rainy periods (January to June) and drought (July to December) ($p = 0.0187$) (Figure 2).

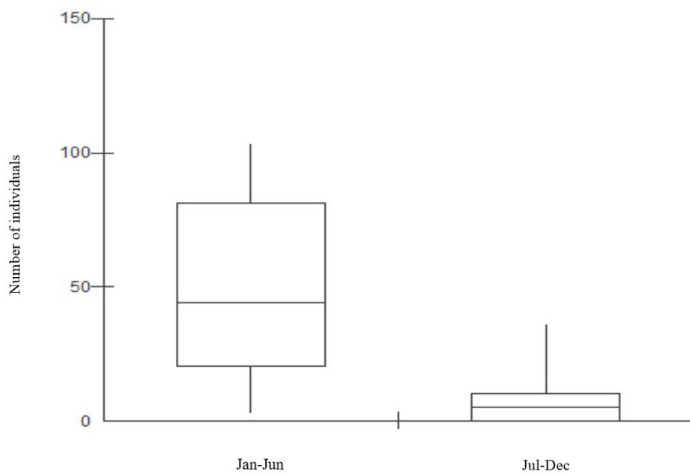


Figure 2: Relation between the abundance of mollusks collected in the rainy and drought periods on Riacho Doce Street, Vila Embratel district, from 2016 to 2017.

In Maranhão, the rainfall regime is related to the distribution of three major climatic types, the tropical humid being the one that encompasses most of the state. This climate is characterized by two well-defined seasons, comprising a rainy period between the months of January and June, and a dry period between the months of July and December (GOMES, 2018). Rainfall is an environmental variable that plays a key role in the transmission cycle of schistosomiasis. The amount of water from the rains combined with temperature variations causes fluctuations in the birth rates and mortality of mollusks, being relevant factors for their population dynamics as well as the formation and expansion of breeding sites and outbreaks (BARBOSA et al., 2017; CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008)

Much of the work relating the abundance of snails and rainfall shows a negative influence on mollusks, so that a higher abundance is observed during the dry season (GOMES et al., 2016). The authors attribute this fact mainly to the dragging effect caused by the rains, which end up carrying the mollusks to other locations, preventing them from being found during the collections.

In our study, the lower abundance of snails observed during the dry season may be related to the reduction in vegetation and the availability of water observed in breeding sites. This scenario was reversed in the rainy season, especially at the end, when there was an increase in vegetation that served as food and substrate for snails, and consequently, of its abundance. A study conducted in Porto de Galinhas, Pernambuco, by Leal Neto et al. (2013).

It is noteworthy that in the present study, the rainfall regime for the analyzed period was considered atypical, not corresponding to the expected volume for the rainy season in the region (LABMET/UEMA, 2017), a phenomenon also observed in the previous year, as shown by Miranda et al (2016). Thus, it appears that the rainfall in the period was insufficient to cause the dragging effect of the mollusks. Divergent data on the relationship between rainfall and mollusks abundance indicate that there may be a change in this abundance according to the intensity of the rainfall regime, the period of the year or even the location and type of breeding sites (natural or artificial).

A malacological survey carried out in the Vila Embratel neighborhood, in São Luís, Maranhão, found the presence of the species *B. glabrata* and *B. straminea* (OLIVEIRA et al., 2013). In that study, only the latter species was found. These data demonstrate that from that time to now, there was a shift in the presence of species of the genus *Biomphalaria* in this neighborhood.

The hypothesis raised to explain this event was that *B. straminea* caused the disappearance of *B. glabrata* through competitive exclusion (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). A study on the population interaction between the two species in the state of Minas Gerais demonstrated the replacement of *B. glabrata* by *B. straminea*, through this type of interspecific competition (KLOOS et al., 2001). In a study carried out on the Itamaracá island, in the state of Pernambuco, the authors showed that the number of

breeding sites and the number of specimens of *B. straminea* were significantly higher than those of *B. glabrata* (BARBOSA et al., 2014)[†]. This competitive mechanism may explain the fact that mollusks of this species were not found in the present study.

The planorbic chart for Riacho Doce Street, in the Vila Embratel neighborhood, is shown in Figure 3. This map highlights breeding sites of epidemiological importance, represented by points A, B and C and named respectively: breeding site A, breeding site B and breeding site C. This also demonstrates the proximity of these breeding sites to the Bacanga River, used by residents for recreational and fishing activities. According to Neto et al. (2012), thematic maps are important tools for the representation of models on surveillance, prediction and prevention of disease risks, as they allow visualizing the association between health events and different aspects of the natural and built environment.

