

Ciências biológicas: Realidades e virtualidades 3

Edson da Silva
(Organizador)



Ciências biológicas: Realidades e virtualidades 3

Edson da Silva
(Organizador)



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

iStock

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.

Open access publication by Atena Editora



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

Profª Drª Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa

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. Arnaldo Oliveira Souza Júnior – Universidade Federal do Piauí
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. Dr. Humberto Costa – Universidade Federal do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. José Luis Montesillo-Cedillo – Universidad Autónoma del Estado de México
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. Dr. Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
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. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
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^a Dr^a Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof^a Dr^a Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
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. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
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
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª 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
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª 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
Profª Drª 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
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª 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
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª 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
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª 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
Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Me. Alessandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andrezza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
Profª 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
Profª 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. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
Profª Drª 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. Edson Ribeiro de Brito de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
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
Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramirez – 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/UFGA
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
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Livia 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
Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª 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. Me. Marcos Roberto Gregolin – Agência de Desenvolvimento Regional do Extremo Oeste do Paraná
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembi Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª 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
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Dr. Sullivan Pereira Dantas – Prefeitura Municipal de Fortaleza
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Universidade Estadual do Ceará
Profª 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

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Maria Alice Pinheiro
Correção: Maiara Ferreira
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os autores
Organizador: Edson da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C569 Ciências biológicas: realidades e virtualidades 3 /
Organizador Edson da Silva. – Ponta Grossa - PR:
Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-250-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.507211207>

1. Ciências Biológicas. I. Silva, Edson da (Organizador).
II. 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; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

As Ciências Biológicas integram diversas áreas do conhecimento que estudam os seres vivos e suas relações entre o meio ambiente, além de mecanismos e processos que condicionam a vida. Sua integração envolve ciências da saúde, biotecnologia, meio ambiente, biodiversidade entre outros fatores.

Descobertas e inovação no âmbito das Ciências Biológicas exigem a compreensão de que a vida se organiza no decorrer do tempo, com a ação de processos evolutivos, resultando na diversidade de formas sobre as quais atuam as condições ambientais e o desenvolvimento dos seres vivos. Diante disso, os seres humanos não estão isolados. Eles estabelecem sistemas que constituem complexas relações de interdependência.

Neste contexto a obra “Ciências Biológicas: realidades e virtualidades” foi contemplada com dois novos volumes. O volume 2 está organizado com 17 capítulos e o volume 3 com 15. Os capítulos contaram com a autoria de diversos profissionais, universitários e/ou pesquisadores de diferentes regiões do Brasil, que compartilham seus dados resultantes de pesquisas de natureza básicas e aplicadas, revisões de literatura, ensaios teóricos e vivências no contexto educacional relacionado às Ciências da Vida.

Desejamos que esta coletânea contribua para o enriquecimento da formação universitária e da atuação profissional no âmbito das Ciências da Vida. Agradeço os autores pelas contribuições que tornaram essa edição possível, e juntos, convidamos os leitores para desfrutarem as publicações.

Edson da Silva

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

RETOSSIGMOIDOSCOPIA: BIÓPSIA A SERVIÇO DO DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Amanda de Jesus Santos
Isabela Teles de Souza
Jon Éder Lima Miranda
Ana Maria Guedes de Brito

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112071>

CAPÍTULO 2..... 12

ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL FELINA EM GATOS DOMÉSTICOS DA CIDADE DE SALVADOR/BAHIA/BRASIL

Nadia Rossi de Almeida
Guilherme Pereira da Silva Figueiredo
Danielle de Campos Vieira Barbosa
Bernardo de Pinho Farias
Maiara Cruz de Jesus
Bianca Ferreira Cunha
Rayana Pombinho de Oliveira
Maria Luiza Bertani de Araujo
Manuela da Silva Sòlca
Ilka do Nascimento Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112072>

CAPÍTULO 3..... 25

A IMPORTÂNCIA DA DISCIPLINA DE BIOSSEGURANÇA NO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CONTRIBUIÇÕES PEDAGÓGICAS PARA A FORMAÇÃO DO BIÓLOGO

Larissa da Silva
Nayra Thaislene Pereira Gomes
Lucas Yure Santos da Silva
Cicera Alane Coelho Gonçalves
Renata Torres Pessoa
Mateus Pereira Santana
Paula Patrícia Marques Cordeiro
Laíza Maria Ulisses Magalhães
Paulo Ricardo Batista
Jessyca Nayara Mascarenhas Lima
Sonia Antero de Oliveira
Nair Silva Macêdo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112073>

CAPÍTULO 4..... 33

CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE *BEAUVERIA BASSIANA*, *METARHIZIUM ANISOPLIAE* E *METARHIZIUM FLAVOVIRIDE* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Ubirany Lopes Ferreira

Ana Célia Rodrigues Athayde
Elza Áurea de Luna Alves Lima

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112074>

CAPÍTULO 5..... 43

USO DE CASCAS DE SEMENTES DE MORINGA OLEIFERA ÍNTEGRAS E FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA

Estêvão Brasiliense de Souza
Doris Sobral Marques Souza
Paula Rogovski
Rafael Dorighello Cadamuro
Maria Célia da Silva Lanna
Gislaine Fongaro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112075>

CAPÍTULO 6..... 69

DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA A TRIAGEM DE NANOFÁRMACOS UTILIZANDO COMO MODELO ESFEROIDES CELULARES

João Pedro Dantas Ferreira
Gabriel Vieira de Oliveira
Letícia Emiliano Charelli
Tiago Albertini Balbino

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112076>

CAPÍTULO 7..... 81

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES DE BIGNONIACEAE

Nathália Duques
Maria Anita Lemos Vasconcelos Ambrosio
Osvaine Júnior Alvarenga Alves
Valéria Maria Melleiro Gimenez
Márcio Luís Andrade e Silva
Wilson Roberto Cunha
Ana Helena Januario
Patrícia Mendonça Pauletti

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112077>

CAPÍTULO 8..... 93

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM DIFERENTES ETAPAS NA CRIAÇÃO DE FRANGO

Hellen Yukari Kitagawa
Maísa Fabiana Menck Costa
Thiago Hideo Endo
Leonardo Pinto Medeiros
Natália Yukari Kashiwaqui
Luís Eduardo de Souza Gazal
Victor Dellevedove Cruz
Ana Angelita Sampaio Baptista

Gerson Nakazato
Renata Katsuko Takayama Kobayashi

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112078>

CAPÍTULO 9..... 103

FINDRISK: ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO PARA DIABETES MELLITUS 2 COMO PREVENÇÃO NO CAMPO DA SAÚDE COLETIVA

José Auricélio Bernardo Cândido
Geanne Maria Costa Torres
Inês Dolores Teles Figueiredo
Ana Sávia de Brito Lopes Lima e Souza
Slayton Frota Sá Nogueira Neves
Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves Souza
Ivina Nicássia de Melo Fernandes
Ana Paula Pires Gadelha de Lima

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5072112079>

CAPÍTULO 10..... 117

COMPORTAMENTO E HÁBITOS DAS CORUJAS BURAQUEIRAS *ATHENE CUNICULARIA*: COMPILAÇÃO DAS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Nari Victoria Takahashi
Andréa Fagundes Grava

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120710>

CAPÍTULO 11..... 124

ENFERMEIRAS NA GESTÃO DE UMA UNIDADE DE CUIDADOS DE PACIENTES PÓS-COVID-19

Rosane Maria Sordi
Terezinha de Fátima Gorreis
Rozemy Magda Vieira Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120711>

CAPÍTULO 12..... 133

LEITE FERMENTADO LIOFILIZADO DE BACURI (*PLATONIA INSIGNIS*)

Vinicius Costa Barros
Adriana Crispim de Freitas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120712>

CAPÍTULO 13..... 147

RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA DE RECOMPENSA E A DEPENDÊNCIA QUÍMICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Sara Maria Xavier da Cruz
Maria Eduarda dos Santos Pereira de Oliveira
Rauana Gomes Barbosa da Silva
José André Camelo de Alcântara
Matheus Italo da Conceição
Jessica Marcela Barbosa da Silva Ribeiro Rocha

Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti
Vanessa dos Santos Nunes
Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120713>

CAPÍTULO 14..... 157

ATIVIDADE ANTIBIOFILME BACTERIANO DE DESINFETANTES

Lucas Marcelino dos Santos Souza
Carolina Cella Geron
Miriam Dibo
Leonardo Pinto Medeiros
Lucas Pinto Medeiros
Bruna Carolina Gonçalves
Bianca Cerqueira Dias Rodrigues
Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Gerson Nakazato

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120714>

CAPÍTULO 15..... 167

METODOLOGIAS ATIVAS NO ENSINO PRESENCIAL DA DISCIPLINA HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA ORAL: RELATO DE EXPERIÊNCIA

Dara Karen Freire de Oliveira
Maria Eduarda Dias Monteiro Bispo
Ana Luiza Farias de Almeida
Luciana Maria Silva de Seixas Maia
Eliete Cavalcanti da Silva
Marta Gerusa Soares de Lucena

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.50721120715>

SOBRE O ORGANIZADOR..... 176

ÍNDICE REMISSIVO..... 177

RETOSSIGMOIDOSCOPIA: BIÓPSIA A SERVIÇO DO DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Data de aceite: 01/07/2021

Data da submissão: 09/06/2021

Amanda de Jesus Santos

Universidade Tiradentes/ Aracaju-Sergipe
<http://lattes.cnpq.br/9169222400620175>

Isabela Teles de Souza

Universidade Tiradentes/ Aracaju-Sergipe
<http://lattes.cnpq.br/9683334812110009>

Jon Éder Lima Miranda

Universidade Tiradentes/ Aracaju-Sergipe
<http://lattes.cnpq.br/1193716018765461>

Ana Maria Guedes de Brito

Aracaju-Sergipe
<http://lattes.cnpq.br/4002465424542592>

RESUMO: A esquistossomose mansônica é uma doença infecto-parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*. Representa um grave problema de saúde pública em todo o Brasil, com destaque para região nordeste que apresenta maior prevalência, sendo o estado de Sergipe endêmico para este agravo. O estudo teve como objetivo analisar a prevalência da Esquistossomose mansônica em material obtido por biópsia do reto e sigmoide no período de 2010 a 2014. Trata-se de um estudo ecológico realizado a partir de arquivos de um laboratório de anatomia em Aracaju/SE. A amostra foi composta por 2.882 exames anatomopatológicos de indivíduos que realizaram a retossigmoidoscopia e tiveram seu diagnóstico para o helminto

Schistosoma mansoni. Foram incluídos exames de pacientes com faixa etária superior a 18 anos e residentes no estado de Sergipe. As variáveis elencadas foram gênero, faixa etária, procedência, suspeita médica, manifestações clínicas e presença ou ausência de *Schistosoma mansoni*. Após análise e tabulação dos dados foi utilizada estatística descritiva e representação gráfica para evidenciar os resultados. Observou-se aumento na avaliação histopatológica do segmento intestinal no período estudado, 386 em 2010 e 768 em 2014. Foram confirmados 88 casos de esquistossomose mansônica a partir da avaliação anatomopatológica, sendo que a maior parte não possuía suspeita médica para a parasitose, configurando assim um achado clínico laboratorial ocasional. O gênero masculino foi o mais acometido (68%), a faixa etária mais prevalente foi de 30 a 49 anos, o município de maior procedência foi Aracaju. As manifestações clínicas mais frequentes foram processo inflamatório, lesão polipoide e diarreia crônica. Verificou-se que análise anatomopatológica de fragmentos retossigmoideanos é um mecanismo relevante que pode ampliar as chances diagnósticas para esquistossomose mansônica. Os resultados demonstraram a importância da realização de estudos da esquistossomose mansônica em regiões endêmicas.

PALAVRAS - CHAVE: *Schistosoma mansoni*; Esquistossomose mansônica; Retossigmoide; Anatomia patológica.

RECTOSIGMOIDOSCOPY: BIOPSY AT THE SERVICE OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI'S DIAGNOSTIC

ABSTRACT: Schistosomiasis mansoni is an infectious-parasitic disease caused by *Schistosoma mansoni*. It represents a serious public health problem throughout Brazil, especially in the northeast region, which has a higher prevalence, and the state of Sergipe is endemic for this problem. The study aimed to analyze the prevalence of Schistosomiasis mansoni in material obtained by rectal and sigmoid biopsy from 2010 to 2014. This is an ecological study carried out from the files of a pathological anatomy laboratory in Aracaju/SE. The sample consisted of 2,882 pathological examinations of individuals who underwent rectosigmoidoscopy and had their diagnosis for the helminth *Schistosoma mansoni*. Examinations of patients aged over 18 years and residents of the state of Sergipe were included. The variables listed were gender, age, origin, medical suspicion, clinical manifestations and presence or absence of *Schistosoma mansoni*. After analyzing and tabulating the data, descriptive statistics and graphical representation were used to show the results. There was an increase in the histopathological evaluation of the intestinal segment during the study period, 386 in 2010 and 768 in 2014. Eighty-eight cases of schistosomiasis mansoni were confirmed from the anatomopathological evaluation, and most of them had no medical suspicion for the parasitosis, thus configuring an occasional clinical laboratory finding. Males were the most affected (68%), the most prevalent age group was from 30 to 49 years old, the city with the highest origin was Aracaju. The most frequent clinical manifestations were inflammatory process, polypoid lesion and chronic diarrhea. It was found that anatomopathological analysis of rectosigmoid fragments is a relevant mechanism that can increase the diagnostic chances for schistosomiasis mansoni. The results demonstrated the importance of conducting studies on schistosomiasis mansoni in endemic regions.

KEYWORDS: *Schistosoma mansoni*; Schistosomiasis mansoni; Rectosigmoid; Anatomical Pathology.

1 | INTRODUÇÃO

Esquistossomose mansônica é uma doença infecto-parasitária causada pelo platelminto trematódeo *Schistosoma mansoni* que possui como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria* e o homem como principal hospedeiro definitivo (PINHEIRO, 2010; SOUZA et al., 2011; CUNHA; GUEDES, 2012). É um problema grave de saúde pública no Brasil associado a fatores socioeconômicos e ambientais, tendo o Nordeste como área endêmica e sendo o estado de Sergipe possuidor da maior prevalência (SANTOS et al., 2011; CUNHA; GUEDES, 2012; NASCIMENTO, 2013).

Distintas manifestações clínicas da doença podem ser constatadas nas fases aguda e crônica. Na aguda têm-se reações de hipersensibilidade que raramente acometem indivíduos de áreas endêmicas, já na crônica destaca-se o agravamento com comprometimento de órgãos como fígado, trato digestório e baço que se caracteriza pela formação de granulomas que representam importante fenômeno patogênico da doença, sendo evidenciado por acentuada resposta inflamatória nos tecidos, originando uma

estrutura fibrosa e lamelar (SOUZA et al., 2011; QUEIROZ, 2012).

Por apresentar uma sintomatologia diversificada, que às vezes pode ser confundida com outras patologias, e um acentuado grau de morbimortalidade, o diagnóstico precoce e preciso da esquistossomose mansônica consiste em um instrumento-chave para aspectos importantes dessa infecção, como determinante epidemiológico, fatores pertinentes à morbidade, avaliação de ações terapêuticas e assistência de medidas de controle (PEREIRA, 2008; COSTA E SILVA, 2009; GAMA, 2010; NASCIMENTO, 2013; BRASIL, 2014).

O quadro clínico e os dados epidemiológicos levam à suspeita do agravo à saúde acima citado e o diagnóstico é confirmado pelos exames laboratoriais através de métodos diretos, como exames de fezes, pesquisa de anticorpos circulantes, biópsia hepática e retal; e indiretos, como intradermorreação (IDR), hemograma, exames de imagem, reações sorológicas e retossigmoidoscopia (VIDAL et al., 2001; SOUZA et al., 2011; REIS, 2012; BRASIL, 2014).

A biópsia constitui relevante ferramenta diagnóstica por fornecer material para avaliação histopatológica quando os outros métodos não possibilitaram a confirmação da esquistossomose mansônica. Nesse âmbito, a retossigmoidoscopia permite a visualização da mucosa do intestino grosso e de possíveis alterações, igualmente obtenção de fragmentos do tecido onde podem ser encontradas evidências de *Schistosoma mansoni* (PINHEIRO, 2010; VITORINO et al., 2012; BRASIL, 2014). Diante do exposto, esse estudo buscou avaliar a prevalência da doença em material de biópsia do reto e sigmóide a partir de dados oriundos de um laboratório de anatomia patológica de Aracaju/SE no quinquênio de 2010 a 2014.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo ecológico, com dados obtidos em arquivos de usuários que realizaram exames em um laboratório de anatomia patológica em Aracaju/SE. Esse laboratório disponibiliza seus serviços a vários convênios, inclusive o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo selecionado por oferecer atendimento especializado para pessoas necessitadas de laudos de retossigmoidoscopia.

Foram incluídas neste estudo, as pessoas que realizaram exame de retossigmoidoscopia e tiveram seus diagnósticos efetivados pelos profissionais patologistas vinculados ao laboratório-alvo para o helminto *Schistosoma mansoni* entre 2010 e 2014, com faixa etária superior a 18 anos e residentes no estado de Sergipe à época da pesquisa. Todos os procedimentos de coleta de dados tiveram início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes sob o parecer nº 0411208.

As variáveis trabalhadas foram gênero, faixa etária, procedência, suspeita médica, manifestações clínicas e presença ou ausência de *Schistosoma mansoni*. Com os dados

obtidos foram executadas tabulações utilizando o *software* Graph Pad Prism® 6.01. Os resultados foram expressos em frequência absoluta e relativa.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Notou-se um aumento relevante nas análises de material oriundo de reto e sigmóide quando se compara o quantitativo de 2010 (386) e 2014 (768) como observado na tabela 1. Esse fato pode ser encarado por dois prismas: em consequência de os médicos gradativamente estarem utilizando mais recursos para o diagnóstico precoce da esquistossomose mansônica e devido à capacidade do *Schistosoma mansoni* em casos crônica os provocar fibrose da alça retossigmoideana (REY, 2008; FERREIRA, 2012; NASCIMENTO, 2013).

Ano	AP	RS
2010	30.045	386
2011	31.804	474
2012	37.184	612
2013	33.289	642
2014	34.901	768

Tabela 1. Usuários que realizaram exame anatomopatológico, enfatizando a amostra de retossigmoide, expressos em frequência absoluta, no período de 2010 a 2014. AP: anatomopatológico; RS: retossigmoide.

Fonte: Arquivo de um laboratório de anatomia patológica em Aracaju/SE.

No período estudado foram diagnosticados 88 casos de esquistossomose mansônica (n=88), distribuídos como segue: 14 casos em 2010, 13 em 2011, 24 em 2012, 18 em 2013 e 19 casos em 2014. Vale ressaltar que o número de ocorrência da parasitose em 2012 pode estar associado ao aumento pontual na produtividade do laboratório de anatomia patológica, alvo desse estudo, suscitando uma questão de proporcionalidade e não necessariamente uma expansão da endemia.

Para fins confirmatórios da esquistossomose mansônica o diagnóstico laboratorial se faz indispensável, o qual pode ser efetivado através de métodos indiretos executado por testes sorológicos, como o radioimunoensaio, (NEVES, 2009; OLIVEIRA; AMOR, 2012); e os diretos ou parasitológicos que identificam os ovos do parasita nas fezes ou tecidos do portador. Nesse grupo está inserido o exame parasitológico de fezes que é considerado “padrão ouro” e a biópsia do retossigmoide (VITORINO et al., 2012).