According to the PCE of the municipality of São Luís, between 2013 and 2017, 31 cases of the disease were reported in Vila Embratel (MARANHÃO, 2017). With the exception of the year 2014, in which 19 cases were registered, a decrease in the number of cases was observed. In 2017, when most of the collections in this study were carried out, no case of the endemic disease was reported in the neighborhood.

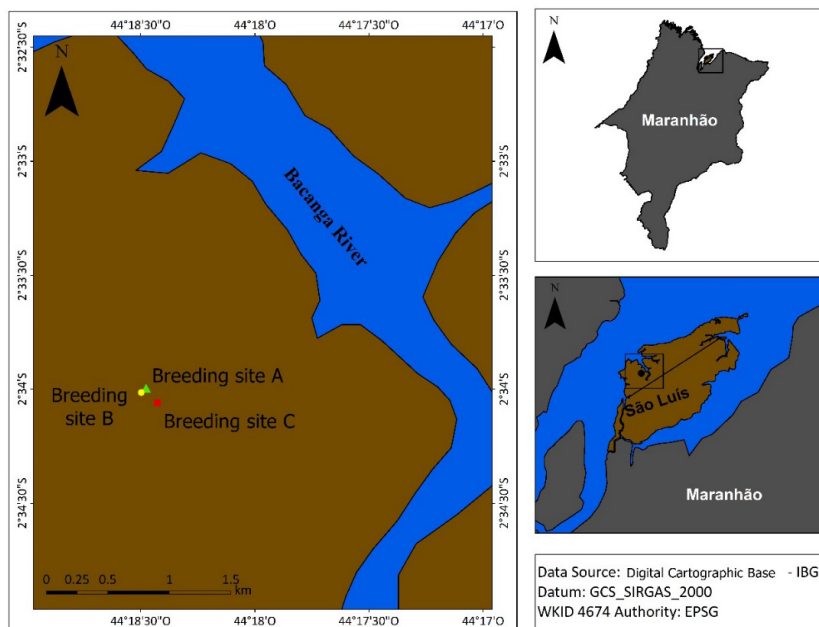


Figure 3: Planorbic chart of Riacho Doce Street, Vila Embratel, São Luís, MA, in the period from 2016 to 2017. Made by Jamerson Santos (INPA/UFAM).

4 | CONCLUSIONS

Despite the results found, the presence of the species *B. straminea*, in addition to environmental and socioeconomic conditions existing in the neighborhood constitutes notable risk factors for the spread of the disease, since this species is the main transmitter of schistosomiasis in other states in the Northeast region. It is necessary a constant monitoring by the health organs of the state and municipal spheres through actions that aim to interrupt the emergence of outbreaks of transmission in this location. Therefore, one of the main strategies must be the control of the vectors. We hope these data will serve as a basis for strengthening the monitoring of the disease in the region.

REFERENCES

BARBOSA, C. S. et al. **Guia para vigilância e controle da esquistossomose: práticas de laboratório e campo**. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

BARBOSA, C. S. et al. Study of the snail intermediate hosts for *Schistosoma mansoni* on Itamaracá Island in northeast Brazil: Spatial displacement of *Biomphalaria glabrata* by *Biomphalaria straminea*. **Geospatial Health**, v. 8, n. 2, p. 345–351, 2014.

BARBOSA, V. S. et al. Os Sistemas de Informação Geográfica em estudo sobre a esquistossomose em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 107, p. 1–10, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. **Datasus**. Available in: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pcebr.def>>. Access in 2020, November 07.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde : volume único [recurso eletrônico]**. 3ª. ed. ed. Brasília: 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I - qualitative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 79–85, 2014.

CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.

DAVID, N. F. et al. Spatial distribution and seasonality of *Biomphalaria* spp. in São Luís (Maranhão, Brazil). **Parasitology Research**, v. 117, n. 5, p. 1495–1502, 2018.

GOMES, E. C. DE S. et al. Transmissão urbana da esquistossomose: Novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 4, p. 822–834, 2016.