Não obstante, o exame coproparasitológico possui inegável importância para o

diagnóstico da esquistossomose mansônica, ficou claro também que ele possui limitações que podem desencadear uma subestimativa real dessa parasitose. Então, dependendo da circunstância, torna-se premente buscar alternativas com a meta de melhorar o diagnóstico da doença (BORGES et al., 2014). Para Vitorino et al. (2012), a biópsia de retossigmóide pode ser utilizável com positividade significativa e ainda é de suma importância no controle de cura, podendo ser adotada para esta finalidade.

Em contraponto, segundo a Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, a biópsia de reto e sigmóide por ser invasiva e causar desconforto ao paciente, deve ser usada com parcimônia (BRASIL, 2002). Neste estudo não houve a intenção de comparar os resultados dos exames parasitológicos de fezes e os desfechos obtidos por biópsia de reto e sigmóide, contudo, eles podem ser usados de forma complementar sempre que possível.

No que concerne à Figura 2, se demonstrou a distribuição dos casos baseada na suspeita médica, onde evidenciou-se que a maioria dos positivados para *Schistosoma mansoni* não possuíam a suposição da ocorrência dessa parasitose, configurando assim um achado clínico laboratorial ocasional do parasita. No entanto, para os casos onde a suspeita da esquistossomose mansônica estava presente, mas o anatomopatológico não foi positivado, deve-se considerar que a ausência de ovos na amostra não significa ausência da enfermidade, sendo necessária a correlação com dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, igualmente a repetitividade do exame.

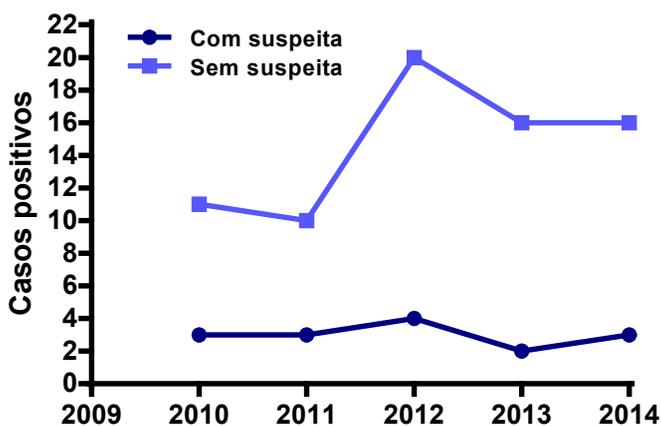


Figura 1. Distribuição dos casos de esquistossomose mansônica em amostras de retossigmóide, conforme suspeita médica, em Sergipe de 2010 a 2014.

Fonte: Arquivo computadorizado de um laboratório de anatomia patológica em Aracaju/SE.

Para Vitorino et al. (2012), a biópsia de retossigmóide colabora como ferramenta diagnóstica da esquistossomose mansônica, porém, constitui mais um achado do que necessariamente um protocolo diagnóstico. Abordam ainda que informações sobre o

paciente sejam imprescindíveis na tentativa de conclusão diagnóstica, como naturalidade, episódios de sintomatologia de fase aguda da parasitose, destacando-se a dermatite cercariana e febre de Katayama, exposição a coleções hídricas e passagem em áreas conhecidamente endêmicas.

Sobre a distribuição dos casos de *Schistosoma mansoni* por gênero, foi observado um predomínio do gênero masculino (68%), em consonância com estudos conduzidos por Cardim (2010); Cunha e Guedes (2012). Nesta pesquisa, a prevalência masculina pode ser justificada pelos hábitos culturais dos sergipanos em atividades de lazer e também laborais, como banhos de rio, pesca e práticas esportivas que se notou serem mais frequentes no gênero acima citado. Observou-se também a existência de diversas coleções hídricas de tamanhos variados, tanto rurais como periurbanas e urbanas em Sergipe, inclusive na grande Aracaju, igualmente a presença do molusco hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, o *Biomphalaria glabrata*, e infraestrutura sanitária precária.

É válido enfatizar que a relação entre gênero e esquistossomose mansônica por vezes não deve ser concebida como um fator determinante para a ocorrência desse agravo à saúde. As atividades desenvolvidas pelos indivíduos, independente do gênero, atuam melhor como indicadores de risco, inclusive devido à nova configuração da sociedade com mulheres exercendo cada vez mais funções anteriormente exclusivas dos homens (FERREIRA; TABOSA E SILVA, 2007).

Para faixa etária constatou-se maior prevalência para esquistossomose mansônica nas pessoas com 30 anos a 49 anos, dados que respaldam os encontrados por Pinheiro (2010), no Ceará, onde foi verificado que indivíduos de 26 anos a 46 anos apresentavam maior prevalência do *Schistosoma mansoni*. Cardim et al. (2011) relataram que a faixa economicamente ativa com média de idade de 30,9 anos ainda é a que exhibe taxas expressivas em áreas endêmicas para esquistossomose mansônica, especialmente no Nordeste.

A esquistossomose mansônica apresenta vasta extensão geográfica e ocorre de forma endêmica atingindo grande parte dos estados brasileiros, sobretudo nas regiões Nordeste. Destaca-se Sergipe com altos índices de prevalência da doença (PEREIRA, 2008; QUEIROZ, 2012; REIS, 2012; NASCIMENTO, 2013; BRASIL, 2014).

Reis (2012) postulou que, segundo informações da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde em seu relatório de situação 2011, 53 dos 75 municípios do estado referido apresentam transmissão endêmica da esquistossomose mansônica, prevalecendo os municípios localizados nas zonas da mata e litoral. Esse estudo verificou (Quadro 1) que 26 municípios foram contemplados com resultados positivos para *Schistosoma mansoni*, a partir de material colhido por retossigmoidoscopia, sendo que a procedência não foi mencionada em um caso e Aracaju sobressaiu com maior número (52 casos), no quinquênio em estudo.

Por apresentar predominância de terras planas ou levemente elevadas, bem

como banhadas por rios como São Francisco, Sergipe, Vaza-Barris, Real e Japarutuba, o estado de Sergipe oferece condições ambientais oportunas ao desenvolvimento do molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Para Rollemberg et al. (2011), tal aspecto associado a fatores socioeconômicos favorecem a continuidade da infecção.

Município	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Aracaju	06	10	13	10	13	52
Araúá	-	-	01	-	-	01
Barra dos Coqueiros	-	-	01	-	-	01
Capela	01	-	01	-	-	02
Carmópolis	-	-	01	-	01	02
Cristinápolis	-	-	-	01	-	01
Estância	-	-	-	01	-	01
Itabaianinha	-	-	01	-	-	01
Itaporanga d'Ajuda	01	-	-	-	-	01
Lagarto	01	-	-	-	-	01
Maruim	01	-	-	-	-	01
Muribeca	-	01	-	-	-	01
Nossa Senhora das Dores	-	-	-	-	01	01
Nossa Senhora da Glória	01	-	-	-	-	01
Nossa Senhora do Socorro	-	-	03	-	02	05
Propriá	-	-	-	01	-	01
Riachão do Dantas	-	-	-	-	01	01
Riachuelo	-	-	-	01	-	01
Rosário do Catete	-	-	-	01	-	01
Salgado	-	-	01	01	-	02
São Cristóvão	-	-	02	01	-	03
Santa Luzia do Itanhy	-	-	-	01	-	01
Simão Dias	-	-	-	-	01	01
Tobias Barreto	-	01	-	-	-	01
Tomar do Geru	01	-	-	-	-	01
Umbaúba	02	-	-	-	-	02
Ignorado	-	01	-	-	-	01

Quadro 1. Casos confirmados de esquistossomose mansônica por Município de procedência em Sergipe de 2010 a 2014.

Fonte: Arquivo computadorizado de um laboratório de anatomia patológica em Aracaju/SE.

No que tange a Tabela 3, as manifestações clínicas informadas pelos médicos com números mais expressivos foram processo inflamatório (relatado como retite, colite ou retocolite) e lesão polipóide, porém, não foram levados em consideração os que não

possuíam manifestação clínica reportada pelo profissional requerente.

Manifestação Clínica	2010		2011		2012		2013		2014	
	N	f(%)								
Alteração de vascularização	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,26
Diarréia crônica	-	-	2	15,38	1	4,16	2	11,11	2	10,52
Dor abdominal	-	-	-	-	1	4,16	1	5,55	1	5,26
Granulações esbranquiçadas	1	7,14	-	-	1	4,16	-	-	-	-
Hemorragia digestiva baixa	1	7,14	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiperemia	-	-	-	-	-	-	1	5,55	1	5,26
Lesão polipóide	2	14,28	-	-	4	16,66	5	27,77	4	21,05
Microulcerações	1	7,14	-	-	1	4,16	-	-	1	5,26
Processo inflamatório	5	35,71	8	61,53	10	41,66	8	44,44	8	42,1

Tabela 3. Manifestações clínicas observadas pelo médico, expressas em frequência absoluta e relativa, em Sergipe de 2010 a 2014.

N: frequência absoluta.

Fonte: Arquivo computadorizado de um laboratório de anatomia patológica em Aracaju/SE.

Em seu estudo sobre os aspectos clínicos e endoscópicos da esquistossomose mansônica, Vidal et al. (2001) verificaram que, dos 2.464 exames de retossigmoidoscopia revisados, 442 apresentaram processo inflamatório intestinal, sendo que em 12,44% destes (55 casos) tratava-se de infecção por *Schistosoma mansoni* confirmada por avaliação histopatológica. Quanto aos pólipos, eles estavam presentes em 25% dos casos confirmados da doença.

Ovos de *Schistosoma mansoni* na parede dos segmentos intestinais promovem a ocorrência de processo inflamatório do tipo granulomatoso e sua grande concentração em algumas áreas leva à formação de pólipos por reação fibrosante excessiva. Pode-se ainda observar surtos diarréicos, por vezes sanguinolentos, cólica, tenesmo e meteorismo. Exames endoscópicos evidenciam ulcerações, aumento de vascularização, hiperemia, friabilidade da mucosa e pontilhados hemorrágicos (VIDAL et al., 2001; CARVALHO et al., 2008).

Em associação com dados epidemiológicos, a observação do aspecto colorretal endoscópico e de alterações do organismo auxiliam na detecção da esquistossomose mansônica, o que permite a tomada de medidas curativas e evita a sua evolução. As manifestações clínicas constituem então fatores de suspeição da parasitose referida,

porém, o diagnóstico é efetivado por meio do estudo anatomopatológico de fragmentos intestinais biopsiados (KALIL et al., 2006).

Reis et al. (1984) comentaram que a biópsia retal descrita na Venezuela em 1943 e introduzida no Brasil em 1947 ampliou as possibilidades diagnósticas da esquistossomose mansônica. Em seu trabalho, após estudarem 100 pacientes com suspeita clínica da doença através de exame parasitológico de fezes (Técnicas de Lutz (1932); Kato-Katz e Cols. (1954, 1960, 1972)), bem como avaliação histopatológica de fragmentos da mucosa retal, verificaram considerável vantagem da biópsia retal sobre os outros métodos. Entretanto, frente à simplicidade, custo reduzido e bom nível de eficácia é preconizada a utilização de exame parasitológico, preferencialmente pela Técnica Kato-Katz e Cols. (1954, 1960, 1972), em três amostras fecais. Com resultados negativos e persistindo a suspeita, a conduta da biópsia retal deve ser instituída.

Não obstante, em contraposição, Huggins (1971), já havia realizado estudo comparativo entre os métodos diagnósticos em 68 pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica e constatou maior índice de positividade no exame parasitológico de fezes (76,47%) pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (1934), em detrimento da biópsia retal (32,35%). Além disso, o autor referido buscou pesquisas semelhantes e percebeu que a maioria delas obteve resultados concordantes.

4 | CONCLUSÃO

O diagnóstico precoce do *Schistosoma mansoni* é indubitavelmente de suma importância, posto, determina a terapêutica que pode minimizar a morbidade e mortalidade nos portadores de esquistossomose mansônica. Portanto, qualquer amostra biológica humana que após a sua avaliação possa revelar a presença do parasita acima citado deve ser utilizada, inclusive material colhido por biópsia em retossigmoidoscopia. No entanto, por ser uma conduta invasiva e incômoda para o parasitado, deve ser usada com prudência pelos médicos.

REFERÊNCIAS

BORGES, L. S. et al. Perfil epidemiológico da esquistossomose em comunidade periférica do Município de Jequié-BA. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 2, p. 812-820, 2014.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842 páginas.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 144 páginas.

CARDIM, L. L. **Caracterização das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no Município Lauro de Freitas, Bahia**. 2010. 85 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CARDIM, L. L. et al. Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no Município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 899-908, 2011.

CARVALHO, R. B. et al. Granuloma esquistossomótico gigante do cólon com intussuscepção: relato de caso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 347-349, 2008.

COSTA E SILVA, M. F. **Acompanhamento clínico, epidemiológico e imunológico de pacientes portadores da fase aguda da esquistossomose mansoni, submetidos à terapêutica específica com Praziquantel**. 2009. 192 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

CUNHA, L. A. D.; GUEDES, S. A. G. Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, 2001-2006. **Ideias & Inovação**, v. 1, n. 1, p. 41-48, 2012.

FERREIRA, I. L. M.; TABOSA E SILVA, T. P. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 67-74, 2007.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GAMA, D. C. **Aspectos epidemiológicos e laboratoriais (eosinófilos e IgE total) em portadores de *Schistosoma mansoni* e geohelmintos**. 2010. 95 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

HUGGINS, D. Diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica. Estudo comparativo entre o exame das fezes e a biópsia retal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. V, n. 6, p. 333-347, 1971.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=se>>. Acessado em: 05 de abril de 2015 às 10 horas e 30 minutos.

KALIL, M. et al. Forma pseudotumoral intra-abdominal da esquistossomose mansônica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 33, n. 3, p. 203-204, 2006.

MELO, A. G. S. **Epidemiologia da esquistossomose e conhecimento da população em área periurbana de Sergipe**. 2011. 142 folhas. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

NASCIMENTO, G. L. **Formas graves da esquistossomose mansoni: carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010**. 2013. 73 folhas. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitose Dinâmica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

OLIVEIRA, V. F.; AMOR, A. L. M. Associação entre a ocorrência de parasitos intestinais e diferentes variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I, Araci, Bahia, Brasil.

Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 44, n. 1, p. 15-25, 2012.

PALMEIRA, D. C. C. et al. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 313-317, 2010.

PEREIRA, A. S. A. **Análise ultraestrutural da interação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana com o tegumento do *Schistosoma mansoni* e identificação da proteína ligante de LDL.** 2008. 66 folhas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

PINHEIRO, M. C. C. **Avaliação de três métodos coproscópicos para diagnóstico da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade no estado do Ceará.** 2010. 82 folhas. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

QUEIROZ, R. F. G. **Desenvolvimento e padronização de novas metodologias aplicadas ao diagnóstico e monitoração de cura da esquistossomose mansoni na fase inicial (aguda) e crônica.** 2012. 166 folhas. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012.

REIS, A. K. V. **Análise da confiabilidade dos exames laboratoriais para o diagnóstico da esquistossomose na rede de Laboratórios Centrais dos Estados da Paraíba e de Sergipe.** 2012. 78 folhas. Dissertação (Mestrado Modalidade Profissional em Epidemiologia em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

REIS, R. J. N. et al. Esquistossomose mansoni: diagnóstico pela biópsia retal e parasitológico em 100 casos selecionados. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 4, n. 2, p. 99-101, 1984.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROLLEMBERG, C. V. V. et al. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminths, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 91-96, 2011.

SANTOS, S. F. O. et al. Alerta sobre o risco de disseminação da esquistossomose para o estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 1, p. 85-88, 2011.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

VIDAL, M. A. N. et al. Esquistossomose Retal – Aspectos Clínicos e Endoscópicos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 21, n. 2, p. 70-74, 2001.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

CAPÍTULO 2

ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL FELINA EM GATOS DOMÉSTICOS DA CIDADE DE SALVADOR/BAHIA/ BRASIL

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 05/06/2021

Maria Luiza Bertani de Araujo

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/0678420966232829>

Nadia Rossi de Almeida

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/4292226842530490>

Manuela da Silva Sôlca

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/7818630661323981>

Guilherme Pereira da Silva Figueiredo

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/0899872400800131>

Ilka do Nascimento Gonçalves

Clínica Felina para gatos
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/5160616224038628>

Danielle de Campos Vieira Barbosa

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/2162748129236315>

Bernardo de Pinho Farias

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/0800593416263753>

Maiara Cruz de Jesus

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6119992475449929>

Bianca Ferreira Cunha

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/8954864197429178>

Rayana Pombinho de Oliveira

Universidade Federal da Bahia
Salvador-Bahia

<http://lattes.cnpq.br/6138953789313158>

RESUMO: O FIV é um Lentivirus imunossupressor análogo ao HIV. É encontrado principalmente na saliva e a principal via de transmissão ocorre por mordeduras e/ou arranhaduras. A característica da infecção é o declínio dos linfócitos T CD4+ e a consequente síndrome de imunodeficiência. A prevalência da doença é variável e depende da carga e virulência viral, idade, imunocompetência do hospedeiro e da região geográfica estudada. Gatos machos, não castrados e com acesso à rua geralmente são os mais acometidos. Na rotina clínica diagnóstica é utilizado o teste rápido imunocromatográfico ou de ELISA para a detecção de anticorpos anti-FIV. Até o momento, não existem publicações em plataformas de pesquisa acerca da epidemiologia da Imunodeficiência felina na Bahia. O objetivo deste estudo foi pesquisar a epidemiologia da Imunodeficiência felina em gatos domésticos da cidade de Salvador/Bahia. Como objetivo específico pretendeu-se estudar os principais

sinais clínicos desenvolvidos em gatos infectados pelo FIV. Amostras de sangue de 285 gatos foram colhidas para a detecção dos anticorpos anti-FIV utilizando os testes rápidos imunocromatográfico e de ELISA. No exame físico foi verificada a presença de alterações clínicas sugestivas de infecção, como a perda de peso, desidratação, alteração das mucosas, linfadenomegalia, sinais clínicos respiratórios, presença de complexo estomatite-gengivite e alterações neurológicas. Informações acerca da idade, sexo, raça, origem, acesso à rua, castração e presença de contactantes foram coletadas. A soroprevalência encontrada foi de 4,56% e a análise univariada evidenciou uma associação significativamente maior de soropositividade para FIV em gatos machos, com idade acima de cinco anos, com acesso à rua, errantes e provenientes da rua. Os sinais clínicos mais frequentemente observados foram: alterações do apetite, seguidos por sinais respiratórios, secreção ocular ou dermatopatias, desidratação ou prostração. Estes resultados poderão contribuir para o gerenciamento clínico e para o controle e profilaxia desta importante virose que acomete os felinos domésticos.

PALAVRAS - CHAVE: FIV, felinos, epidemiologia.

CLINICAL EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF FELINE VIRAL IMMUNODEFICIENCY IN DOMESTIC CATS IN SALVADOR CITY/BAHIA/BRAZIL

ABSTRACT: FIV is an immunosuppressive Lentivirus analogous to HIV. It is found mainly in saliva and the main route of transmission is through bites and/or scratches. The characteristic of the infection is the decline of CD4+ T lymphocytes and the consequent immunodeficiency syndrome. The seroprevalence of the disease is variable and depends on the viral load and virulence, age, host immunocompetence and geographic region studied. Male cats, not neutered and with street access are usually the most affected. In clinical diagnostic routine, the rapid immunochromatographic or ELISA test is used to detect anti-FIV antibodies. So far, there are no publications on research platforms about the epidemiology of feline immunodeficiency in Bahia. The aim of this study was to investigate the epidemiology of feline immunodeficiency in domestic cats in the Salvador city/Bahia. As a specific objective, it was intended to study the main clinical signs developed in FIV-infected cats. Blood samples from 285 cats were collected for the detection of anti-FIV antibodies using the rapid immunochromatographic and ELISA tests. The physical examination revealed the presence of clinical changes suggestive of infection, such as weight loss, dehydration, mucosal changes, lymphadenomegaly, clinical respiratory signs, presence of stomatitis-gingivitis complex and neurological changes. Information about age, sex, race, origin, access to the street, castration and presence of contacts were collected. The seroprevalence found was 4.56% and the univariate analysis showed a significantly greater association of seropositivity for FIV in male cats, aged over five years, with street access, straying and from the street. The most frequently observed clinical signs were: changes in appetite, followed by respiratory signs, eye discharge or dermatopathies, dehydration or prostration. These results may contribute to the clinical management and to the control and prophylaxis of this important virus that affects domestic cats.

KEYWORDS: FIV, felines, epidemiology.

1 | INTRODUÇÃO

A crescente aquisição de gatos como animais de companhia e sua concentração em pequenos grupos ou em colônias tem propiciado a incidência e persistência das infecções virais. As retrovíroses felinas talvez tenham, atualmente, a conotação das mais complexas infecções virais em Medicina Veterinária (Hosie et al., 2009). São síndromes causadas pelo vírus da leucemia felina (FeLV) e pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV). Ambos os vírus infectam os membros da família dos felídeos e estão amplamente disseminados em todo o mundo (Westman et al., 2016). Esses agentes - vírus envelopados de RNA- simples - replicam-se em vários tecidos e têm o potencial de determinar quadros imunossupressivos para os hospedeiros, mesmo que a partir de mecanismos diferentes (Miller et al., 2018, Eckstrand et al., 2017). O FIV é um membro do gênero *Lentivirus* ao qual também pertence o HIV, vírus causador da imunodeficiência humana (Miller et al.; 2018). O vírus é encontrado principalmente na saliva e a principal via de transmissão ocorre por mordeduras e/ou arranhaduras (Westman et al., 2016). Estudos recentes têm utilizado gatos infectados pelo FIV como modelo para a infecção humana pelo HIV no que se refere à semelhança da morfologia viral, dos sítios de latência e dos processos de neuropatogênese e imunossupressão (Miller et al., 2018; Eckstrand et al., 2017).

Após uma infecção aguda, a maioria dos gatos permanece como portador assintomático durante anos (Hosie et al., 2009). Entretanto, a característica da infecção pelo FIV é o gradual declínio no número de linfócitos T periféricos CD4+ e a consequente síndrome de imunodeficiência (Miller et al.; 2018). Ele infecta os linfócitos T, macrófagos, linfócitos B, astrócitos e células microgliais (Westman et al., 2016; Yamamoto et al.; 2007). Durante a doença pode ser observada uma progressiva deficiência qualitativa e quantitativa do sistema imune dos gatos infectados tornando-os mais suscetíveis às coinfeções ou ao desenvolvimento de neoplasias (Miller et al.; 2018; Hosie et al., 2009). Na fase final da doença, observa-se uma variedade de distúrbios associados à síndrome da imunodeficiência, que geralmente resulta em óbito dos animais. Prostração, perda de peso, desidratação, mucosas hipocoradas e sinais associados às coinfeções são os principais sinais clínicos observados em gatos FIV positivos (Miller et al.; 2018; Eckstrand et al.; 2017). Em relação às alterações laboratoriais pode ser encontrada uma anemia, geralmente arregenerativa, acompanhada de linfopenia (Hosie et al., 2009).

A prevalência, o curso e o prognóstico da doença é variável e depende da carga viral, virulência da cepa, idade e imunocompetência do hospedeiro assim como da região geográfica estudada (Eckstrand et al., 2017; Westman et al., 2016; Yamamoto et al.; 2007). No Brasil, um estudo realizado em Londrina, Paraná, com uma população de 771 gatos, identificou que 5,19% eram FIV positivos (Hashizume, 2016). Já no Distrito Federal, 3,0% dos 361 gatos testados foram FIV positivos (Martins et al., 2012). Estudos evidenciam que gatos machos, não castrados e com acesso à rua são enquadrados no grupo de risco para

a infecção e infectam novos hospedeiros por mordeduras e/ou arranhaduras durante brigas por alimentos, fêmeas e território (Luckman et al., 2017; Hosie et al., 2009). A prevenção e controle desta enfermidade estão associados ao diagnóstico precoce da infecção, à permanência dos gatos dentro do domicílio (não permitir o acesso à rua), à castração e ao bem-estar animal (Luckman et al., 2017). Não existe vacina para o FIV no Brasil e o tratamento específico para os animais na fase clínica é baseado no uso de antirretrovirais, que são onerosos e podem causar diversos efeitos colaterais (Hashizume, 2016).

Os procedimentos atuais para detecção da infecção pelo FIV incluem o isolamento viral, a sorologia e os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Westman et al., 2019). O diagnóstico não pode ser estabelecido somente com base nas alterações clínicas dos felinos, uma vez que a maioria dos gatos se torna portador assintomático por longos anos (Hosie et al., 2009). Na rotina clínica, o teste de imunocromatografia para a detecção de anticorpos contra as proteínas de capsídeo (p24 ou p15) ou da glicoproteína de envelope gp41 é o mais amplamente utilizado no diagnóstico do FIV (Westman et al., 2019). A identificação destes anticorpos específicos no soro pode ser considerada adequada para o diagnóstico de uma infecção atual, já que ocorre a persistência da infecção viral, mesmo diante de resposta imune adequada do hospedeiro. Estes testes são rápidos, práticos e apresentam elevada sensibilidade e especificidade (Hashizume, 2016, Hosie et al., 2009).

Até o momento, não existem publicações em plataformas de pesquisa acerca da epidemiologia da imunodeficiência felina na Bahia. Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi pesquisar a epidemiologia da imunodeficiência felina em gatos domésticos da cidade de Salvador/Bahia. Como objetivo específico pretendeu-se estudar os principais sinais clínicos desenvolvidos em gatos infectados pelo FIV.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra e diagnóstico da infecção pelo FIV

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (nº 19/2017). Amostras de sangue de 285 gatos domésticos hígidos ou não hígidos atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/UFBA) e em uma clínica privada exclusiva para atendimentos de gatos, (locais que atendem gatos provenientes de diferentes bairros da cidade de Salvador/BA), foram coletadas por venopunção da veia cefálica no volume de 3mL. Deste volume, 2 mL foi armazenado em tubo com EDTA e 1 mL em tubo de bioquímica, sendo o último destinado a centrifugação para separação de soro. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Vírus – LAVIR/HOSPMEV/UFBA para a detecção dos anticorpos específicos do FIV (soro ou sangue com EDTA) utilizando o teste rápido imunocromatográfico ALERE® FIV Ac/FelV Ag Test *Kit*, de acordo com as normas do fabricante. As amostras de sangue total ou

soro colhidas na clínica privada foram testadas pelo teste rápido de ELISA da Idexx® Snap FIV/FeLV combo Test *Kit*.

2.2 Avaliação clínica e estudo da razão de prevalência

Para cada animal foi preenchida uma ficha com dados do histórico e possíveis alterações clínicas sugestivas de infecção pelo FIV, quando presentes, que incluíram: perda de peso, desidratação, alteração das mucosas, linfadenomegalia, sinais clínicos respiratórios, presença de complexo estomatite-gengivite e presença de sinais clínicos neurológicos. Ademais, também foram coletadas informações acerca dos possíveis fatores de risco associados ao FIV, tais como: idade, sexo, raça, origem (animal resgatado ou não), acesso à rua, castração tipo de habitação (errante ou domiciliado) e presença de contactantes.

Para medir a associação entre as variáveis e a infecção pelo FIV foi usado o programa JMP 10.0 software (SAS, Cary, NC, USA) no qual calculou-se a razão de prevalência (RP) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) pelo teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado quando $n \leq 5$ ou $n > 5$, respectivamente. P-valor < 0,05 foram considerados significantes. Foram consideradas como fatores de risco para a infecção pelo FIV as variáveis com IC $\geq 1,0$. A análise dos sinais clínicos foi meramente descritiva.

3 | RESULTADOS

No total dos 285 gatos testados 4,56% (13/285) foram soropositivos para o FIV. Dentre os 13 animais positivos, 10 eram machos (76,92%) e três (23,07%) eram fêmeas, todos eram sem raça definida (SRD), seis (46,15%) tinham idades superior a cinco anos, nove (69,23%) tinham acesso à rua, dois (15,38%) eram errantes, 11 (84,61%) domiciliados e 10 (76,9%) eram provenientes da rua. Os resultados acerca da análise das variáveis apontadas como possíveis fatores de risco para a infecção pelo FIV estão descritos na Tabela 1.

Fator	Grupos	FIV + % (n/N)	RP* (IC 95%)	p-valor**
Sexo	Macho	7,3 (10/137)	3,6 (1,01 – 12,81)	0,0452
	Fêmea	2,03 (3/148)	-	-
Raça	SRD	4,92 (13/264)	-	0,6084
	CRD	0 (0/21)	-	-
Faixa etária (anos)	> 5	10,34 (6/58)	3,33 (1,16 – 9,52)	0,019
	0-5	3,11 (7/225)	-	-
	NI***	0 (0/2)	-	-

Castração	Não	6,82 (6/88)	2,05 (0,68-6,19)	0,1916
	Sim	3,31 (6/181)	-	-
	NI***	6,25 (1/16)	-	-
Acesso à rua	Sim	10,11 (9/89)	3,64 (1,16-11,447)	0,0354
	Não	2,78 (4/144)	-	-
	NI***	0 (0/52)	-	-
Contactantes	Sim	4,97 (8/161)	0,76 (0,26-2,23)	0,7606
	Não	6,58 (5/76)	-	-
	NI***	0 (0/48)	-	-
Domiciliado	Não	20 (2/10)	4,22 (1,07-16,55)	0,0361
	Sim	4,74 (11/232)	-	-
	NI***	0 (0/43)	-	-
Adotado da rua	Sim	7,25 (10/138)	-	0,0345
	Não	0 (0/59)	-	-
	NI***	3,41 (3/88)	-	-

Tabela 1 – Características avaliadas em gatos domésticos (n=285) no município de Salvador – BA e sua associação com soropositividade para o vírus da imunodeficiência felina (FIV).

*Razão de prevalência com Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%); ** *p* valor referente ao teste de qui-quadrado quando $n > 5$ e Teste exato de Fisher quando $n \leq 5$; *** dado não informado, esses animais não foram incluídos na análise estatística; SRD: sem raça definida; CRD: com raça definida.

A análise univariada evidenciou uma associação significativamente maior (p -valor $< 0,05$) para soropositividade para FIV em gatos machos ($p=0,0452$), com idade acima de cinco anos ($p=0,019$), com acesso à rua ($p=0,0354$), errantes ($p=0,0361$) e provenientes da rua ($p=0,0345$).

A ocorrência de sinais clínicos associados à infecção pelo FIV foi de 69,3% (9/13). Os sinais clínicos mais frequentemente observados foram: alterações do apetite (anorexia ou hiporexia) (46,1%), seguidos por sinais respiratórios (38,46%), secreção ocular ou dermatopatias (30,7%), desidratação ou prostração (23%). Outros sinais clínicos menos frequentes incluíram aquesia, disquezia, melena, hematoquezia, emagrecimento, diarreia, doença periodontal, linfoma e presença de parasitos, como a helmintose e a pulicose (7,69%). A distribuição da frequência dos principais sinais clínicos observados nos animais infectados pelo FIV encontra-se descrita na Tabela 2.

Sinal clínico	Frequência (%)	(n)
Anorexia/hiporexia	46,1	6
Sinais respiratórios	38,4	5
Secreção ocular	30,7	4
Dermatopatias	30,7	4
Vômito	23	3
Desidratação	23	3
Prostração	23	3

Tabela 2 – Sinais clínicos observados em gatos FIV positivos (n=13).

4 | DISCUSSÃO

O aumento da aquisição de gatos como animais de companhia e a manutenção de colônias de gatos errantes em algumas regiões fez com que o FIV se tornasse uma das principais doenças infecciosas de gatos domésticos no mundo. O conhecimento da soroprevalência da imunodeficiência viral felina é de suma importância para que se determine estratégias de prevenção e controle desta enfermidade, como ocorre em regiões brasileiras que carecem de dados epidemiológicos, como no município de Salvador/Bahia.

A soroprevalência da imunodeficiência viral felina varia de acordo com a região, população testada e com o método diagnóstico usado (Little et al., 2020; Lacerda et al., 2017). No presente estudo foi observada uma soroprevalência de 4,56% de uma amostra de 285 gatos saudáveis ou doentes testados durante a rotina clínica. Tais resultados corroboram com os encontrados por Teixeira e colaboradores (2019) em um estudo conduzido no estado do Ceará, onde foram testados 148 gatos domiciliados atendidos em clínicas veterinárias por ELISA SNAP® FIV/FeLV para a detecção de anticorpos anti-FIV confirmados posteriormente pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em que a prevalência foi de 6,1% (9/148) em ambos os testes. Uma ocorrência parecida foi encontrada em outro estudo, também realizado por Teixeira e colaboradores (2007), onde investigou-se a ocorrência de infecção pelo FIV em 145 gatos domésticos provenientes de dois abrigos situados no município de Belo Horizonte - MG, o qual revelou que 4,13% daquela população foi positiva para o FIV pela técnica de PCR. Cabe ressaltar que a técnica de PCR possui maior sensibilidade e especificidade se comparado aos testes de detecção de anticorpos, os quais podem evidenciar resultados falsos-negativos no início da infecção ou na fase clínica que antecede o óbito do animal.

Segundo Biezus e colaboradores (2019), a prevalência desta infecção varia de 5,63% a 11,7% em regiões como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Estes mesmos pesquisadores realizaram um estudo em um hospital veterinário de Santa Catarina o qual analisou a soropositividade de 274 gatos domésticos para anticorpos anti-FIV pelo ELISA SNAP FIV/FeLV e encontraram uma soroprevalência de 5,8% de gatos

com FIV. Estes resultados também corroboram com os encontrados no presente trabalho. A soroprevalência obtida neste estudo também foi similar à encontrada por Martins et al. (2012) no Distrito Federal, que testou 361 gatos pelo teste imunocromatográfico e obteve 11/361 3,0% das amostras positivas para anticorpos anti-FIV. Entretanto, ocorrências maiores da imunodeficiência viral felina foram encontradas em outros estudos brasileiros, como em Porto Alegre-RS (35%), São Paulo-SP (15,6%), Rio de Janeiro-RJ (16,66%) e Mineiros-GO (12,5%) (Finoketti, 2011; Lara, 2004; Souza; Teixeira; Graça, 2002; Lemos; Bragas; Borges, 2017).

Em se tratando da ocorrência do FIV em outros países, um amplo estudo retrospectivo avaliou a presença de gatos positivos para FIV no período de 2008 a 2016, em diversas regiões da América do Norte, América Latina, Europa, África e Ásia, e foi encontrada uma soroprevalência de 5 a 14% para FIV, de acordo com algumas regiões (Bunch, Beall, O'connor, 2017; Little et al., 2020). Nesse sentido, Szilasi e colaboradores (2019) realizaram um estudo na Hungria onde analisaram 335 amostras de sangue total provenientes de uma população de gatos saudáveis e doentes pelos métodos ELISA e PCR. Os animais positivos no teste ELISA e PCR resultaram em uma prevalência de 9,9% e 11,8%, respectivamente. Ortega-Pacheco e colaboradores (2014) realizaram um estudo com 227 gatos domésticos saudáveis admitidos para exames de rotina e castrações em clínicas veterinárias particulares na cidade de Mérida situada no México, onde foi realizado o teste ELISA SNAP FIV/FeLV para detecção de anticorpos anti-FIV. Os resultados apontaram que 17/227 animais foram positivos para FIV, demonstrando uma prevalência de 7,2% para esta retrovírose.

Fatores como idade, sexo, tipo de habitação, acesso à rua e comportamento são comumente relatados como fatores de risco para infecção por FIV (Little et al., 2020; Chhetri et al., 2015). Com relação aos possíveis fatores de risco associados com a infecção por FIV avaliados no presente estudo, observou-se que gatos errantes possuem 4,22 vezes mais chances de se infectar, em comparação com os gatos domiciliados. Animais errantes têm maior contato com outros animais, portanto são mais suscetíveis a brigas e conflitos territoriais, o que favorece a infecção devido à forma de transmissão, justificando os resultados encontrados. Sendo assim, o contato com ambientes externos aumenta a chance de infecção pelo vírus (LEVY et al., 2008), o que explicou a predisposição de infecção pelo FIV em gatos com acesso à rua (RP=3,64). Little e colaboradores (2009) observaram que animais com acesso à rua tinham 3,43 vezes mais risco de se infectar pelo FIV, corroborando assim com o presente estudo. Entretanto, a presença de contactantes no mesmo domicílio não foi associada ao risco de infecção pelo FIV, como também observado no estudo de Hashizume (2016).

No que diz respeito ao sexo, gatos machos apresentaram um risco 3,6 vezes maior de infecção pelo FIV do que fêmeas ($p < 0,05$). Este resultado corrobora com o estudo de Teixeira e colaboradores (2019) que apontou que dos nove gatos positivos para o FIV (6,1%),

oito eram machos (5,4%), o que ratifica que o sexo masculino é um fator de risco importante nestes animais. Tal associação pode ser explicada pelo comportamento territorialista e agressivo que gatos machos podem apresentar com outros animais, portanto, machos não castrados são mais expostos ao FIV do que fêmeas (Yilmaz, 2000). Uma vez que a transmissão da doença ocorre majoritariamente pela inoculação do vírus presente na saliva por arranhaduras ou mordeduras, as brigas por disputas de território, alimento e fêmeas para acasalamento favorecem a disseminação do FIV em machos (MILLER et al., 2017). Desta forma, a castração, variável também analisada neste estudo e sem significância na associação com a infecção pelo FIV, pode representar uma das principais medidas de controle e prevenção da infecção uma vez que diminui o comportamento de brigas

Segundo o *The American Association of Feline Practitioners* (AAFP), o avanço da idade relaciona-se com a maior probabilidade de os animais se infectarem e apresentarem imunodeficiência felina devido ao risco cumulativo dos indivíduos serem expostos ao vírus com o passar do tempo (Little et al., 2020). No presente estudo, a variável idade também foi indicada como fator de risco para a infecção pelo FIV, uma vez que os gatos com mais de 5 anos de idade (média de 5,7 anos) foram os mais acometidos pelo FIV (RP=3,3), o que corrobora com o estudo de Biezus et al. (2019) que demonstrou que gatos FIV positivos tinham média de idade igual a 5,6 anos. A variável raça não foi observada como um fator de risco para a infecção pelo FIV, o que corrobora com outros estudos (Hashizume, 2016; Lara; Taniwaki; Araujo Jr, 2008).