- GOMES, E. C. DE S. et al. Spatial risk analysis on occurrences and dispersal of *Biomphalaria straminea* in an endemic area for schistosomiasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 55, n. 3, p. 208–214, 2018.
- GOMES, R. R. F. 2018. **Clima do Maranhão**. Available in: <<https://www.infoescola.com/geografia/clima-do-maranhao/>>. Access in: 2018, April 04.
- KLOOS, H. et al. The Distribution of *Biomphalaria* spp. in Different Habitats in Relation to Physical, Biological, Water Contact and Cognitive Factors in a Rural Area in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. SUPPL., p. 57–66, 2001.
- LABMET/UEMA. 2017. **Chuvas das últimas 24 horas**. Available in: <<https://www.nugeo.uema.br/cat=55>>. Access in: 2017, May 05.
- LEAL NETO, O. B. et al. Análise espacial dos casos humanos de esquistossomose em uma comunidade horticultora da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 4, p. 771–780, 2012.
- LEAL NETO, O. B. et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 357–367, 2013.
- LIRA, M. G. S. et al. Aspectos biológicos de *Holochilus* sp., hospedeiro natural da esquistossomose. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 143–153, 2016.
- MARANHÃO. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO. **Plano Estadual de Saúde 2016-2019**, 2016.
- MARANHÃO. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO. **Resumo das atividades de coproscopia e tratamento por localidade**. 2017.
- MASSARA, C. L. et al. Ocorrência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em parques da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 471–479, 2012.
- MONTEIRO, A. C. **Revisão sistemática de marcadores de resistência e/ou susceptibilidade de *Biomphalaria* sp. à infecção por *Schistosoma mansoni***. Universidade Federal de Alfenas, , 2017. Available in: <<https://bddd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1042>>
- OLIVEIRA, D. DA S. et al. Inquérito Malacológico Para Identificar a Célula De Expansão Da Esquistossomose Mansônica Na Vila Embratel, Um Bairro De Periferia De São Luís Do Maranhão. **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. Especial, p. 16–19, 2013.
- SMITH, S. R.; TERRY, R. J. **Immunology of schistosomiasis**. **Boletim da Organização Mundial de Saúde**. 1974. Available in: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260748/PMC2366272.pdf>>.
- SOUZA, M. A. A. DE et al. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboaão dos Guararapes, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 252–256, 2008.
- TIBIRIÇÁ, S. H. C.; GUIMARÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. T. B. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. suppl 1, p. 1375–1381, 2011.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020. **Schistosomiasis- Fact sheet**. Available in: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> >. Access in: 2020, November 06.

CAPÍTULO 18

MONITORAMENTO MICROCONTROLADO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Data de aceite: 01/04/2021

Data de submissão: 04/01/2021

Letícia Pinto

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR)

Dois Vizinhos – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/1583847839337434>

Andréia Anschau

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR)

Dois Vizinhos – Paraná

<https://orcid.org/0000-0002-2990-7656>

RESUMO: Dentre os corantes naturais, a astaxantina se destaca por suas aplicações na indústria cosmética, farmacêutica, e de alimentos. Este pigmento, além de colorir, possui uma importante propriedade biológica por se tratar de um antioxidante. O mercado mundial de pigmentos naturais está em ascensão, porém o carotenoide astaxantina ainda é majoritariamente abastecido pela versão sintética do pigmento alaranjado, que é restrita ao consumo animal. A astaxantina natural tem sido comercializada para consumo humano, tanto na forma de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* quanto na forma pura. Entretanto, a sua inserção no mercado ainda é restringida pelos elevados custos de cultivo da *H. pluvialis*. Verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias e controles de cultivo, que sejam mais simples e econômicas. Nessa perspectiva,

o cultivo microcontrolado surge como alternativa para a produção de biomassa microalgal à medida que simplifica os aspectos técnicos e permite o monitoramento em tempo real, através de sensores utilizando uma linguagem *open-source*. Neste estudo foi desenvolvido um protótipo com base no Arduino para automação do controle de umidade, temperatura e iluminância, criando uma linguagem de programação para o controle de cultivos mixotróficos de *H. pluvialis*.

PALAVRAS - CHAVE: Microalga. Carotenoide. Monitoramento. Arduino.

MICRO-CONTROLLED MONITORING OF MIXOTROPHIC CULTIVATION OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

ABSTRACT: Among the natural dyes, astaxanthin stands out for its applications in the cosmetic, pharmaceutical and food industry. This pigment, besides coloring, has an important biological property because it is an antioxidant. The world market of natural pigments is on the rise, however the carotenoid astaxanthin is still mainly supplied by the synthetic version of the orange pigment, which is restricted to animal consumption. The natural astaxanthin has been commercialized for human consumption, either in the form of biomass of the microalgae *Haematococcus pluvialis* as in the pure form. However, its insertion in the market is still restricted by the high costs of cultivation of *H. pluvialis*. There is a need for the development of new cultivation strategies and controls, which are simpler and more economical. From this perspective, microcontrolled cultivation appears as an alternative to produce microalgal biomass as it simplifies the technical aspects and allows

monitoring in real time, through sensors using an open-source language. In this study, a prototype was developed based on Arduino to automate the control of humidity, temperature and luminance, creating a programming language for the control of mixotrophic cultures of *H. pluvialis*.

KEYWORDS: Microalgae. Carotenoid. Monitoring. Arduino.