O FIV estabelece uma infecção crônica com evolução de três fases da doença, passando por uma doença aguda, um longo período assintomático e uma fase terminal caracterizada por imunodeficiência (FAIDS), que aumenta o risco de infecções oportunistas, neoplasias e doenças neurológicas (Hartmann, 2012). Segundo Sykes (2014), a maioria dos gatos infectados apresenta sinais clínicos inespecíficos, como, por exemplo, alterações do apetite, vômito, desidratação e prostração, comumente vistos na fase aguda da infecção. Os sinais clínicos mais frequentemente observados em gatos soropositivos para o FIV deste estudo foram anorexia ou hiporexia, seguidos por sinais clínicos respiratórios, secreção ocular e dermatopatias, desidratação e prostração. A maioria destes resultados é suportada pelos sinais encontrados por Miller e colaboradores (2017), Eckstrand et al. (2017) e Obert e Hoover (2000) que foram prostração, desidratação, emagrecimento e infecções oportunistas. Segundo Radford et al. (2009) alguns gatos apresentaram sinais clínicos sugestivos de infecção por herpesvírus felino tipo 1, tais como secreção óculo-nasal, conjuntivite e espirros. Os sinais clínicos descritos em animais soropositivos não são causados diretamente pelo FIV, mas sim por infecções secundárias em decorrência do quadro de imunodeficiência ocasionado pelo vírus (Hosie et al., 2009). Os animais infectados podem permanecer meses ou anos assintomáticos e nunca demonstrarem sinais clínicos (Addie et al., 2000). Porém, nos casos sintomáticos, os sinais clínicos podem ser divididos em três estágios: fase aguda, assintomática e terminal (Hartmann, 2012; Greene, 2006).

As oftalmopatias são frequentemente associadas com a infecção pelo FIV (Aroch, 2008). Sinais clínicos oculares foram observados em 30,7% (4/13) dos animais positivos para FIV no presente estudo, como secreção ocular (4/13), conjuntivite (2/13) e quemose (2/13). Em um estudo, Nasisse e colaboradores (1993) avaliaram a prevalência da conjuntivite crônica em gatos e detectaram alteração em 8,5% dos gatos positivos para FIV em comparação com 2,6% da população geral.

O complexo estomatite-gengivite é uma síndrome que afeta cerca de 50% dos gatos naturalmente infectados pelo FIV (Levy, 2000), entretanto, nenhum gato positivo apresentou esta síndrome no presente trabalho. Segundo Hartmann (2012), o complexo estomatite-gengivite nem sempre está relacionado com a infecção por retrovírus, não sendo descritos em animais infectados por FIV de forma experimental. Sinais neurológicos são descritos tanto em animais naturalmente ou artificialmente infectados. Cerca de 5% dos gatos sintomáticos infectados pelo FIV têm doença neurológica (Little et al., 2020; Hartmann, 2012). A despeito disso, nenhum gato no presente estudo manifestou qualquer sinal neurológico.

Mais estudos clínico-epidemiológicos sobre a imunodeficiência viral felina em Salvador/BA são necessários dada a ausência de informações sobre o assunto na literatura atrelado ao crescente aumento da população felina e a importância das retrovíroses na medicina felina. O conhecimento da epidemiologia é fundamental para o gerenciamento clínico bem como para a adoção de medidas de prevenção e controle desta enfermidade.

5 | CONCLUSÃO

A ocorrência da imunodeficiência viral felina de 4,56% em gatos do município de Salvador encontrada neste estudo denota a representativa circulação viral e a necessidade de se incorporar os testes de diagnósticos laboratoriais na rotina clínica.

A idade acima de cinco anos, o sexo masculino, o acesso à rua, e o fato de serem gatos errantes ou resgatados da rua são fatores associados ao risco de infecção pelo FIV.

A maioria dos gatos infectados pelo FIV foram assintomáticos. Os sinais clínicos mais frequentemente observados foram alterações do apetite, seguidos por sinais respiratórios, secreção ocular ou dermatopatias e desidratação ou prostração.

REFERÊNCIAS

Addie, D. D. *et al.* **Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus.** *Veterinary Record*, v. 146, n. 15, p. 419-424, 2000.

Aroch, I.; Ofri, R.; Sutton, G. A. **Ocular manifestations of systemic diseases.** *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology.* In: Maggs, J. D.; Miller, P. E.; Ofri, R. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology.* 4. ed. St. Louis: Saunders, p. 374-418, 2008, cap. 18.

Biezus, G. *et al.* **Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil.** *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 63, p. 17-21, 2019.

Bunch, J.; Beall, M.; O'connor, T. **Worldwide clinic-based serologic survey of FIV antibody and FeLV antigen in cats.** *ACVIM Forum, National Harbor, Md*, 8–10 June 2017.

Chhetri, *et al.* **Comparison of risk factors for seropositivity to feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats: a case-case study.** *BMC veterinary research*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2015.

Eckstrand, C. D.; Sparger, E. E.; Murphy, B. G. **Central and peripheral reservoirs of feline immunodeficiency virus in cats: A review.** *Journal of General Virology*, v. 98, n. 8, p. 1985-1996, 2017.

Finoketti, F. **Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre, RS.** 37 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Greene, C. E. *et al.* **Infectious diseases of the dog and cat.** WB Saunders\Elsevier Science, 2006.

Hartmann, K. **Clinical aspects of feline retroviruses: a review.** *Viruses*, v. 4, n. 11, p. 2684-2710, 2012.

Hashizume, E. Y. **Prevalência de leucemia e imunodeficiência viral felina em gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina (PR) em 2014.** 58 f. Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina, 2016.

Hosie, M. J. *et al.* **Feline immunodeficiency.** *ABCD guidelines on prevention and management.* *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 11, n. 7, p. 575-584, 2009.

Lacerda, L. C. *et al.* **Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil.** *Genet Mol Res*, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2017.

Lara, V. M. **Estudo epidemiológico e genético do vírus da imunodeficiência felina identificados no estado de São Paulo.** 95 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Lara, V. M., Taniwaki, S. A., Araújo Jr, J. P. **Ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina em gatos.** *Ciência Rural*, v. 38, n. 8, p. 2245-2250, 2008.

Lemos, M., B, Í. A.; Borges, K. I. N. **Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos do município de Mineiros-GO.** XI Encontro de iniciação científica – UNIFIMES, Mineiros, Goiás, 2017.

Levy, J. K. **CVT update: feline immunodeficiency virus.** In: Bonagura J.D., editor. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice.* WB Saunders; Philadelphia: 2000. pp. 284–288.

- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V. **American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines**. Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 10, n. 3, p. 300-316, 2008.
- Little, S. *et al.* **Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada**. The Canadian Veterinary Journal, v. 50, n. 6, p. 644, 2009.
- Little, S. *et al.* **2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines**. Journal of Feline medicine and Surgery, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.
- Luckman, C.; Gates, M.C. **Epidemiology and clinical outcomes of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in client-owned cats in New Zealand**. Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, v.3, n.2 p.1–9, 2017.
- Martins, E. S. *et al.* **Prevalência de imunodeficiência viral felina e leucemia viral felina no Distrito Federal**. Archives of Veterinary Science, v. 17, 2012.
- Miller, C. *et al.* **Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis**. Viruses. v.10, n. 206, 2018.
- Miller, C. *et al.* **Pathogenesis of oral FIV infection**. PloS one, v. 12, n. 9, 2017.
- Nasisse, M. P. *et al.* **Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991)**. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 203, n. 6, p. 834-837, 1993.
- Obert, L. A.; Hoover, E. A. **Relationship of lymphoid lesions to disease course in mucosal feline immunodeficiency virus type C infection**. Veterinary pathology, v. 37, n. 5, p. 386-401, 2000.
- Ortega-Pacheco, A. *et al.* **Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico**. Journal of Feline medicine and Surgery, v. 16, n. 6, p. 460-464, 2014.
- Radford, A. D. *et al.* **Feline calicivirus infection: ABCD guidelines on prevention and management**. Journal of feline medicine and surgery, v. 11, n. 7, p. 556-564, 2009.
- Souza, H. J. M., Teixeira, C. H. R., Graça, R. F. S. **Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro**. Clínica Veterinária, v. 36, p. 14-21, 2002.
- Stavinsky, J.; Dean, R. S.; Molloy, M. H. **Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011–2012)**. Veterinary Record, v. 181, n. 17, p. 451-456, 2017.
- Sykes, J. E. **Feline immunodeficiency virus infection**. In: Skyes, J. E. Canine and feline infectious diseases. 1 ed. St Louis: Saunders, p. 209 - 223, 2014, cap. 21.
- Szilasl, A. *et al.* **Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary**. Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2019.

Teixeira, B. M. *et al.* **Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil.** Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, v. 5, n. 2, p. 1 - 7, 2019.

Teixeira, B. M. *et al.* **Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 4, p. 939-942, 2007.

Westman, M.E.; Paul, A.; Malik, R et al. **Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013).** Journal of Feline Medicine and Surgery. Open Report, v.2, n.1, p.1-11, 2016.

Westman, M.E.; Malik, R.; Norris, J.M. **Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians.** Australian Veterinary Journal v. 97, n. 3, 2019

Yamamoto, J. K. *et al.* **Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 194, n. 2, p. 213-220, 1989.

Yamamoto, J. K. *et al.* **Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine.** AIDS, v.21, p.547-563, 2007.

Yilmaz, H.; Ilgaz A.; Harbour D. A. **Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul.,** v. 2, n. 1, p. 69-70, 2000.

CAPÍTULO 3

A IMPORTÂNCIA DA DISCIPLINA DE BIOSSEGURANÇA NO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CONTRIBUIÇÕES PEDAGÓGICAS PARA A FORMAÇÃO DO BIÓLOGO

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 01/06/2021

Larissa da Silva

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Química Biológica
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/2063883081547946>

Nayra Thaislene Pereira Gomes

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/4215597540387398>

Lucas Yure Santos da Silva

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5151183612960189>

Cicera Alane Coelho Gonçalves

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/9741824061856344>

Renata Torres Pessoa

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Química Biológica
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/3315115017947528>

Mateus Pereira Santana

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5316047696817874>

Paula Patrícia Marques Cordeiro

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/8260867018895839>

Laíza Maria Ulisses Magalhães

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7580130527688778>

Paulo Ricardo Batista

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Química Biológica
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/3536014746979224>

Jessyca Nayara Mascarenhas Lima

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Química Biológica
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/2968677767113923>

Sonia Antero de Oliveira

Universidade Regional do Cariri, Departamento
de Ciências Biológicas
Crato – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7792852410405486>

Nair Silva Macêdo

Universidade Federal de Pernambuco,
Departamento de Ciências Biológicas
Recife - Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/0461193815652629>

RESUMO: A pandemia da COVID-19 evidenciou, dentre diversos setores da sociedade, que a

Biossegurança na atualidade mostra-se primordial para a prevenção e mitigação de riscos. Nessa perspectiva, os profissionais Biólogos têm destaque, pois esses procedimentos perpassaram o cotidiano de muitos profissionais formados nessa área. Sob essa égide, o presente trabalho buscou através de uma análise crítica da presença/ausência da disciplina de Biossegurança nos cursos de Licenciatura e Bacharelado na modalidade presencial em Ciências Biológicas de Universidades Públicas brasileiras que disponibilizam de forma aberta a sua matriz curricular e possuem registro no Conselho Federal de Biologia com o objetivo de demonstrar a importância da presença e ampliação dessa disciplina nos cursos dessa área para a formação e atuação profissional do Biólogo, visto que a prevalência desse componente curricular nos cursos de graduação em Ciências Biológicas é tímida frente a sua importância social de acordo com os principais achados desse estudo descritivo.

PALAVRAS - CHAVE: Biossegurança; Ensino-Aprendizagem; Ciências Biológicas; Covid-19; Ética.

THE IMPORTANCE OF BIOSECURITY DISCIPLINE IN THE BIOLOGICAL SCIENCES COURSE: PEDAGOGICAL CONTRIBUTIONS TO THE FORMATION OF THE BIOLOGIST

ABSTRACT: The COVID-19 pandemic has shown, among various sectors of society, that Biosafety today is essential for the prevention and mitigation of risks. In this perspective, Biologist professionals stand out because these procedures have pervaded the daily lives of many professionals trained in this area. Under this aegis, the present work sought through a critical analysis of the presence / absence of the Biosafety discipline in the Licentiate and Bachelor courses in the presence modality in in Biological Sciences of Brazilian Public Universities that openly make available their curricular matrix and have registration at the Federal Council of Biology in order to demonstrate the importance of the presence and expansion of this discipline in courses in this area for the training and professional performance of Biologists, due to the prevalence of this curricular component in undergraduate courses in Biological Sciences, it is timid in view of its social importance according to the main findings of this descriptive study.

KEYWORDS: Biosafety; Teaching-Learning; Biological Sciences; Covid-19; Ethic.

1 | INTRODUÇÃO

A Biossegurança (BS) pode ser definida como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação dos riscos pertinentes às atividades de ensino, pesquisa ou desenvolvimento tecnológico que possam impactar na saúde do homem, dos animais e o meio ambiente (TEIXEIRA; VALLE, 2010).

As primeiras discussões sobre BS se iniciaram em meados da década de 70 devido a preocupações quanto à segurança de trabalhadores da área laboratorial que tinham projetos voltados a engenharia genética. Essa preocupação instigou a realização da Conferência de Asilomar, na Califórnia, onde foram debatidas normas de BS e sugerido que o nível de contenção deveria estar de acordo com os riscos estimados (PENNA et al., 2010). Esse foi o pontapé inicial para a compreensão do que seriam níveis de contenção

e classes de risco.

Atualmente, sabe-se que todos os microrganismos conhecidos são classificados em classes (I a IV) de acordo com algumas características microbiológicas, a exemplo: patogenicidade, virulência, modo de transmissão, endemicidade e a existência ou não de profilaxia e tratamentos eficazes. Cada classe exige um nível de contenção, boas práticas laboratoriais e normas específicas, para isso, os profissionais que trabalham na manipulação de agentes patogênicos, culturas infectadas, amostras de sangue e materiais perfurocortantes precisam estar informados sobre todas as normas de BS que se aplicam ao seu trabalho e ao seu nível de contenção, a fim de minimizar riscos de contaminação individual e/ou coletiva (TEIXEIRA; MELLO, 2010).

Em diversos países, a BS é regulada por um conjunto de leis, procedimentos ou diretrizes específicas (FUNASA, 2001). No Brasil, a lei Nº 11.105 de 25 de março de 2005 dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança, revogando a Lei Nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995 e cria a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (BRASIL, 2005).

A urgência de profissionais conscientes no que diz respeito às boas práticas laboratoriais, embasados nas normas de BS e que tenham conhecimento para exercer e coordenar suas práticas se faz cada vez mais necessária, uma vez que vivemos em uma era onde o contato com vírus, bactérias e outros patógenos sem profilaxia e terapêuticas eficazes ameaçam a saúde humana progressivamente (MOLENTO, 2017).

Por isso a compreensão do conceito de BS e a relevância de discuti-lo nos mais diversos momentos de aprendizagem dos saberes científicos, principalmente no contexto acadêmico, é indiscutivelmente necessário para a formação de profissionais preparados para lidar com ameaças microbianas em uma era globalizada (LIMA, 2017).

A abordagem da BS no curso de Ciências Biológicas torna-se de extrema relevância uma vez que o Biólogo encontra-se envolvido em atividades de pesquisa desde a sua formação acadêmica. E no mercado de trabalho está apto a ocupar cargos em laboratórios de Análises Clínicas, Bioética, controle de vetores e pragas, gestão de bancos de células e material genético, Perícia e Biologia Forense. Portanto é um profissional que está integrado em atividades de ensino, pesquisa e Biotecnologia (MELO; CARVALHO; GUIMARÃES, 2017).

Ao observar a importância da BS para a formação do Biólogo e sua possível atuação em contexto pandêmico como no ano de 2020/2021, onde o novo coronavírus Sars-CoV-2 ameaça a saúde global, o presente estudo surgiu de uma inquietação sobre a ausência da disciplina de BS em algumas instituições de ensino e da discussão da importância do ensino/aprendizagem da BS para a formação do acadêmico e futuro profissional Biólogo.

Diante desses pressupostos, objetivou-se demonstrar a importância do ensino de BS no curso de Ciências Biológicas, assim como investigar a disponibilidade da disciplina na grade curricular de graduações de Biologia nas modalidades Bacharelado e Licenciatura

em cursos regulamentados pelo Conselho Federal de Biologia, visto a importância dessa disciplina para a formação acadêmica e profissional do Biólogo em sua rotina de trabalho.

2 | METODOLOGIA

Estratégia de pesquisa

Trata-se de um estudo descritivo sobre a oferta da disciplina de BS em cursos de Ciências Biológicas. Foi realizada uma busca quantitativa das Universidades Brasileiras que ofertam o curso de Biologia na modalidade Bacharelado e/ou Licenciatura nas cinco regiões do país (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste). A análise das Universidades se deu a partir da consulta ao *site* do Conselho Federal de Biologia – CFBio (<https://cfbio.gov.br/>) o qual concede acesso ao *site* oficial de cada Universidade para a avaliação da disponibilidade da disciplina através da investigação na grade curricular do curso. A pesquisa nas plataformas *on-line* institucionais ocorreu no período de 15 de março a 20 de maio de 2021.

Crítérios de elegibilidade

No que concerne à mineração dos dados, os critérios de inclusão definidos são: Universidades Federais e Estaduais cadastradas no *site* do CFBio que ofertam o curso de Ciências Biológicas na modalidade Bacharelado e/ou Licenciatura e que a disciplina de BS esteja presente na Matriz Curricular do curso em pelo menos um dos *campi* da Instituição como obrigatória ou eletiva. Ao passo que os critérios de exclusão têm-se: Instituições de Ensino Superior de iniciativa privada e as que ofertam o curso de Biologia na modalidade de Ensino a Distância – EAD ou semi-presencial. Os resultados foram representados em tabelas e os dados expressos em valores absolutos e/ou porcentagem.

3 | RESULTADOS

Foram observadas 92 Universidades Públicas cadastradas no *site* do CFBio que oferecem o curso de Ciências Biológicas em pelo menos uma das modalidades (Bacharelado ou Licenciatura). A Tabela 1 demonstra o número total de Instituições cadastradas no *site* e a prevalência de Universidades Públicas que ofertam o curso de Ciências Biológicas por região. A partir disso é possível observar que a maior prevalência de cursos de Biologia ofertados no país se concentra nas regiões Nordeste (27) e Sudeste (27).

Regiões	N° de Universidades
Norte	12
Nordeste	27
Centro-Oeste	8
Sul	18
Sudeste	27
Total	92

Tabela 1. Universidades Públicas Brasileiras por região cadastradas no *site* do CFBio.

Após o processo de triagem pela metabolização dos critérios de elegibilidade, notou-se que três das Universidades analisadas não ofertavam o curso de Biologia e uma se encontrava duplicada na região Sul não se alinhando, portanto, ao objetivo geral proposto. A partir dessa observação, 88 Universidades passaram para a segunda etapa de avaliação que dizia respeito à acessibilidade de informações sobre o curso no *site* oficial das Instituições. A apuração dos dados demonstra que das 88 universidades avaliadas no presente estudo, 5 não permitiam acesso ao *site* oficial da Instituição e 7 não permitiam acesso a grade curricular do curso para a avaliação. A partir disso, resultou o constructo final de 76 Universidades para compor o estudo (Tabela 2).

Site ou Grade Curricular	N° de Universidades
Acesso direto	88
Inacessível	12
Total	76

Tabela 2. Acessibilidade ao *site* oficial da Instituição ou a Grade Curricular do curso de Ciências Biológicas.

Das Universidades Públicas que ofertam o curso de Ciências Biológicas selecionadas para análise, apenas 34,21% apresentam a disciplina de BS em sua matriz curricular em pelo menos um dos seus *campi* na modalidade obrigatória ou eletiva, enquanto 65,79% não ofertam a disciplina em nenhum de seus *campi* e em nenhuma modalidade (tabela 3).

Disciplina de Biossegurança	Instituições	Percentual
Ofertada	26	34,21%
Não ofertada	50	65,79%
Total	76	100%

Tabela 3. Disponibilidade da disciplina de Biossegurança nos cursos de Ciências Biológicas.

4 | DISCUSSÃO

A Biologia é discutida e trabalhada desde os primórdios da civilização quando o homem foi obrigado a observar eventos naturais para a sua própria sobrevivência na pré-história, a exemplo dos tempos de floração, frutificação e migração de animais. Desde a antiguidade a vida se tornou objeto de estudos de curiosos como Linneu, Lamarck, Charles Darwin e Mendel, naturalistas que dedicaram a vida a descobrir “enigmas” da natureza e hoje suas obras servem de base para o desenvolvimento de novos projetos e descobertas (GASTAL, 2006).

No Brasil, os estudos de Biologia se deram através de pesquisas descritivas sobre a fauna e a flora realizadas por estudiosos brasileiros e estrangeiros que hoje servem de base para própria Ciência no país. As Ciências Biológicas atualmente tornaram-se um dos campos científicos com mais impacto social, cultural e econômico a nível mundial (SCHWARTZMAN, 2001).

Com a chegada da Era Moderna e o avanço da tecnologia o modo de se fazer pesquisa também evoluiu, estudos de melhoramento genético (FREIRE FILHO, 2011), cultura de bactérias multirresistentes (AZEVEDO, 2018) a manipulação de microrganismos e o sequenciamento genético de patógenos perigosos para a saúde pública mundial já é uma realidade (CHAVES; BELLEI, 2020). Com isso, a forma de proteger pesquisadores de acidentes laboratoriais foi repensada e medidas de segurança tiveram que ser aplicadas de forma consolidada.

O ensino de Biologia na academia apresenta em seu currículo, conteúdos de caráter experimental, procedimental e laboratorial que precisam ser contemplados no processo de ensino-aprendizagem. Nesse sentido, o emprego da BS nos laboratórios de pesquisa das Universidades e a prévia aprendizagem conceitual sobre o tema em sala de aula é de suma importância para o desenvolvimento de medidas mitigadoras de acidentes e da consciência coletiva para trabalhos que envolvam riscos químicos, físicos e biológicos.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, algumas Universidades, em maioria não ofertam a disciplina de BS no curso de Ciências Biológicas e isso consiste em uma problemática na formação do Biólogo, uma vez que este profissional se encontra elencado na categoria dos profissionais de saúde e seu trabalho envolve, em grande demanda, atividades laboratoriais (GOMES; DIAS, 2018). Vale ressaltar que as Instituições de ensino avaliadas que ofertam a disciplina de BS são ofertadas em sua grande maioria como optativas.

A importância da abordagem da BS no curso de Licenciatura em Biologia relaciona temáticas do próprio ambiente escolar a problemas do cotidiano, uma vez que “[...] o tema BS ultrapassou os limites dos laboratórios e hospitais com a constatação de que os riscos biológicos e químicos estão presentes também em outros ambientes” (ANVISA, 2005, p. 990).

Em relação aos Biólogos bacharéis, estes são os profissionais mais envolvidos em pesquisas laboratoriais e de campo o que exige em sua rotina de trabalho uma maior atenção as normas de BS aplicadas em seu ambiente profissional se atentando aos diferentes riscos que possam estar sujeitos, a exemplo dos riscos químicos, físicos, biológicos e ergonômicos (RIBEIRO; CARDOSO, 2015).

No tocante a regulamentação, a Resolução Nº 10, de 5 de julho de 2003, do CFBio, dispõe sobre as atividades profissionais, áreas e subáreas do profissional Biólogo e apresenta no seu Art.1º, item 1.2, que o Biólogo está apto a trabalhar na “Execução de análises laboratoriais e para fins de diagnósticos [...]” e suas subáreas são: Análises Clínicas, Bioética e Genética (representadas nos itens 2.1; 2.9 e 2.12, respectivamente) (CFBio, 2003), áreas que exigem conhecimentos técnicos de segurança laboratorial.

Por esse motivo torna-se indispensável o ensino da BS nos Cursos de Saúde de nível superior, especialmente a Biologia, quando este processo de ensino pode se mostrar como um instrumento estratégico-pedagógico importante, visto o descompasso entre a dimensão acadêmica e a dimensão do trabalho no que se refere a BS. Tal estratégia orientadora pode impactar significativamente na formação profissional Biólogo, uma vez que a formação dessa categoria deve estar alinhada as demandas e necessidades da sociedade e do trabalho (COSTA; COSTA, 2010).

5 | CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que apesar da BS ser um dos pilares do trabalho dentro das Ciências Biológicas para a proteção dos profissionais e sociedade, assim como na formação dos profissionais licenciados e bacharéis nessa área, principalmente em um período pandêmico como da COVID-19, a adesão do componente curricular de BS ainda é muito incipiente dentre os cursos de graduação nessa área em Universidades Públicas, em confronto com as possibilidades de atuação dos Biólogos definidas pelo CFBio.

Portanto, modificações na grade curricular dos cursos de Ciências Biológicas são necessárias para a adequação na formação desses profissionais frente a um mercado de trabalho mais preocupado com a segurança através da prevenção de acidentes, sobretudo com agentes patológicos que possam vir a tornarem-se epidemias ou pandemias, dentre outras fragilidades de segurança e cuidados profissionais.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, E.O. **Avaliação do extrato bruto das folhas de *Cassia fistula* Linn ante bactérias multirresistentes**. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário São Lucas, Porto velho – Brasil. 2018.

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Biossegurança**. Revista de Saúde Pública; v.39, n.6, p.989-991, 2005.

BRASIL. **Lei n. 11.105, de 25 de março de 2005**: Dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm>. Acesso em: 24 de mar de 2021.

CHAVES, T.S.S., BELLEI, N. **SARS-COV-2, o novo Coronavírus: uma reflexão sobre a Saúde Única (One Health) e a importância da medicina de viagem na emergência de novos patógenos**. Rev Med (São Paulo). DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i1pi-iv>. 2020.

CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA (CFBio). **Resolução Nº 10, de 5 de julho de 2003**. Dispõe sobre as Atividades, Áreas e Subáreas do Conhecimento do Biólogo. 2003.

COSTA, M.A.F., COSTA, M.F.B. **Educação em Biossegurança: Contribuições pedagógicas para a formação profissional em saúde**. Ciência e saúde coletiva 15 (suppl 1). 2010.

FREIRE FILHO. **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. -Teresina : Embrapa Meio-Norte, 84 p. 2011.

Fundação Nacional de Saúde. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. Editado por Jonathan Y. Richmond, Robert W. McKinney; organizado por Ana Rosa dos Santos, Maria Adelaide Millington, Mário Cesar Althoff. 291 p. Brasília: FUNASA, 2001.

GASTAL, M.L. **Nem heróis, nem vilões: uma história da biologia que ajude a dar sentido ao aprendizado de biologia**. Cadernos de educação I, FAE / UFPEL / Pelotas 1261:103-121. 2006.

GOMES, M.S., DIAS, M.A.S. **Conhecimento de acadêmicos do curso de ciências biológicas acerca das normas de biossegurança**. V Congresso Nacional de Educação (CONEDU), 2018. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/46768>> Acesso em: 15 de mar de 2021.

LIMA, K.E.C. **A concepção de alunos sobre biossegurança nas atividades dos professores para práticas de ensino em ciências e biologia**. Alexandria: R. Educ. Ci. Tec., v.10, n.1, p. 97-118. DOI: <https://doi.org/10.5007/1982-5153.2017v10n1p97>. 2017.

MELO, L.L.P., CARVALHO, A. V., GUIMARÃES, A. P. M. **A Interdisciplinaridade da profissão biólogo**. Entrepreneurship, v.1, n.1, p.28-33. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2595-4318.2017.001.0003>. 2017.

MOLENTO, F.H.B. **Biossegurança e práticas baseadas em evidências**. Rev. Pan-Amz saúde, v.8 n.1 Ananindeua. 2017.

PENNA, P.M.M., AQUINO, C.F., CASTANHEIRA, D.D., BRANDI, I.V., CANGUSSU, A.S.R., MACEDO SOBRINHO, E., SARI, R.S. DA SILVA, M.P., MIGUEL, A.S.M. **Biossegurança: uma revisão**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.3, p.555-465, 2010.

RIBEIRO, C.M., CARDOSO, T.A.O. **Biossegurança: abordagem cognitiva essencial para o biólogo**. RECIIS – Rev Eletron de Comun Inf Inov Saúde, ISSN 1981-6278. 2015.

SCHWARTZMAN, S. **Um espaço para a ciência: a formação da comunidade científica no Brasil**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia; Centro de Estudos Estratégicos, 2001.

TEIXEIRA, P., VALLE, S. **Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar**. 2 ed. Rio de Janeiro, Fio Cruz. 442 P. 2010.

CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE *BEAUVERIA BASSIANA*, *METARHIZIUM ANISOPLIAE* E *METARHIZIUM FLAVOVIRIDE* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 01/06/2021

Ubirany Lopes Ferreira

Professora Adjunta do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Campus Mata Norte-UPE Olinda/PE
<https://orcid.org/0000-0003-3979-1762>

Ana Célia Rodrigues Athayde

Professora Associada da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas-CSTR da Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB
<http://lattes.cnpq.br/4106504741067021>

Elza Áurea de Luna Alves Lima

Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE
<http://lattes.cnpq.br/6561882572551726>

RESUMO: O crescimento radial de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* foi analisado aos 18 dias em BDA (Oxoid), em diferentes temperaturas (25°, 28°C e temperatura ambiente = 28±2°C). Todas as linhagens apresentaram maior crescimento à temperatura ambiente. *Metarhizium flavoviride* apresentou a maior produção de conídios (45,06 x 10⁸ conídios/g de substrato) na soja e a menor no arroz quebradiço (1,47 x 10⁸ conídios/g de substrato). A viabilidade considerada ótima (70%), na maioria dos substratos tanto para *Metarhizium anisopliae* quanto para *Metarhizium flavoviride*. *Beauveria bassiana*, no substrato soja, apresentou viabilidade insatisfatória para

quantificação. Os resultados obtidos sugerem que outros substratos diferentes, além do arroz, devam ser empregados em estudos para a produção conidial.

PALAVRAS - CHAVE: Hyphomycetes, Entomopatogênicos, Produção conidial, Temperatura.

GROWTH AND VIABILITY OF *BEAUVERIA BASSIANA*, *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AND *METARHIZIUM FLAVOVIRIDE* ON DIFERENT SUBSTRATES

ABSTRACT: The radial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* was analyzed at 18 days in PDA (Oxoid), in three different temperatures (25, 28 and room temperature = 28 ± 2° C). All the strains presented better growth at room temperature. *Metarhizium flavoviride* presented the largest conidial production (45.06 x 10⁸ conidia/g of substrate) in soy and the smallest in brittle rice (1.47 x 10⁸ conidia/g of substrate). In most of the substrates the viability was great for the *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. Only *Beauveria bassiana* in the substratum soy presented unsatisfactory viability for quantification. The obtained results suggest that other natural substrate, besides the rice, should be used in studies for the conidial production.

KEYWORDS: Entomopathogenic, Hyphomycetes, Conidia production, Temperature.

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos são os principais patógenos de insetos. Cerca de 80 gêneros de fungos, com aproximadamente 700 espécies, estão envolvidas em mais de 80% das doenças dos insetos (SOCCOL et al., 1997). Entre os gêneros mais importantes estão: *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*. Por serem considerados um substituto potencial dos inseticidas químicos, o interesse pelos fungos tem aumentado nos últimos anos. A reação à mudança no uso de inseticidas químicos tem emergido da necessidade de se evitar certos efeitos adversos, no uso difundido para o controle de pragas (resíduos, resistência de insetos e alta toxicidade). O produto da manipulação realizado em laboratório é considerado adequado para a produção massal de fungos (SAMSINÁKOVÁ; KÁLALOVÁ, 1981). Poucos são os substratos naturais utilizados para o desenvolvimento de entomopatógenos para uso em campo, é descrito na literatura como substrato padrão, o arroz parboilizado, entretanto, outros substratos devem ser testados como uma alternativa de uso durante a entressafra. Este trabalho teve por objetivo analisar o crescimento e a produção conidial de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride* em diferentes substratos naturais, determinando os substratos que apresentaram maior produção de conídios e melhor viabilidade.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de linhagens

As linhagens foram obtidas da coleção de cultura do Departamento de Micologia (URM) da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 01), foram repicadas em meio BDA (Oxoid) pH 6,8 incubados à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) por 15 dias e acondicionados sob refrigeração a 4°C .

ESPÉCIE FÚNGICA	LINHAGEM FÚNGICA	LOCALIZAÇÃO	HOSPEDEIRO	NÚMERO DE ACESSO
<i>Beauveria bassiana</i>	CL ₁	Carpina / PE	<i>Castnia licus</i>	URM- 3447
<i>Metarhizium anisopliae</i>	PL ₄₃	Flexeiras / AL	<i>Mahanarva posticata</i>	URM- 3349
<i>Metarhizium flavoviride</i>	BR	Rio Grande do Norte	<i>Schistocerca pallens</i>	URM- 3800

TABELA 1. Origem das linhagens estudadas

2.2 Obtenção de cultura monospórica

Conídios foram transferidos para solução Tween 80 (0,1%) de modo a se obter de 20 a 100 colônias. A suspensão obtida foi agitada em Vortex e diluída em solução salina.

A suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer. 0,1 ml da suspensão foi espalhado sobre meio BDA e após o crescimento, um único conídio foi transferido para tubo.

2.3 Avaliação do crescimento colonial

Foram realizadas medições da colônia, durante o período de 3 a 18 dias, segundo Ribeiro et al. (1992).

2.4 Produção de conídios

A produção de conídios foi avaliada em diferentes substratos (ervilha, soja, milho de mungunzá, arroz parboilizado e arroz quebradiço). 100 gramas de cereal foram colocados em sacos de polipropileno com 50 ml de água destilada e autoclavados por 30 minutos, a 120°C (Com 4 repetições e 1 controle). Após o resfriamento à temperatura ambiente, com o auxílio de uma seringa, 10 ml de suspensão de 10^8 conídios/ml foram inoculados em cada substrato. Os sacos foram agitados para a desagregação dos grúmulos de substratos e melhor distribuição do inóculo. A inoculação foi feita à temperatura ambiente e umidade relativa superior a 55% por 15 dias (VILAS BOAS et al., 1996). A produção de conídios foi quantificada transferindo-se 1g de substrato para 100 ml de solução Tween 80 (0,01%), agitada por 2 minutos e filtrada em gaze. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neübauer.

2.5 Determinação da viabilidade de conídios

A suspensão obtida foi diluída para 10^8 conídios/ml da qual 0,1 ml foi espalhado em três placas de *Petri*, contendo BDA mais Cloranfenicol (2%) para evitar o crescimento bacteriano. Após 12 horas foram realizadas leituras, diretamente ao microscópio, contando-se 1500 conídios/placas. Foi considerado conídio germinado aquele cujo tubo germinativo apresentou-se maior que um terço do tamanho do conídio. Em seguida efetuou-se o cálculo; segundo Alves (1998).

Em 1.500 conídios = n germinados

$$100 = G$$

$G = \frac{n \times 100}{1.500} = \% \text{ germinação}$

$$1.500$$

2.6 Análise estatística

Os dados referentes à concentração de conídios e à viabilidade foram submetidos à análise de variância e à separação das médias feitas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.7 Documentação fotográfica

Foi feita em filme Kodak color GOLD-135, 100 ASA (American stand Association),

com o uso de fotomicroscópio Carl Zeiss e ampliadas em laboratórios Kodak.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento radial em diferentes temperaturas

B. bassiana – apresentou colônia de cor branca, com aspecto cotonoso e abundante conidiação. Foi observado maior crescimento à temperatura ambiente e menor à 25°C (Tabela 2). *M. anisopliae* - mostrou colônia de coloração esverdeada, abundante conidiação e aspecto pulverulento. O fungo apresentou maior crescimento à temperatura ambiente e o mesmo crescimento à 25 e 28°C (Tabela 2). *M. flavoviride* - exibiu colônia de coloração esverdeada, abundante produção de conídios, aspecto pulverulento, com distintas zonas concêntricas (Tabela 2). O maior crescimento foi observado à temperatura ambiente e a menor à 25°C (Tabela 2). Os fungos estudados partiram de culturas monospóricas. Todas as linhagens apresentaram aspectos de acordo com a literatura, no que se referem ao crescimento em BDA (Oxoid) e esporulação.

MEIO DE CULTURA (BDA) (diâmetro em cm)									
TEMPO (dia)	<i>Beauveria bassiana</i> Cl ₁			<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃			<i>Metarhizium flavoviride</i> BR		
	T.A	25°C	28°C	T.A	25°C	28°C	T.A	25°C	28°C
3	1,00	0,90	0,96	0,86	0,73	0,70	0,50	0,42	0,56
6	2,00	2,01	2,06	1,42	1,58	1,70	1,53	1,21	1,24
9	3,03	2,86	2,96	1,95	2,46	2,53	2,50	1,97	2,23
12	3,76	3,66	3,79	2,45	3,22	3,24	3,37	2,62	2,92
15	4,36	4,33	4,66	2,70	4,00	4,00	4,33	3,32	3,66
18	5,53	5,03	5,43	5,03	4,73	4,73	5,03	4,02	4,33

T.A = 28 ± 2°C. OBS: Foram realizadas 3 repetições e tirada a média aritmética.

TABELA 2. Crescimento linear de *Beauveria bassiana* Cl₁, *Metarhizium anisopliae* PL₄₃ e *Metarhizium flavoviride* BR no período de 3 a 18 dias em BDA na temperatura ambiente (T.A), 25°C e 28°C.

As características morfológicas das colônias e dos conídios se enquadram dentro das espécies citadas na literatura especializada (De HOOG, 1972; GAMS: ROSZYPAL, 1973; TULLOCH, 1976). Contudo, ressalva é dada as descrições originais, quando Gams e Roszypal (1973) citaram que *M. flavoviride* apresenta conidióforos típicos e esporodóquios.