1 | INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da indústria de alimentos, tem-se observado o aumento da demanda por corantes, sendo a cor do produto um dos principais indicativos de qualidade do ponto de vista do consumidor e fator fundamental na decisão de compra do produto, utilizando-se deste conhecimento os produtores através de estratégias de marketing agregam valor comercial ao produto por meio dos corantes (DOWNHAM & COLLINS, 2000). A expansão do mercado de pigmentos naturais, surgiu da necessidade de se encontrar fontes alternativas para corantes em alimentos, sendo a produção de pigmentos de origem biotecnológica uma ferramenta importante a ser explorada (MAPARI et al., 2005). Diante deste cenário, a demanda do pigmento natural alaranjado astaxantina tem aumentado, e sua aplicação na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e cosmética, como pigmento e molécula bioativa tem se tornado muito expressiva (CIFUENTES et al., 2003).

Ainda que os principais produtores utilizam-se do pigmento advindo de síntese química, a pesquisa biotecnológica deste pigmento está em expansão e, destacam-se dois microrganismos como principais produtores de astaxantina, a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Devido à sua importância econômica e investimentos no conhecimento do processo biotecnológico da *H. pluvialis* com o objetivo de tornar-se competitiva à produção sintética, diversos estudos têm sido desenvolvidos visando aumentar a eficiência do processo de obtenção de biomassa e, conseqüentemente, aumentar o rendimento de astaxantina (SUH et al., 2006, GARCIA-MALEA et al., 2006). O metabolismo mixotrófico deste microrganismo também tem sido estudado e documentado (GUERIN et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1993; GONG e CHEN, 1997). Diversas metodologias e modificações de parâmetros de cultivo com o objetivo da obtenção de astaxantina têm sido sugeridos, como: adição de sais (CORDERO et al., 1996), deficiência de nitrogênio (ZHEKISHEVA et al., 2002), alta irradiação (SUH et al., 2006), deficiência de fosfato (HARKER et al., 1996), elevada temperatura (BOUSSIBA et al., 2000) e entre outras.

De modo geral, o acompanhamento do cultivo de microalgas em grande escala é feito de modo *offline*, isto é, são retiradas amostras que são analisadas posteriormente por técnicos treinados, o que por sua vez demanda tempo e implica um grau baixo de monitoramento em tempo real e de registro das variáveis de processo de forma automatizada (D'AGOSTIN, 2017). A implementação de tecnologias de controle e automação para a operação de fotobiorreatores se apresenta como uma solução em potencial para aumentar

a produtividade e diminuir as dificuldades como falta de nutriente e pouca iluminação no período final decorrente do sombreamento imposto pelo maior número de células.

No presente trabalho, com o intuito de monitorar as variáveis que influenciam na produção do pigmento astaxantina, foi utilizada uma plataforma de prototipagem para o controle de sensores de umidade, temperatura, e iluminância, utilizando uma linguagem *open-source*, que permite a aquisição *on-line* de dados.

2 | METODOLOGIA

2.1 Projeto do sistema microcontrolado

A figura 1 abaixo refere-se ao diagrama de blocos de funcionamento do sistema.

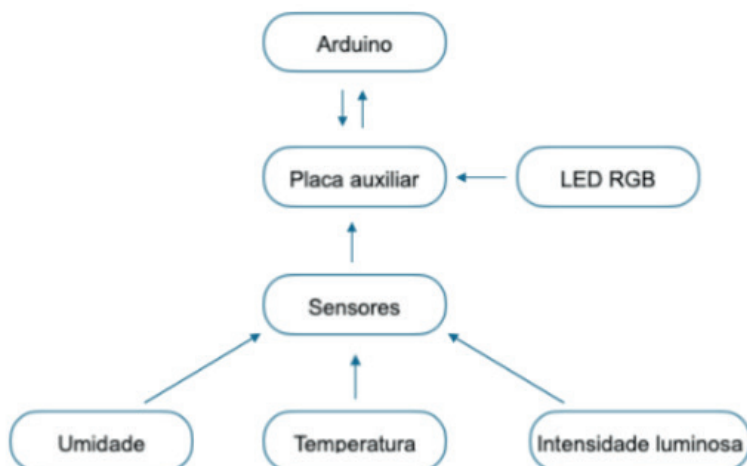


Figura 1: Diagrama de blocos do sistema

Fonte: Autoria própria (2020).

A figura 1 apresenta a sequência lógica de operação do sistema. O Arduino é responsável pelo controle da placa auxiliar. A placa auxiliar por sua vez, será responsável pelo controle das operações realizadas pelo sistema, através da recepção e da amplificação dos sinais gerados pelos sensores, para que a leitura seja executada pelo Arduino.

2.2 Características do sistema

Para a obtenção dos parâmetros de controle, foi utilizada uma plataforma de prototipagem Arduino (para posterior controle de luminosidade das lâmpadas LEDs), acompanhamento da umidade e temperatura para que posterior composição do fotobiorreator. Para a execução da prototipagem do sistema, foi utilizada uma placa Arduino

UNO, sensor LDR (5mm), um sensor DHT11, resistores 10k ohms e 300 ohms, jumpers macho/fêmea, um LED RGB (Figura 2). Para a linguagem do *open-source*, utilizou-se o Arduino Software (IDE) versão 1.8.12.

A linguagem para produzir os comandos usados no estudo para o Arduino se deu através da IDE, responsável por converter os códigos escritos em comandos. Este procedimento é realizado ao solicitar o comando de verificação para salvar e posteriormente fazer upload, que é propriamente a transferência dos dados para a placa. A IDE é composta de um editor de texto para a escrita dos códigos, área de mensagens, barra de ferramentas e menus de configuração. O software da IDE se baseia na linguagem de programação c e c++ com duas funções básicas na qual se tem o setup () sendo o iniciar, e o loop () que é a ligação de repetição (MONK, 2017).

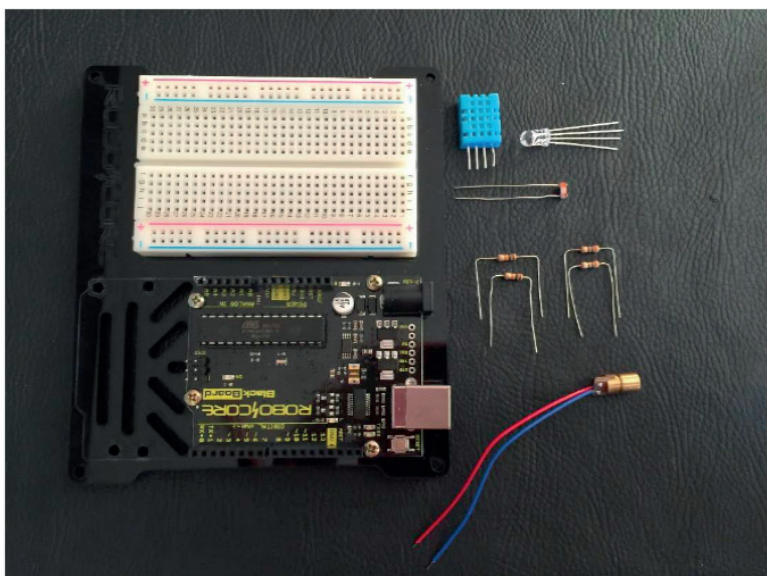


Figura 2: Componentes para montagem de circuito

Fonte: Autoria própria (2020).

2.3 Programação dos sensores

Para a programação da placa Arduino utilizando o software IDE foram utilizados os códigos descritos abaixo.

2.3.1 Sensor de umidade e temperatura

```
// sensor de umidade e temperatura  
#include "DHT.h"
```



```

const int pino_dht = 9;
float temperatura;
float umidade;
DHT dht(pino_dht, DHT11);
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  dht.begin();
}
void loop() {
  delay(2000);
  temperatura = dht.readTemperature();
  umidade = dht.readHumidity();
  if (isnan(umidade) || isnan(temperatura)) {
    Serial.println("Falha na leitura do Sensor DHT!"); }
  else {
    Serial.print("Temperatura:");
    Serial.print(temperatura);
    Serial.print(" *C ");
    Serial.print("\t");
    Serial.print("Umidade:");
    Serial.print(umidade);
    Serial.print(" %\t");
    Serial.println(); }
}

```

2.3.2 Sensor de luz

```

// sensor de luz
const int pinoLDR = A0;
int leitura = 0;
float tensao = 0.0;
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  pinMode(pinoLDR, INPUT);
}
void loop() {
  leitura = analogRead(pinoLDR);
  Serial.print("Leitura:");
  Serial.print(leitura);
}

```

```

Serial.print("\t");
tensao = leitura * 5.0 / 1023.0;
Serial.print("Tensão:");
Serial.print(tensao);
Serial.print("V");
Serial.println();
delay(1000);
}

```

2.3.3 Sensor de intensidade do led RGB

```

// sensor de intensidade luminosa
const int azul = 10;
const int verde = 11;
const int vermelho = 12;
String cor;
void setup()
{
Serial.begin(9600);
pinMode(azul, OUTPUT);
pinMode(verde, OUTPUT);
pinMode(vermelho, OUTPUT);
}
void vermelhoFuncao(){
digitalWrite(azul, LOW);
digitalWrite(verde, LOW);
digitalWrite(vermelho, HIGH);
}
void azulFuncao(){
digitalWrite(azul, HIGH);
digitalWrite(verde, LOW);
digitalWrite(vermelho, LOW);
}
void verdeFuncao(){
digitalWrite(azul, LOW);
digitalWrite(verde, HIGH);
digitalWrite(vermelho, LOW);
}
void amareloFuncao(){