Considerando essa descrição, *M. flavoviride* se enquadraria na família Tuberculariaceae. Se levar em consideração a descrição de Rombach et al (1986) que propõem à variedade *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride*, baseado na mensuração dos conídios [(6,5 -) 7 – 9 (- 11) x 4,5 – 5,5 m] e na formação de sinemata em cultura, a espécie iria para a família Stilbellaceae, o que geraria grande confusão na taxonomia dessa

espécie. No entanto, *M. flavoviride* forma conidióforos livres ou ramificados, fialídicos, em cadeia basipetal (HUGHES, 1953; ONIONS, 1981), enquadra-se na família Moniliaceae, como mostrou Xavier-Santos (1995) em microscopia eletrônica de varredura e Kuklinsky-Sobral e Luna-Alves Lima (1998) em microscopia de luz. Todas as linhagens apresentaram maior crescimento à temperatura ambiente. *B. bassiana* mostrou maior crescimento que as demais em qualquer uma das temperaturas avaliadas. Enquanto *M. anisopliae* cresceu melhor à temperatura ambiente e não houve diferença no crescimento nas temperaturas de 25°C e 28°C. *M. flavoviride* BR foi o mais influenciado pela temperatura. Mostrou maior crescimento à temperatura ambiente (5,03cm) seguido de 28°C (4,33 cm) e 25°C (4,02 cm). Thomas e Jenkins (1997) estudaram os efeitos da temperatura sobre o crescimento de *M. flavoviride* e confirmaram que o crescimento e a virulência são fortemente afetados pela temperatura. A tolerância dos efeitos de temperatura sobre o crescimento vegetativo de *M. anisopliae* e *M. flavoviride* também foi estudado por Ouedraogo et al. (1997), tomando como parâmetro o crescimento linear das colônias. Os autores verificaram que *M. anisopliae* variou de 25 a 32°C, enquanto *M. flavoviride* variou de 25° a 30°C. Embora *B. bassiana* tenha apresentado maior crescimento à temperatura ambiente, seguida de 28°C, apresentando crescimento satisfatório aos 25°C (Tabela 2), após 18 dias de inoculação, o que está de acordo com a temperatura citada por Ferron (1978).

3.2 Produção de conídios (concentração) em diferentes substratos

No substrato ervilha – o crescimento vegetativo das três linhagens teve início após 24 horas de inoculação. Aos 3 dias foi observada a conidiação em *B. bassiana* e *M. flavoviride*. Em *M. anisopliae* a produção de conídios foi detectada a partir do sexto dia. *B. bassiana*, apresentou densa esporulação esbranquiçada. *M. anisopliae* apresentou pouca esporulação sobre os grãos. O *M. flavoviride* exibiu densa esporulação, com formação de tufos de conidióforos com coloração esbranquiçada. Essas observações não sofreram alterações até os 15 dias de crescimento. Nesse substrato a maior produção de conídios foi observada em *M. anisopliae* ($29,77 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e a menor em *B. bassiana* ($5,27 \times 10^8$ conídios/g de substrato).

No substrato soja - aos 6 dias, *B. bassiana* mostrou crescimento exuberante sobre todo substrato. *M. anisopliae* apresentou um crescimento mais lento e pouca conidiação. *M. flavoviride* demonstrou boa esporulação e crescimento uniforme sobre os grãos. Aos 9 dias o *M. anisopliae* e *M. flavoviride* mostraram crescimento e esporulação exuberantes e uniformes. *B. bassiana* mostrou conidiação escassa. com produção conidial insatisfatória para quantificação. Nesse substrato, a maior produção de conídios foi observada em *M. flavoviride* ($45,06 \times 10^8$ conídios/g de substrato).

No substrato milho de munguzá - após 2 dias os fungos apresentaram crescimento vegetativo. Nesse substrato, foi observado esporulação luxuriante aos 6 dias em *M. anisopliae* e manteve a menor esporulação até os 15 dias em *M. flavoviride*. Foi observada

maior produção de conídios em *B. bassiana* ($23,32 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e a menor produção em *M. flavoviride* ($10,44 \times 10^8$ conídios/g de substrato).

No substrato arroz parboilizado – *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride* apresentaram crescimento vegetativo após 2 dias de inoculação, com *B. bassiana* apresentado maior exuberância. Aos 15 dias *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram esporulação exuberante. Nesse substrato, *B. bassiana* apresentou maior produção de conídios ($36,86 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e a menor em *M. flavoviride* ($2,22 \times 10^8$ conídios/g de substrato).

No substrato arroz quebradiço – *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride* mostraram crescimento vegetativo após 2 dias de inoculação. Aos 3 dias *M. anisopliae* apresentou boa esporulação, distribuindo uniformemente sobre os grãos. Aos 6 dias *M. flavoviride* apresentou esporulação escassa. A maior produção foi observada em *M. anisopliae* ($27,25 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e a menor produção em *M. flavoviride* ($1,47 \times 10^8$ conídios/grama) (Tabelas 3).

SUBSTRATOS	ESPÉCIES FÚNGICAS	CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS/GRAMA
♦ Ervilha	<i>Beauveria bassiana</i> CL ₁	$5,27 \times 10^8$
	<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃	$29,77 \times 10^8$
	<i>Metarhizium flavoviride</i> BR	$19,11 \times 10^8$
♦ Soja	<i>Beauveria bassiana</i> CL ₁	*
	<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃	$19,69 \times 10^8$
	<i>Metarhizium flavoviride</i> BR	$45,06 \times 10^8$
♦ Milho de munguzá	<i>Beauveria bassiana</i> CL ₁	$23,32 \times 10^8$
	<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃	$15,52 \times 10^8$
	<i>Metarhizium flavoviride</i> BR	$10,44 \times 10^8$
♦ Arroz parboilizado	<i>Beauveria bassiana</i> CL ₁	$36,86 \times 10^8$
	<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃	$23,43 \times 10^8$
	<i>Metarhizium flavoviride</i> BR	$2,22 \times 10^8$
♦ Arroz quebradiço	<i>Beauveria bassiana</i> CL ₁	$13,97 \times 10^8$
	<i>Metarhizium anisopliae</i> PL ₄₃	$27,25 \times 10^8$
	<i>Metarhizium flavoviride</i> BR	$1,47 \times 10^8$

**Beauveria bassiana* CL₁ apresentou grande proliferação conidial e escassês conidial.

TABELA 3. Concentração de conídios por grama de *Beauveria bassiana* CL₁, *Metarhizium anisopliae* PL₄₃ e *Metarhizium flavoviride* BR em substratos diferentes, aos 15 dias de crescimento, à temperatura ambiente.

Os dados obtidos permitiram assegurar o crescimento e a concentração de conídios nos substratos empregados, durante o período de 3 a 15 dias. *B. bassiana* cresceu melhor em arroz parboilizado ($36,86 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e menor em ervilha ($5,27 \times 10^8$ conídios/g de substrato), e não cresceu o suficiente para ser quantificado em soja. *M. anisopliae* cresceu bem em todos os substratos com maior crescimento em ervilha ($29,77 \times 10^8$ conídios/g de substrato) e menor em milho de munguzá ($15,52 \times 10^8$ conídios/g de substrato). *M. flavoviride* mostrou maior crescimento em soja ($45,06 \times 10^8$ conídios/g de substrato) superando todas as linhagens em todos os substratos e o menor em arroz quebradiço ($1,47 \times 10^8$ conídios/g de substrato). Esses resultados demonstram que as linhagens são exigentes quanto ao crescimento em diferentes substratos. Todavia, o substrato mais empregado para a produção de conídios em pré-inóculo é o arroz parboilizado (RIBEIRO, 1990; 1997; VILAS BOAS et al., 1996), no entanto, em nosso trabalho, somente *B. bassiana* superior as demais linhagens. *M. anisopliae* mostrou-se menos exigente quanto ao crescimento nos substratos empregados.

Alves (1998) em revisão sobre o assunto referiu-se aos vários substratos (arroz cozido, fubá de milho, entre outros) e relatou que o grande problema do uso de substratos naturais, dependendo da finalidade com que esteja sendo empregado, reside na estabilidade da manutenção da atividade fúngica por longo período de armazenamento.

3.3 Determinação da viabilidade dos conídios em diferentes substratos

No substrato ervilha – a maior viabilidade foi observada em *M. flavoviride* (95,13 %) e a menor em *M. anisopliae* (78,16 %).

No substrato soja - foi observado maior viabilidade em *M. anisopliae* (95,67 %) e *B. bassiana* exibiu grande crescimento micelial e conidiação insatisfatória para quantificar pelo método adotado.

No substrato milho de munguzá - foi observado maior viabilidade em *M. flavoviride* (97,85 %) e a menor em *B. bassiana* (90,95%).

No substrato arroz parboilizado – *B. bassiana* mostrou a maior viabilidade (96,09 %) e foi observado menor viabilidade em *M. flavoviride* (91,85 %).

No substrato arroz quebradiço – a maior viabilidade foi observada em *M. anisopliae* (96,80 %) e a menor em *M. flavoviride* (71,80 %) (Tabelas 4). Os resultados do estudo constataram que as linhagens de um modo geral apresentaram boa viabilidade, superando 90% na maioria dos substratos empregados. *B. bassiana* apresentou maior viabilidade no arroz parboilizado (96,09 %) e na soja não foi observada viabilidade suficiente para quantificação. *M. anisopliae* e *M. flavoviride* exibiram ótima viabilidade em todos os substratos. *M. anisopliae* mostrou a máxima viabilidade no arroz quebradiço (96,80 %) e *M. flavoviride* no milho de munguzá (97,85 %). Ribeiro et al. (1992) empregaram o substrato arroz parboilizado na produção de inóculo para testar a viabilidade de *M. anisopliae* em folhas de cana-de-açúcar, em experimentos de campo.

SUBSTRATOS	ESPÉCIES FÚNGICAS	% DE GERMINAÇÃO
♦ Ervilha	<i>Beauveria bassiana</i> (CL ₁)	86,90
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (PL ₄₃)	78,16
	<i>Metarhizium flavoviride</i> (BR)	95,13
♦ Soja	<i>Beauveria bassiana</i> (CL ₁)	*
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (PL ₄₃)	95,67
	<i>Metarhizium flavoviride</i> (BR)	92,30
♦ Milho de munguzá	<i>Beauveria bassiana</i> (CL ₁)	90,95
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (PL ₄₃)	94,75
	<i>Metarhizium flavoviride</i> (BR)	97,85
♦ Arroz parboilizado	<i>Beauveria bassiana</i> (CL ₁)	96,09
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (PL ₄₃)	95,50
	<i>Metarhizium flavoviride</i> (BR)	91,85
♦ Arroz quebradiço	<i>Beauveria bassiana</i> (CL ₁)	90,00
	<i>Metarhizium anisopliae</i> (PL ₄₃)	96,80
	<i>Metarhizium flavoviride</i> (BR)	71,80

**Beauveria bassiana* apresentou grande escassez conidial.

TABELA 4. Percentagem de viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* CL₁, *Metarhizium anisopliae* PL₄₃ e *Metarhizium flavoviride* BR em substratos naturais diferentes os 15 dias de crescimento, à temperatura ambiente

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho poderão servir de base para a utilização de substratos naturais empregados no crescimento e na conidiação de linhagens fúngicas contra insetos causadores de danos à agricultura.

De modo geral todas as espécies fúngicas testadas nesta pesquisa apresentaram produção conidial em quantidade satisfatória o que nos leva a estimular novos experimentos com outros substratos alternativos para o desenvolvimento conidial em massa e uso em campo.

AGRADECIMENTO

As autoras agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro durante a execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. (1998). Fungos entomopatogênicos. Em: S. B. Alves (ed.). Controle Microbiano de Insetos (p. 289–381). São Paulo: 2ª ed., Piracicaba: FEALQ, 1163p.

DE HOOG, G. S. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachum* & *Acrodontium* gen. Nov. Stud. in Mycol. v.1, p. 1-41.

- FERRON, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. An. Soc. Entomol. Brasil. v.23, p. 409-442.
- GAMS, W.; ROZSYPAL, J. (1973). *Metarhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. Acta Bot. Neerl. v. 22, p. 518-521.
- HUGHES, S. J. (1953). Conidiophores, conidia and classification. Canad. J. Bot. n. 31, p. 577- 659.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. (1998). **Citologia e variabilidade genética em *Metarhizium flavoviride* {Resumo}**. Em: XIII Encontro de Genética do Nordeste (p.417), Feira de Santana:BA.
- LUNA-ALVES LIMA, E. A. (1985). **Características citológicas e genéticas de linhagens Selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Mtsch.) Sorokin**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 260 p.
- ONIONS, A. H. S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H. O. W. (1981). Smith's introduction to industries. Mycology. 7 th ed., London. Eduard Arnold, 398 p.
- OUEDRAOGO, A., J. FARGUES, M. S., GOETTEL, C e LOMER, C. J. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. Mycopathologia. n.30, p. 507-512.
- RIBEIRO, S. M. A. (1990). **Caracterização citológica e sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em folhas de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Cryptogama, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 95p.
- RIBEIRO, S. M. A. (1997). **Caracterização citológica e sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e infectividade sobre o cupim *Coptotermes* sp.** Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas, Doutorado em Microbiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 155p.
- RIBEIRO, S. M. A.; LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G. (1992). Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (linhagem PL₄₃) em folhas de cana-de-açúcar. An. Soc. Entomol. Brasil. v. 21, n.2, p. 59-67.
- ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; ROBERTS, D. W. (1986). *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov. a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. Mycotaxon. n. 27, p. 87-92.
- SOCCOL, C. R.; AYALA, L. A.; SOCCOL, L. A.; KRIEGER, N.; SANTOS, H. R. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potatoes by solid-state fermentation. Rev. Microbiol. n. 28, p. 34-42.
- SAMSINÁKOVÁ, A.; KÁLALOVÁ, S. (1981). Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. J. Invertebr. Pathol. v.38.p. 169-174.
- THOMAS, M. B.; JENKINS, N. E. (1997). Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper *Zonocerus variegatus*. Mycol. Res. n.101, p. 1469-1474.

TULLOCH, M. (1976). The genus *Metarhizium*. Trans. Br. mycol. Soc. n. 66, p. 407-411.

VILAS BOAS, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. (1993). Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. Arq. Biol. Tecnol. n. 25, p. 749-765.

VILAS BOAS, A. M.; ANDRADE, R. M.; OLIVEIRA, J. V. (1996). Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arq. Biol. Tecnol.** v.39, n. 1, p. 123-128.

XAVIER-SANTOS, S. (1995). **Aspectos do comportamento cultural, citológico e entomopatogênico de *Metarhizium flavoviride***. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia de fungos Nível Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 108p.

CAPÍTULO 5

USO DE CASCAS DE SEMENTES DE MORINGA OLEIFERA ÍNTEGRAS E FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA SUINOCULTURA

Data de aceite: 01/07/2021

Estêvão Brasiense de Souza

Universidade Federal de Santa Catarina
Laboratório de Virologia Aplicada
Florianópolis-SC, Brasil

Doris Sobral Marques Souza

Universidade Federal de Santa Catarina
Laboratório de Virologia Aplicada
Florianópolis-SC, Brasil
Departamento de Ciência e Tecnologia dos
Alimentos

Paula Rogovski

Universidade Federal de Santa Catarina
Laboratório de Virologia Aplicada
Florianópolis-SC, Brasil

Rafael Dorighello Cadamuro

Universidade Federal de Santa Catarina
Laboratório de Virologia Aplicada
Florianópolis-SC, Brasil

Maria Célia da Silva Lanna

Universidade Federal de Ouro Preto
Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia
Ouro Preto-MG, Brasil

Gislaine Fongaro

Universidade Federal de Santa Catarina
Laboratório de Virologia Aplicada
Florianópolis-SC, Brasil

RESUMO: *Moringa oleifera* é uma planta originária do Sul da Ásia e é conhecida popularmente como Acácia-branca. Tal espécie é reconhecida por

diversos povos como uma “árvore milagrosa” devido às diversas propriedades medicinais e nutricionais presentes nas folhas, raízes, sementes, cascas e flores. Uma de suas características mais promissoras diz respeito à purificação de águas para consumo humano, devido a presença de compostos coagulantes naturais presentes principalmente dentro da semente da moringa. No entanto, pouco se sabe se a casca da semente de moringa, parte membranosa “alada”, a qual é descartada nos processamentos e usos diversos dessa semente, possui capacidade para adsorção e/ou coagulação de agentes biológicos, como bactérias e vírus entéricos, bem como de matéria orgânica. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar a capacidade de redução da turbidez de águas residuárias da suinocultura, bem como o processo de redução e/ou adsorção de bactérias entéricas (representadas pela *Escherichia coli*) e dos vírus entéricos (representados pelos Circovírus porcino – PCV-2 e pelo Adenovírus Humano respiratório– HAoV-5 utilizado como controle interno viral) mediado por sementes íntegras de *M. oleifera*, assim como por somente membranas aladas dessas sementes. A concentração de 125 mg/L de semente apresentou redução significativa na turbidez do efluente, sendo, portanto, considerada a concentração mais promissora para testes subsequentes usando apenas membranas aladas. Assim, utilizou-se 125 mg/L de sementes, obtendo-se apenas as membranas aladas das sementes (rendendo 0,85 mg/L) para o tratamento de efluentes da suinocultura. Em até 8h houve avaliação da redução de turbidez

e patógenos, sendo que as membranas aladas foram capazes de reduzir 3 logs -99,9% de PCV-2 nos efluentes e 1 log – 90% de *E. coli* no sobrenadante tratado após período de repouso / precipitação das membranas por 15 minutos. Assim, o uso de membranas aladas de *M. oleifera* seguido de processo de sedimentação, apresenta potencial como biomaterial a ser explorado na descontaminação de águas residuárias visando seu reciclo para fins de recuperação hídrica e de nutrientes.

PALAVRAS - CHAVE: Biocontrole; Recuperação de recursos naturais; Águas Residuárias; Vírus entéricos; Bactérias entéricas.

1 | INTRODUÇÃO

Como grande parte dos países em desenvolvimento, o Brasil não possui sistemas eficientes de tratamento de água para atender a maioria de sua população, enfrentando falta de água limpa mesmo com o enorme volume hídrico do país. Sendo que entre 2003 a 2016, o país teve aproximadamente 50% de seus municípios (2,783) declarados em estado de emergência devido a secas prolongadas (ANA, 2017). Grande parte desse problema é devido à poluição por dejetos domésticos, dejetos industriais e provenientes da agricultura, assim como sistemas de descontaminação inapropriados ou ausentes (FERREIRA et al., 2019).

Um dos principais setores responsáveis pela contaminação de recursos hídricos no Brasil, porém essencial para o desenvolvimento econômico do país, é o setor agropecuário. Ele consome grande quantidade de água em sua atividade, utilizando cerca de 70% de toda a água canalizada do país (SEBRAE, 2014; HESPAHOL, 2002). Um sistema de reuso seguro proveniente dos setores agropecuários, portanto, é altamente pertinente dentro do conceito de economia circular, visto a possibilidade de reciclo hídrico e de nutrientes para fins de lavagem de instalações, para fertilização de solos e irrigação de plantas (VIANCELLI et al., 2013; VELHO et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Dentre as atividades do setor agropecuário que mais utilizam e contaminam água está a suinocultura, estimando-se o consumo de $6m^3$ de água para produzir um kilo de carne suína (PALHARES et al., 2011). A criação de suínos, além de necessitar de um consumo elevado de água para manutenção dos animais, acarreta na contaminação de grandes volumes desse recurso hídrico, inviabilizando sua reutilização sem tratamento prévio.