```

```

analogWrite(azul, 0);
analogWrite(verde, 50);
analogWrite(vermelho, 255);
}
void roxoFuncao(){
analogWrite(azul, 207);
analogWrite(verde, 0);
analogWrite(vermelho, 255);
}
void brancoFuncao(){
digitalWrite(azul, HIGH);
digitalWrite(verde, HIGH);
digitalWrite(vermelho, HIGH);
}
void loop()
{
if(Serial.available())
{
cor = Serial.readString();
Serial.println(cor);
}
if(cor == "Vermelho")
{
vermelhoFuncao();
}
if(cor == "Azul"){
azulFuncao();
}
if(cor == "Verde"){
verdeFuncao();
}
if(cor == "Amarelo"){
amareloFuncao();
}
if(cor == "Roxo"){
roxoFuncao();
}
if(cor == "Branco"){
brancoFuncao(); }

```

}
}

3 | RESULTADO E DISCUSSÕES

Para realizar tanto o teste dos códigos no sistema, tal como a correta conexão dos sensores o sistema foi montado como demonstra a figura 3.

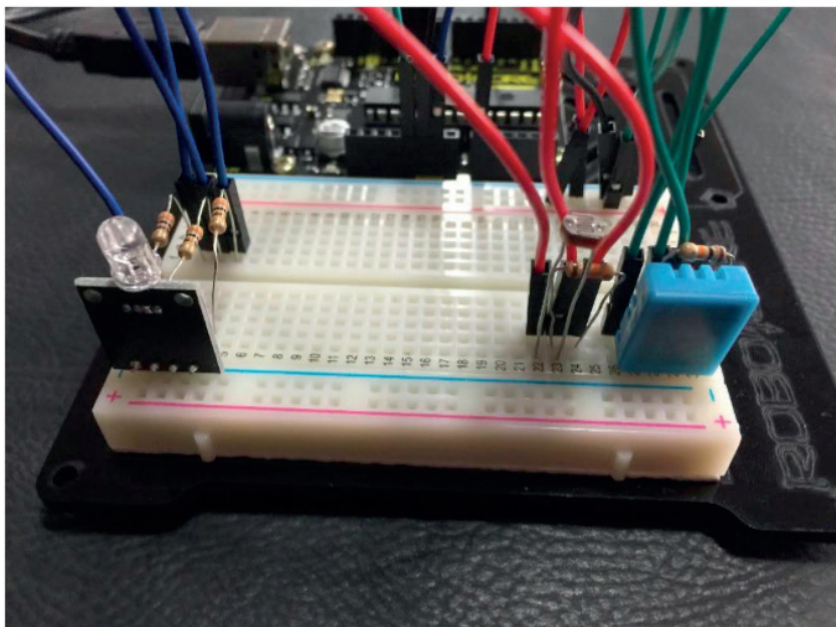


Figura 3: Circuito teste montado

Fonte: Autoria própria (2020).

O protótipo proposto demonstrou funcionamento próximo ao esperado, apresentando pequenas deficiências parciais em algumas funções. O projeto inicial do mesmo utilizou LED RGB único, porém para uma oferta mais homogênea de luz no sistema é necessária a substituição por fita de LED RGB. O posicionamento do sensor da leitura da luminosidade deve ser repensado para que sua leitura seja próxima ao absorvido pelo meio de cultivo, portanto sua instalação deve ser realizada em posição estratégica. Para as leituras de variação de temperatura e umidade, tal como de luminância, propomos armazenamento dos dados obtidos em memória externa e posteriormente agrupá-los em planilha excel, pois o monitor serial gráfico do Arduino dificulta uma análise global das variações do sistema. Na figura 4 esta demonstrada a visão do monitor serial do Arduino para temperatura e

umidade.