Na China granjas de suínos em pequena escala produzem cerca de 216 a 773 toneladas (Zhang et al., 2017) de dejetos anualmente, tais excretas possuem usualmente uma alta concentração de bactérias e protozoários entéricos, muitos responsáveis por diversos surtos na indústria de alimentos e consumo local como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Cryptosporidium* e *Giardia* (GUAN et al., 2003; GIÁCOMAN-VALLEJOS et al., 2015). Ainda, ressalta-se que essas matrizes ambientais podem apresentar vírus entéricos, muito deles zoonóticos. O Circovírus porcino (PCV2), Adenovírus porcino (PAv), Rotavírus A (RV-A),

vírus da hepatite E (HEV), entre outros, são exemplos de patógenos virais que podem estar presentes nos dejetos suínolas (VIANCELLI *et al.*, 2012; MENG, 2013; FONGARO *et al.*, 2015; VLASOVA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2020).

O método mais comumente utilizado na região Sul brasileira para tratar dejetos provenientes da atividade da suinocultura, baseia-se em biodigestão, por meio de reatores chamados de biodigestores anaeróbios do tipo lagoa coberta (KUNZ *et al.*, 2009). O sistema de tratamento consiste em lagoas de dejetos suínolas, nas quais as excretas dos animais (assim como possíveis carcaças) são acumuladas em câmaras hermeticamente fechadas e mantidas estocadas por cerca de 45 dias e retenção hidráulica (TRH) - (AMARAL *et al.*, 2014). Os biodigestores anaeróbios (BA) do tipo Lagoa Coberta ou Canadense são os modelos mais adotados por propriedades suínolas da região Sul brasileira, por seu menor custo de implantação e manutenção, quando comparados a outros modelos de biodigestores anaeróbios (OLIVEIRA, 2006).

1.1 PATÓGENOS ENTÉRICOS E MARCADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NA SUINOCULTURA

1.1.1 Vírus entéricos

Os vírus entéricos são primariamente transmitidos por meio da via fecal-oral pela ingestão de água ou alimentos contaminados, podendo ser raramente transmitidos por via parental como é o caso do vírus da hepatite E (HEV) (SÁNCHEZ *et al.*, 2016).

Como os vírus são unidades que necessitam de um hospedeiro para seu desenvolvimento, não possuindo metabolismo próprio que lhes permita multiplicação ou propagação fora de um organismo vivo, eles se encontram vulneráveis quando expostos ao ambiente externo. Tendo a estabilidade e a sobrevivência influenciadas por suas características estruturais e pelos estresses sofridos no ambiente (SÁNCHEZ *et al.*, 2016). Tais adversidades podem incluir: radiação ultravioleta, aumento da temperatura, disrupções físicas (como vibrações e pressão), proteases, lipases (no caso de vírus envelopados), salinidade, amônia, variações no pH, agentes virucidas produzidos artificialmente ou por organismos. Mesmo com a desvantagem adaptativa de não possuir metabolismo próprio a fim de contornar adversidades ambientais, os vírus entéricos costumam ter uma maior estabilidade em comparação aos patógenos bacterianos, podendo permanecer estáveis por grandes períodos de tempo em ambientes inóspitos para a maior parte dos patógenos bacterianos (LOPMAN *et al.*, 2004; SCALLAN *et al.*, 2011). Tornando esses agentes infecciosos mais prevalentes em sistemas com baixo tratamento de resíduos ou águas (LOPMAN *et al.*, 2004).

É importante realçar que quanto maior for o tempo de estabilidade do vírus em relação às forças externas, maior é seu potencial de transmissão. Pois o meio em que se encontra (seja um substrato como solo ou um meio líquido) permanece por mais tempo

infeccioso pela presença de partículas virais ativas ou “vírions” (RZEŠUTKA *et al.*, 2004).

Outro fator que eleva a periculosidade dos vírus entéricos em comparação com microrganismos bacterianos é a relação da dose infecciosa necessária para ocasionar um quadro de infecção, sendo necessário somente de 1 a 5 partículas virais ativas para ocasionar um quadro infeccioso (HUSMAN *et al.*, 2013). Comparativamente, microrganismos como *Campylobacter sp.*, patógeno frequente em contaminações, necessitam em torno de 100 a 1000 unidades ativas para ocasionar uma infecção (ACHESON *et al.*, 2001).

Considerando que um indivíduo pode eliminar cerca de 10^{13} partículas por ml por meio de secreções como vômito ou diarreia, mesmo que assintomático, e visto como tais partículas podem se manter estáveis por grandes períodos mesmo em ambientes hostis, é fácil reconhecer como uma contaminação por estes patógenos podem se espalhar com grande facilidade e potencialmente, podendo os vírus persistirem infecciosos por meses fora do seu hospedeiro (BOSCH *et al.*, 2008; HUSMAN *et al.*, 2013).

Akin *et al.* (1971) e Sattar *et al.* (1981), por exemplo, verificaram que a perda de unidades infecciosas virais de poliovírus, coxsackieviruses e echovírus em diferentes tipos de águas (águas de rios poluídos e não poluídos, águas provenientes de lençóis freáticos e de abastecimento caseiro) é menos de $1 \log_{10}$ por dia (sendo a maior redução em águas de torneira com reduções diárias de $0.576 \log_{10} d^{-1}$).

Vírus podem ser propagados através da contaminação de superfícies. Bidawid *et al.* (2004) demonstrou que dedos contaminados por calicivírus felino são capazes de transferirem mais de 46% do total desses vírus para a superfície de lâminas de presunto durante sua manipulação. Adenovírus humano (HAdV-2) manteve-se infeccioso por mais de 120 dias a 20°C em águas de aquíferos, apresentando somente uma redução de 2.4 logs da concentração original. Quando observada a temperatura de 4°C, não houve decaimento significativo na concentração viral (OGORZALY *et al.*, 2010). A diferença da estabilidade de amostras de rotavírus humano em diferentes temperaturas foram associadas por Raphael *et al.* (1985) à atuação de microrganismos, a qual possuíam uma taxa metabólica mais acentuada em altas temperaturas e assim produziam mais compostos reativos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o vírus da hepatite E (HEV) é o maior responsável por quadros de hepatite entérica mundialmente (WHO, 2011). Tal vírus é identificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo o responsável por cerca de 3.3% da mortalidade mundial relacionada às hepatites virais. De acordo com a OMS, tal patógeno é responsável por cerca de 20 milhões de infecções anualmente, constituindo 3.3 milhões de casos assintomáticos e 44.000 mortes somente em 2015 (WHO, 2011; REIN *et al.*, 2012). HEV usualmente ocasiona hepatite aguda, porém em pacientes imunocomprometidos tal quadro pode progredir para cronicidade, com a excreção do vírus por longos períodos. Em pacientes com prévias enfermidades hepáticas e gestantes, HEV pode ocasionar insuficiência hepática fulminante (JILANI *et al.*, 2007).

Além de ser um dos mais importantes vírus causadores de gastroenterites,

principalmente em países em desenvolvimento, e o principal agente em hepatites causadas por patógenos virais, tal vírus também precisa ser abordado como um contaminante tanto de animais quanto humanos, visto que possui característica zoonótica, podendo transitar de animais para humanos e vice-versa (GARCÍA *et al.*, 2020). Algumas variantes são mais prevalentes em animais do que outras, havendo fenótipos que só infectam especificamente uma espécie, enquanto outros conseguem ocasionar doença em mais de uma espécie. As variantes HEV-1 e HEV-2, por exemplo, são conhecidas por somente provocar infecção em humanos. HEV-3 e HEV-4, as mais encontradas em suínos, possuem capacidade zoonótica, sendo o fenótipo do tipo “3” a mais prevalente em infecções humanas propagadas por contato prévio com o vírus replicado em hospedeiros suínos (GARCÍA *et al.*, 2020).

Os rotavírus também possuem potencial zoonóticos e são frequentemente encontrados em mananciais contaminados por esgoto humano ou animal. De acordo com um relatório realizado com a UNICEF de 480.000 crianças menores do que 5 anos de idade morrem anualmente decorrente de quadros de diarreia provocados pela falta de água limpa de qualidade. O Rotavírus A (RV-A) é responsável por cerca de 29,3% desses óbitos mundialmente (LANATA *et al.*, 2013). Pode iniciar uma infecção mesmo com um pequeno número de partículas virais ativas (GRAHAM *et al.*, 1987). RV-A permaneceu infeccioso por mais de 200 dias em condições anaeróbicas, assim como em câmaras de dejetos de suíno por diversos meses, decaindo em somente um log após 6 meses (PESARO *et al.* 1995; SIDHU *et al.*, 2015). Assim como demais vírus entéricos, tais patógenos possuem uma alta persistência frente às diferentes condições ambientais, sendo necessários protocolos adicionais de tratamento dos dejetos para sua remoção (SIDHU *et al.*, 2015).

Outro vírus entérico importante no manejo de infecções em sistemas de suinocultura é o Porcino Vírus 2 (PCV2), que embora não seja um patógeno zoonótico, está entre os mais prevalentes e danosos em suínos. Seu quadro infeccioso ocasiona diversas alterações no sistema imunológico e danifica o aparelho respiratório, permitindo diversas infecções secundárias que podem ainda mais agravar o quadro (ROSE *et al.*, 2012). Tal vírus pode ocasionar características clínicas, podendo ser muitas vezes confundido com um patógeno bacteriano por profissionais inexperientes. Quadros como o complexo de doenças respiratórias do suíno (PRDC), podendo em certos casos ser causada por microrganismos bacterianos, usualmente é caracterizado por proeminente perda de peso, emaciação, dispneia, taquipneia e icterícia (THACKER *et al.*, 2001). Circovirose suína (PMWS) é caracterizada como danos ao sistema imunológico dos animais, um outro sintoma comum em animais infectados, podendo facilitar a infecção secundária do indivíduo debilitado (OPRIESSNIG *et al.*, 2007). Síndrome dermatite e nefropatia suína (PDNS), caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas como necrose e petéquias, febre, letargia e alteração da estrutura renal, podendo o quadro ser fatal em casos graves (OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

A maior parte das cepas de *Escherichia coli* são não patogênicas, sendo encontradas

comumente no intestino de animais e humanos como bactérias da microbiota natural, apresentando efeitos benéficos como a regulação da concentração de vitaminas K e B12 no corpo (EGGESBØ *et al.*, 2010). Porém, certas variedades patogênicas causam grandes danos no organismo nos animais infectados, como as *E.coli* enterohemorrágicas, podendo se alastrar em toda uma cadeia produtiva a partir de um material contaminado, sendo a análise de sua presença altamente visada em sistemas agropecuários (CROXEN *et al.*, 2013; STROMBERG *et al.*, 2018).

Visto à periculosidade das espécies patogênicas e levando em consideração que tal bactéria é um dos microrganismos mais estudados, *E. coli* é utilizada comumente como um marcador de contaminação por patógenos entéricos, sendo sua presença em águas e sólidos um indicativo de contaminação por excretas (WEN *et al.*, 2020; CROXEN *et al.*, 2013). Sua redução, portanto, é um essencial indicador de qualidade sanitária.

1.2 Métodos Alternativos e Descentralizados Para Tratamento de Recursos Hídricos Baseado em *Moringa Oleifera*

A floculação de partículas orgânicas visando a redução da turbidez das águas é uma das técnicas mais tradicionais utilizadas pelo mundo e por grande parte da história humana. Tal método tem como objetivo reduzir o número total de substratos suspensos, a qual por sua vez podem estar abrigando uma larga quantidade de microrganismos aderentes (MATILAINEN *et al.*, 2005). Nisso a agregação de partículas suspensas continua a ser um método viável no controle de patógenos no meio ambiente, sendo necessário a caracterização das propriedades físico-químicas e comportamentais entre o substrato, patógeno e coagulante para uma maior retenção de partículas potencialmente infecciosas.

O uso de materiais orgânicos de característica floculante são candidatos cada vez mais explorados para serem utilizados como potenciais substitutos a métodos de coagulação tradicionais, como o uso de sulfato de alumínio. Ao contrário da aplicação de sulfato de alumínio, mais custoso e conhecido por deixar resíduos na água tratada, sendo associado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (YEGAMBARAM *et al.*, 2015), as sementes de *Moringa oleifera* são biomateriais de baixo custo e biodegradáveis os quais demonstraram possuir propriedades como floculantes naturais de baixo impacto ambiental. Sendo, muito possivelmente, o melhor coagulante natural atualmente disponível (NOUHI *et al.*, 2019).

M. oleifera, conhecida popularmente também como Acácia-branca, se refere à uma árvore nativa do Sul da Ásia (FAO, 2019) a qual tem havido uma crescente demanda para seu consumo assim como utilização de suas propriedades para fins de saúde em geral, sendo reconhecida tanto por suas qualidades nutritivas assim como suas alegadas propriedades no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, etc (ANVISA, 2019). Em países como Índia, Etiópia, Filipinas, Sudão, entre outros, a *M. oleifera* é utilizada como um importante suplemento nutricional. Sendo consumido tanto suas sementes, folhas, casca,

raízes e flores (FAO, 2019). Por suas qualidades medicinais e alimentícias, tal planta é referida como a “árvore milagrosa” por diversas tribos africanas (MATIC et al. 2018). Uma importante aplicação da *M. oleifera* se dá com a aplicação do macerado das sementes na desinfecção de reservatórios de água, bem como na redução da turbidez da mesma, diminuindo o número de partículas sólidas que servem de substrato para patógenos se desenvolverem e se protegerem (BAPTISTA et al., 2017; DELELEGN et al. 2018). Tal utilização já era observada por comunidades mais carentes do Sudão, assim como em áreas da Indonésia, Nordeste da África e América do Sul, que empregavam a semente macerada como alternativa à aplicação de sulfato de alumínio em locais de baixa renda (SUTHERLAND JP, FOLKARD G, GRANT WD, 1990).

1.3 Cascas de *M. Oleifera* para o Tratamento de Águas Residuais

Ao contrário de sulfato de alumínio e outros agentes coagulantes metálicos, compostos orgânicos, como extratos a base de *M. oleifera*, além de serem biodegradáveis apresentam baixa toxicidade (MADRONA et al., 2012). Porém, tal pressuposto pode ser necessário ser revisto com mais dados devido às características bioquímicas específicas da *M. oleifera*, visto que já foram observados efeitos citotóxicos com concentrações de 1 a 50 mg/L em ensaios celulares sistemas de células inteiras imobilizadas (AL-ANIZI et al., 2014). Kavitha et al. (2012), inclusive, identificou em seu estudo que extratos de *M. oleifera* possuem capacidade tóxica em *Cyprinus carpio* (capa-comum), identificando uma concentração subletal a 124 mg/L, inferindo que tais compostos podem trazer efeitos adversos à diferentes espécies de um local de aplicação, como por exemplo, caso tal tecnologia fosse inserida em um rio ou fonte de água potável além da prevista aplicação em águas suínícolas. Porém, não se sabe se tal efeito é similar em cascas de *M. oleifera*, sendo necessário experimentos futuros para verificar a segurança do material em largas aplicações.

A capacidade de floculação se dá pela presença de floculantes no macerado da semente, tais como globulina e albumina, aos quais foram verificadas proporcionando uma alta redução da turbidez da água, assim como uma significativa purificação da mesma. Porém, pouco se sabe a respeito da capacidade floculante da membrana “alada” que envolve as sementes de moringa, as quais são descartadas muitas vezes em processos que utilizam tal macerado para a floculação e ainda que utilizam a semente para fins alimentícios e fitoterápicos (GARCIA-FAYOS et al. 2015; BAPTISTA et al. 2017; DELELEGN et al. 2018; HOA e HUE 2018; VALVERDE et al. 2018).

Estudos associaram a capacidade floculante dos extratos de *M. oleifera* à presença de proteínas de alto peso molecular (em torno de 13 kDa) com capacidade de adsorção de moléculas presentes na água, apresentando ponto isoelétrico de 10 e 11, demonstrando o caráter catiônico dessas proteínas. Experimentos anteriores utilizando macerados de sementes descascadas e sementes íntegras (apresentando tanto extratos macerados

do interior da semente como sua casca) indicaram que sementes íntegras apresentaram menor capacidade adsorptiva em águas em comparação às descascadas. Isso demonstra uma clara concentração das proteínas ativas em seu interior, porém, como há uma grande concentração de proteínas e óleos em sua casca é possível que haja a presença das mesmas proteínas coagulantes, porém em menor quantidade (NDABIGENGESERE et al., 1995).

Outro poluente de recursos hídricos que está correlacionado aos surtos por patógenos virais é a presença elevada de metais na água. Tal presença está diretamente relacionada às diversas interações entre as proteínas virais, promovendo uma maior funcionalidade e estabilidade nessas estruturas (AL-BADAIL e SHUHAIMI-OTHTMAN, 2015). Diversos metais como zinco, cobre e manganês mediam a atividade viral, aumentando a taxa de sobrevivência assim como a taxa de suscetibilidade de infecção (CHATURVEDI et al., 2004). Por exemplo, Zinco, foi identificado sendo relacionado a atividade da transcriptase reversa em HIV-1 (GUO et al., 2000). Tais metais também possibilitam uma maior presença de vírus viáveis nas águas onde suas concentrações são maiores, como por exemplo, é observado em estudo com o HADV em águas com alta presença de manganês, níquel, arsênio, bário e chumbo (REIS et al., 2019).

Estudos anteriores demonstraram eficiência na utilização de “bolos” de *M. oleifera* (obtidos pelo mascaramento das sementes e sucessivas secagem do material a fim de obter um material com consistência de pasta) na absorção de diferentes tipos de metais em água, incluindo chumbo (GONÇALVES JUNIOR *et al.*, 2013). Porém pouco se sabe se um resultado semelhante pode ser obtido pela utilização de cascas das sementes que são comumente descartadas. Neste sentido, o presente estudo baseou-se na hipótese de que membranas aladas de semente de *M. oleifera* atuam na redução de turbidez, *E. coli* e vírus entéricos em efluentes suínolos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efluentes da Suinocultura: Coletas e Características Físico-Químicas

Para realização deste estudo foram coletados efluentes da saída de biodigestores anaeróbios provenientes de três granjas de criação de suínos, situadas no município de Concórdia-SC (27°18' S, 51°59' W). Tratavam-se de granjas de suínos em fase de engorda (fase de terminação), com aproximadamente 300 animais em cada uma. Os biodigestores anaeróbios possuíam uma média de 15 m de comprimento, 7 m de largura, volume de 135 m³ de dejetos suínolos, com alimentação diária de 3 m³/dia e tempo de retenção hidráulica estimado entre 30 – 50 dias.

Amostras compostas de efluentes ($n=3$ amostras), cada uma de 1 L, foram coletadas em duas campanhas amostrais, em outubro de 2019 e em outubro de 2020. Amostras

foram transportadas refrigeradas até o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC, sob refrigeração.

2.2 Sementes de *M. oleifera*

Sementes de *M. oleifera* foram obtidas comercialmente. As sementes íntegras da planta possuem um envoltório não membranoso e uma membrana alada que circunda a semente conforme a Figura 1.