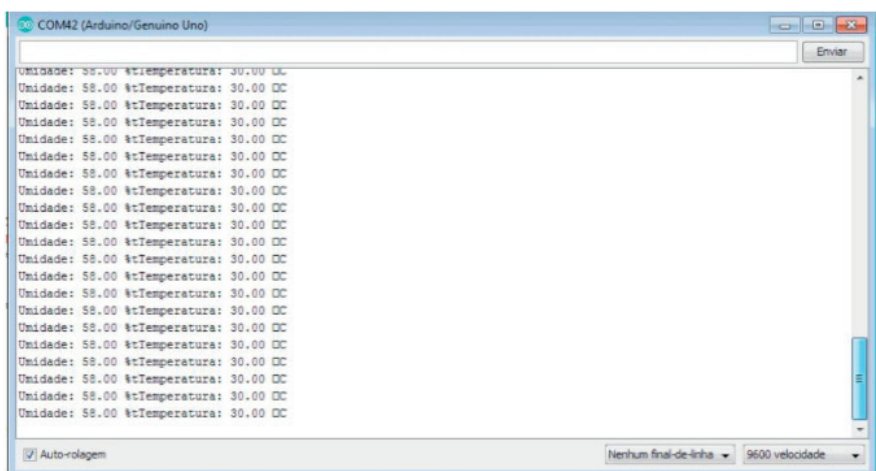


Figura 4: Monitor serial para umidade e temperatura

Fonte: Autoria própria (2020).

Alguns problemas relacionados a programação, em relação a sequência de sub-rotinas necessárias para as tarefas de aquisição de dados, escrita em display e leituras realizadas, demandaram um tempo de análise de dados acima do esperado, problemas estes solucionados leituras mais esparsas em relação a variação de temperatura, umidade e intensidade luminosa proporcionadas com o aprofundamento dos estudos na estrutura de linguagem da plataforma Arduino.

A proposta de análise gráfica em Excel para uma visão global das variações do processo facilita a interpretação dos dados obtidos, tal como possíveis comparações caso seja realizada alguma alteração de setpoint.

4 | CONCLUSÃO

A criação de um protótipo com base no Arduino para automação do controle de cultivos mixotróficos de *H. pluvialis* se mostrou possível de ser construída. A partir do sistema de automação desenvolvido neste estudo, foi possível dispor dos dados através dos sensores e analisar como os *setpoints* podem influenciar na obtenção do produto final, além de estabelecer maior controle sob o processo.

Para que o sistema de automação proposto nesse estudo alcance os objetivos esperados em cultivos de *H. pluvialis* para a produção de astaxantina, será necessário inserir sensores de pH e densidade ótica, bem como estruturar o protótipo.

Com o processo de produção de carotenoides estabelecido, será possível alterar os *setpoints* dos parâmetros de controle dos sensores, afim de obter os melhores resultados de produção do produto de interesse.

REFERÊNCIAS

BRINDA B.R.; Sarada R.; KAMATH, B.S.; RAVISHANKAR, G.A., **Accumulation of as- taxanthin in flagellated cells of Haematococcus pluvialis—cultural and regulatory aspects**. Curr Sci 87, p.1290–1295, 2004.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A., **Procedure for large-scale production of astaxanthin from haematococcus**, US Patent 6,022,701, 2000.

CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A.; VARGAS, S.; HOENEISEN, M.; GONZÁLEZ, N., **Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe** (Nevada, USA) under laboratory conditions. Biological Research, 36(3-4), 343-357, 2003.

CORDERO, B.; OTERO, A.; PATINO, M.; ARREDONDO, B. O.; FABREGAS, J. **Astaxanthin Production from the Green Alga Haematococcus pluvialis with Different Stress Conditions**. Biotechnology LeCers, v. 18, n.2, p. 213-218, Feb. 1996.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P., **Colouring our foods in the last and next millennium**. International Journal of Food Science and Technology, v. 35, p. 5-22, 2000.

GUERIN, M.; HUNTLEY M. E.; OLAIZOLA, M., **Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition**; Mera Pharmaceuticals Inc.,TRENDS in Biotechnology, v.21, n.5, 2003.

MAPARI, S.A.S.; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O. ; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. Thrane, U.; **Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants**, v.16, p. 231-238, 2005.

MONK, Simon. **Programação com Arduino: começando com sketches** [recurso eletrônico] /Simon Monk; tradução: Anatólio Laschuk. - 2. Ed. – Porto Alegre: Bookman, 2017.

SUH, I. S.; JOO, H-N; LEE, C-G. **A novel double-layered photobioreactor for simultaneous Haematococcus pluvialis cell growth and astaxanthin accumulation**. Journal of Biotechnology, 2006.

ZHEKISHEVA,M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN,Z.; **Accumulation of oleic acid in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) under nitro- gen starvation or high light is correlated with that of Astaxanthin esters**, Journal of Phycology, v.38, issue 2, 2002.

SOBRE OS ORGANIZADORES

CLÉCIO DANILO DIAS DA SILVA - Doutorando em Sistemática e Evolução pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Mestre em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Especialista em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Especialista em Educação Ambiental e Geografia do Semiárido pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Especialista em Tecnologias e Educação a Distância pela Faculdade São Luís (FSL). Especialista em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Facex (UNIFACEX). É membro do corpo editorial da Atena Editora; Aya Editora, Editora Amplla. Tem vasta experiência em Zoologia de Invertebrados, Ecologia aplicada; Educação em Ciências e Educação Ambiental. Áreas de interesse: Fauna Edáfica; Taxonomia e Ecologia de Collembola; Ensino de Biodiversidade e Educação para Sustentabilidade.

DANIELE BEZERRA DOS SANTOS - Doutora em Psicobiologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UFRN). Mestre em Bioecologia Aquática pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Facex (UNIFACEX). No âmbito profissional e de gestão acadêmica e administrativa, coordenou a Pesquisa e Extensão do UNIFACEX. Coordenou os cursos de Pós-Graduação Especialização em Meio Ambiente e Gestão de Recursos Naturais (UNIFACEX) e da Especialização em Microbiologia e Parasitologia (UNIFACEX). Também coordenou o curso de graduação Licenciatura em Ciências Biológicas do UNIFACEX. Na esfera pública federal, coordenou o curso de Especialização em Ensino de Ciências Naturais e Matemática do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN). Atualmente, é professora do Curso de Pós-Graduação Especialização em Ensino de Ciências Naturais e Matemática do IFRN e atual como Coordenadora da Pesquisa e Inovação do Campus Pau dos Ferros (COPEIN-PF/IFRN). Áreas de interesse: Ensino; Meio Ambiente; Comportamento Animal.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Amilases 7, 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12

Antioxidante 74, 78, 80, 81, 83, 143, 144, 148, 149, 151, 188

Arduino 188, 189, 190, 191, 195, 196, 197

Artemísia 67, 68

Aterosclerose 93, 94, 95, 97, 107

Atividade Antimicrobiana 33, 35, 36, 39, 40, 41, 78, 80, 144, 149, 150

Atividades Biológicas 8, 74, 76, 80, 81

B

Bactérias Cariogênicas 33, 34, 35, 39, 40, 41

Bacteriologia 44, 47

Biossíntese 144, 145

Bisfenol 7, 19, 21

C

Câncer oral 84, 85, 87, 89

Carcinoma 9, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92

Carotenoide 188

Citationitems 179, 180

Contraceptivos Hormonais 115, 116

Controle de vetores 178

Cultivos Mixotróficos 188, 196

D

Desregulador Endócrino 19, 20, 21

Dimetilsulfóxido 7, 14, 15

DNA 40, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 90, 96, 97, 117, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172

Doença Parasitária 178

Doenças cardiovasculares 94, 116, 173

E

Embiratanha 74, 75, 77, 80, 81, 82

Esquistossomose 178, 185, 186

Estética 10, 154, 155, 156, 157, 160, 162, 163, 165

Estrogênio 21, 24, 29, 115, 116, 117, 118, 120, 121

F

Fermentação Alcoólica 109, 110

Fungos Filamentosos 2, 3

H

Hipóxia 84, 85, 86, 90, 91

Homeostase da glicose 115, 116, 126, 127, 128

I

Ilhas de refrigeração 9, 133, 136

Inovação tecnológica 144, 166, 167

L

Leveduras 9, 109, 110, 111, 112, 113, 144, 146

M

Marcador Prognóstico 84, 85

Mebendazol 14, 15

Microalga 188, 189

Microorganismos 8, 12, 52, 55, 56, 58, 59, 114, 134, 139, 141, 144, 145, 146, 149, 189

O

Obesidade 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28

Ovariectomia 20, 22, 28, 29

P

Patógenos Bucais 34

Pectinas 110

Plantas Medicinais 35, 68, 72, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 82, 83

Plasmídeos 8, 55, 56, 58, 59, 62, 63, 64

Produção Avícola 46, 47, 135

Produção Enzimática 2, 11

Produtos Naturais 3, 11, 67, 93, 144

Progesterona 115, 116, 118

Q

Química Medicinal Computacional 93, 98, 104

R

Regiões Organizadoras de Nucléolos 85, 86

S

Salmonelose 9, 45, 52, 53, 133, 135

Saúde Pública 33, 45, 46, 53, 94, 130, 133, 134, 135, 178, 185, 186

Setor Supermercadista 135

Soforolipídios 10, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153

T

Tabagismo 93, 94, 95

Terapia gênica 10, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175

Tiabendazol 14, 15

Toxina Botulínica 10, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165

Toxocaríase 14, 15

V

Vetores Virais 10, 166, 168, 170, 173

Z





Zoonose 14, 15, 44, 45

A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2021

A Estruturação e Reconhecimento das Ciências Biológicas na Contemporaneidade 2

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br