Figura 1: Sementes de *M. oleifera* íntegras. Indicando as membranas aladas (indicadas por “1” em vermelho), seu envoltório não membranoso (indicadas por “2” em azul).

2.3 Avaliação e Quantificação de Patógenos Entéricos Virais

2.3.1 Vírus entéricos

Para a concentração de ácidos nucleicos das amostras, o HAdV-5 foi utilizado como controle interno nas amostras, previamente inoculadas com 3×10^6 PFU (unidades formadoras de placa). Os ácidos nucleicos virais foram extraídos através do kit comercial PureLink® Viral RNA/DNA, Invitrogen (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se 200 μ L de cada amostra. O concentrado de material genético foi armazenado à - 20 °C para sua amplificação e quantificação viral pelo método de PCR (Reação da Cadeia da Polimerase) em tempo real (qPCR).

Os protocolos utilizados nas qPCRs são os mesmos descritos em Hundesa et al. (2009), Opriessnig et al. (2003), Jothikumar et al. (2006), Zeng et al. (2008) e Hernroth et al. (2002), visando a detecção e quantificação PAdV, PCV-2, HEV, RV-A e do controle

interno HAdV-5, respectivamente. Para vírus de RNA, como foi o caso do RV-A e HEV, foi utilizado o OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN), contendo a enzima transcriptase reversa, o que permite a síntese do cDNA previamente à qPCR, promovendo a RT-qPCR em uma única reação. Plasmídeos contendo os fragmentos gênicos dos vírus avaliados foram utilizados em diluição seriada para a formação da curva padrão. Todas as análises contaram com controle negativo e foram realizadas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

2.3.2 Análises de *E. coli*

A análise e quantificação de *E. coli* foi realizada por meio de isolamento direto em Ágar seletivo e diferencial MacConkey (frequentemente utilizado para diferenciar vários bacilos gram-negativos capazes de fermentar a lactose, produzindo colônias rosas). O efluente foi diluído seriamente na base 10 em tampão fosfato salino 1 X (pH 7,5). Um total de 100 µL de cada diluição até na diluição de 100 mil vezes foi plaqueado em condições assépticas e as placas foram incubadas a 37°C durante 24h. A contabilização deu-se em Unidade Formadora de Colônia (UFC)/ml.

2.4 Análise de Turbidez Adaptada - Espectrofotometria Óptica

Para fins de análises de turbidez dos efluentes, realizou-se a avaliação espectral da densidade óptica (DO) utilizando o aparelho SpectraMax® M2^o. As leituras foram realizadas na faixa de 540 nm, usando 200µL de efluente em placas de 96 cavidades, em quadruplicatas.

2.5 Desenho Experimental

Realizaram-se três ensaios para alcançar os respectivos objetivos deste estudo: Ensaio 1 (Piloto investigativo com sementes íntegras de *M. oleifera* – denominado tratamento SIMO); Ensaio 2 e 3 (ensaios dependentes usando MASMO seguido de sedimentação, respectivamente).

a) Ensaio 1: Piloto investigativo usando semente íntegra de *M. oleifera* (SIMO)

Efluentes da suinocultura foram segregados em frascos de vidro, em um volume de 200 ml cada, em réplicas experimentais, em dois experimentos independentes. Neste piloto avaliou-se a capacidade de sementes íntegras reduzirem turbidez em efluentes da suinocultura. Para tal fim, sementes íntegras foram adicionadas na concentração de 62 mg/L, 125 mg/L e 240 mg/L, considerando estudos prévios da literatura (BHUARTAWAT *et al.*, 2007). O efluente foi mantido em agitação constante (150 RPM-min), em temperatura ambiente de 23°C. Amostras de 1-4 ml foram retiradas para análises de turbidez considerando intervalos de 0, 2, 4, 6 e 8h de tratamento. Controles não tratados igualmente foram avaliados. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas experimentais independentes.

B) Ensaio 2: Tratando efluente suinícola com membrana alada de *M. oleifera* (MASMO)

Para fins de estudo da hipótese de que a membrana alada da casca da semente possuía capacidade de adsorção/redução microbiana, realizou-se a segregação de tal membrana de cada unidade de semente individualizada. Em virtude de que os resultados do ensaio 1 apresentaram melhor redução da turbidez dos efluentes tratados usando a concentração de 125 mg/L de sementes íntegras, utilizou-se esse quantitativo para a extração mecânica das membranas aladas de cada grão, rendendo 0,85 mg/L de membranas aladas de sementes de *M. oleifera* (MASMO) – Figura 2.



Figura 2: Comparação entre a semente de *Moringa oleifera* (A: placa à esquerda) e sua membrana “alada” (B: placa à direita), onde o volume de membranas da imagem corresponde diretamente às sementes descascadas em uma relação de 2,5g de sementes para 0,17 g de membranas aladas.

Os ensaios foram conduzidos nas mesmas condições que o ensaio 1 (descrito acima), utilizando-se efluente da suinocultura sabidamente negativo para PADv, RVA e HEV, mas positivo para PCV-2. Para análises bacterianas, utilizou-se como modelo *E. coli*, sendo inoculado artificialmente 3×10^6 UFC/ml de *E. coli* ATCC13706 previamente produzida em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI). Como controle interno viral do processo, utilizou-se o HAdV-5, previamente produzido em cultura celular no LVA, o qual foi inoculado na concentração de 3×10^6 PFU/ml.

Nesse experimento o tratamento baseou-se exclusivamente em MASMO, analisando-se aqui a redução de turbidez, PCV-2 natural e *E. coli* inoculada (ambos microrganismos abundantes em efluentes da suinocultura e modelos microbianos para estudos).

C) Ensaio 3: Sedimentação natural pós-tratamento MASMO

Adicionalmente, após 8h de tratamento na condição MASMO (**Ensaio 2**), realizou-se ensaio de sedimentação das membranas e verificação da redução de vírus e bactérias no efluente tratado. Efluentes foram colocados em repouso para processo de sedimentação natural em tempo fixo de 15 min. Após tal intervalo, 5 ml de amostras do sobrenadante

foram recolhidas e analisadas de acordo com turbidez, *E. coli* e vírus entéricos (PCV-2 e HAdV-5), conforme o realizado com as amostras anteriores, considerando efluentes suinícolas tratados e não tratados com MASMO.

2.6 Citotoxicidade DOs efluentes tratados com SIMO e MASMO

Ensaio de citotoxicidade do efluente pós-tratamento com SIMO e MASMO foram conduzidos em cultura celular animal, usando a linhagem VERO (oriundas de rim de macaco verde da África -ATCC® CCL81™). Para o ensaio, o efluente controle e os tratados com MAMO e SIMO foram previamente adicionados de 1% de antibióticos (Penicilina G 100U/ml; Streptomina 100U/ml e Anfotericina B 25g/ml) e diluídos (1:32; 1:64, 1:128, 1:264). As células VERO previamente cultivadas foram alocadas em placas de 24 cavidades, foram lavadas com solução salina (PBS pH 7,0) e receberam 100 µl das respectivas diluições em duplicata, sendo então incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 1h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e 1 ml do meio de manutenção (Meio Mínimo Essencial -MEM 1X, 1% Antibióticos, 2% Soro Fetal Bovino) foi adicionado em cada poço. As placas foram então levadas novamente à estufa de cultura celular animal, na qual permaneceram por 12h (afim de evitar grande propagação de fungos e bactérias, bem como viral). Após esse período houve remoção do meio de cultura, lavagem celular com solução de PBS e coloração de células viáveis usando 250 µl de preto de naftaleno. A citotoxicidade aparente foi avaliada por meio de comparação da viabilidade celular entre células controle e àquelas desafiadas com os efluentes da suinocultura.

2.7 Análises Estatísticas

Análises estatísticas de variação entre os grupos experimentais foram conduzidos no GraphPad Prisma 5.0 (EUA) usando o teste ANOVA e regressão linear, sendo consideradas diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio 1 - SEMENTE ÍNTEGRA (SIMO)

Nas análises do ensaio 1 observou-se a maior redução da turbidez utilizando 125 mg/L de SIMO. A Tabela 1 demonstra os resultados da análise de turbidez por espectrofotometria óptica, havendo uma redução máxima de 53,78% da turbidez usando 125 mg/L de sementes.

Tempo (horas)	62 mg/L	125 mg/L	240 mg/L	Controle não tratado
2	1,85	2,51	2,04	2,31
4	1,76	1,50	1,94	2,31
6	1,63	1,07	1,47	2,50
8	1,49	1,16	1,41	2,09
Redução Total (%)	19,45	53,78	30,8	9,5

Tabela 1: Média dos resultados da turbidez via leitura espectrométrica em SpectraMax® M2^e à 540 nm e a redução percentual após os tratamentos usando sementes íntegras de *M. oleifera*.

Houve uma tendência linear de decaimento entre os tempos 2 e 6 h com redução significativa no tratamento SIMO usando 125 mg/L – Figura 3.

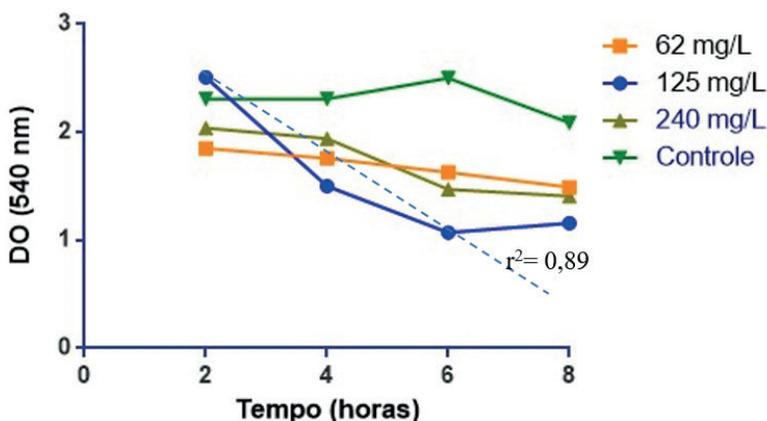


Figura 3: Redução com tendência linear de decaimento da turbidez no tratamento SIMO usando 125 mg/L.

As sementes íntegras podem ter atuado na agregação de sólidos em suspensão reduzindo a turbidez aparente dos efluentes em relação ao controle. Além disso, o estudo de toxicidade não apresentou efeitos citotóxicos nas diluições 1:128 e 1:264, porém apresentando citotoxicidade nas diluições 1:32 e 1:64 do efluente tratado em comparação com o controle em células VERO. Isso é um fato inédito, pois não usamos semente maceradas e sim íntegras, evitando a maior liberação de compostos tóxicos, porém mostrando sua capacidade na redução de turbidez amostral. Estudos prévios demonstram a efeitos citotóxicos, mesmo em altas diluições, superiores a 1:1000 em

diferentes organismos quando utiliza-se extratos macerados de sementes de *M. oleifera*, incluindo ensaios *in vitro* e *in vivo* (*Cyprinus carpio* (carpa-comum)) - (AL-ANIZI *et al.*, 2014 e KAVITHA *et al.* 2012).

Esses dados foram fundamentais para avaliarmos o quanto a membrana alada de *M. oleifera* era responsável por tal redução de turbidez, bem como passou-se a questionar se haveria eficiência em reduzir patógenos entéricos.

3.2 Ensaios 2 e 3 - Tratando efluente suinícola com membrana alada de *M. oleifera* (MASMO) seguido de sedimentação

- **Turbidez**

Os dados do primeiro experimento foram importantes para formular o desenho experimental dos Ensaios 2 e 3, validando o possível efeito adsorptivo de MASMO.

A Figura 4 apresenta a turbidez de efluente tratado e não tratado com MASMO em até 8h. Entre 6 e 8 h a curva do controle interpola-se com a curva do tratado, demonstrando uma potencial tendência de redução da turbidez. No entanto não houve redução significativa da turbidez do efluente suinícola tratado com MASMO até as primeiras 8 h de avaliação.

A variação de turbidez tanto no controle quanto no tratamento, pode ser devido a replicação bacteriana no efluente. Tal comportamento, porém, não foi o mesmo obtido no Ensaio 1, podendo haver influência de inibição bacteriana da possível liberação de compostos da semente íntegra a qual não são encontrados nas membranas aladas.

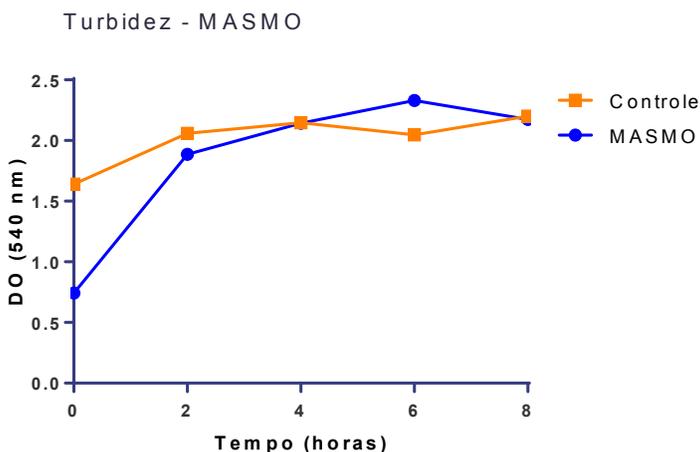


Figura 4: Turbidez de efluente tratado e não tratado com MASMO em até 8h.

No entanto após sedimentação de 15 minutos o efluente tratado com MASMO teve redução de 69% em sua turbidez, quando comparado ao controle não tratado (Tabela 2). Isso representa um importante achado do ponto de vista operacional do tratamento de MASMO seguido de sedimentação do efluente, visando maior remoção de sólidos suspensos.

Tempo (15min)	MASMO-Sedimentação	Controle não tratado
2	0,96±0,06	1,39±0,29
Redução Total (%)	69,06	

Tabela 2: Redução da turbidez do efluente suinícola após MASMO seguido de sedimentação de 15 min em relação ao controle não tratado.

Examinando os dados de turbidez e comparando com estudos anteriores os quais utilizaram extratos da semente de *M. oleifera* (DELELEGN et al. 2018; BAPTISTA et al., 2017), um novo tipo de amostragem foi proposta, considerando o fenômeno de sedimentação. Esse teste não foi realizado no primeiro ensaio porque usando SIMO havia floculação das sementes e não sedimentação como ocorrido em MASMO.

- **Redução viral e bacteriana**

Quando PCV-2 foi avaliado durante o tratamento do efluente da suinocultura usando MASMO, entre 4-8 h houve uma redução viral significativa de 3 log₁₀ (99,9%) em relação ao controle não tratado. Quanto ao HAdV-5, usado como controle viral interno, houve uma redução branda e não significativa de 1 log₁₀ após 6h de tratamento usando MASMO (Figura 5). Considera-se ainda que o HAdV-5 foi inoculado artificialmente na amostra, para fins de controle viral; Já o PCV-2 naturalmente ocorre nessas amostras, estando aclimatado e propiciando avaliar melhor seu comportamento experimental frente ao MASMO. A redução viral pode estar relacionada com a ampla afinidade de vírus não envelopados com compostos orgânicos em suspensão. Podendo por um lado, auxiliar na sedimentação viral e predação por protozoários ali presentes, bem como, inferir em uma maior estabilidade destes vírus ao gerar o efeito agregativo (CHATTOPADHYAY et al., 2000; CHATURVEDI et al., 2004; AL-BADAI AND SHUHAIMI-OTHMAN 2015).

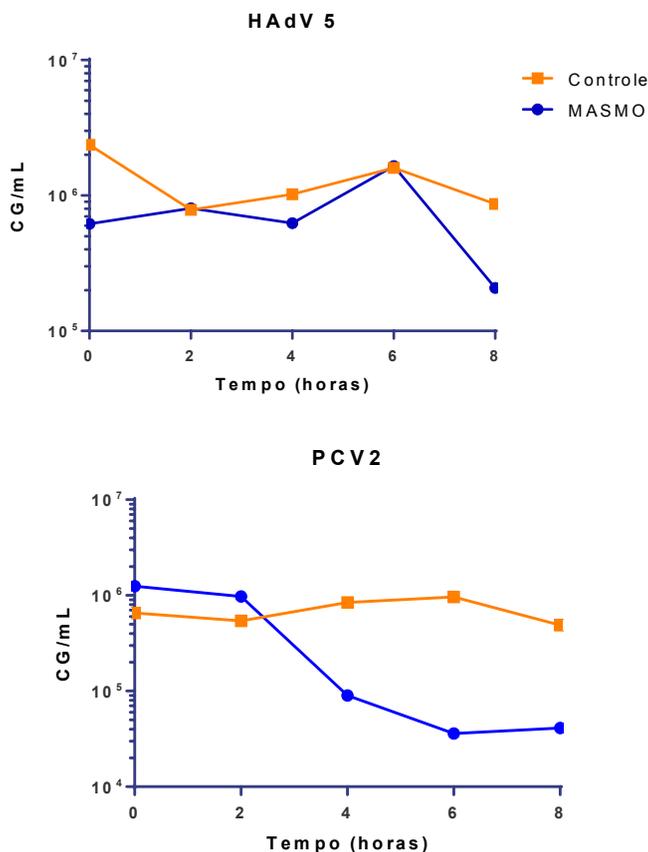


Figura 5: Média detectada de HAdV-5 e PCV-2 após tratamento com MASMO, onde o controle e tratamento (MASMO) estão representados em cores laranja e azul, respectivamente.

Cabe ressaltar que a inibição e/ou redução de PCV-2 possui grande importância no âmbito de se obter granjas suinícolas que evitem retro-infecção no sistema, possuindo grande capacidade de contaminação de um sistema de criação após contato com uma cepa viral ativa. Tal vírus é amplamente distribuído em criações de suínos no mundo, sendo raro os casos no qual há granjas livres do patógeno. PCV-2 ocasiona diversas lesões teciduais e enfraquece o organismo, sendo que tal vírus pode provocar infecção em todas as fases de criação animal, independente do estado imunológico (OPRIESSNIG *et al.*, 2020).

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que MASMO não apresentou efeitos negativos sob células animais (VERO), mesmo em diluição baixas (1:32; 1:64; 1:128 e 1:264), do efluente tratado após 8h em comparação com o controle não tratado neste mesmo tempo.

É importante ressaltar que certos peptídeos encontrados no interior das sementes de *M. oleifera* apresentaram facilidade em se ligar em partículas negativamente carregadas

de característica coloidal, como por exemplo, partículas virais (BARAKAT *et al.*, 2016), havendo redução viral significativa em diferentes filtros tratados com extratos macerados das sementes, sejam eles compostos de biomateriais ou areia (XIONG *et al.*, 2017; FRANCISCO *et al.*, 2014). Porém nossos resultados apontam um possível uso simplificado e escalonável, apenas das membranas residuais de tais semente, sem aparente citotoxicidade, evitando-se o processo de maceração que pode interferir na toxicidade da matriz ambiental tratada.

No que se referiu à *E. coli* avaliada em MASMO não houve redução significativa, havendo apenas às 8h de tratamento a interpolação das curvas de efluentes não tratado e tratado, o que indicaria um possível início de inativação ou redução bacteriana (Figura 6). Observa-se uma flutuação nos valores de *E. coli* ao longo das 8 horas experimentais. Tal flutuação pode ser devido à influência da adição de nutrientes no efluente comparado ao controle, hipotetizando que entre 4 e 6 h MASMO pode ter auxiliado no desenvolvimento bacteriano.

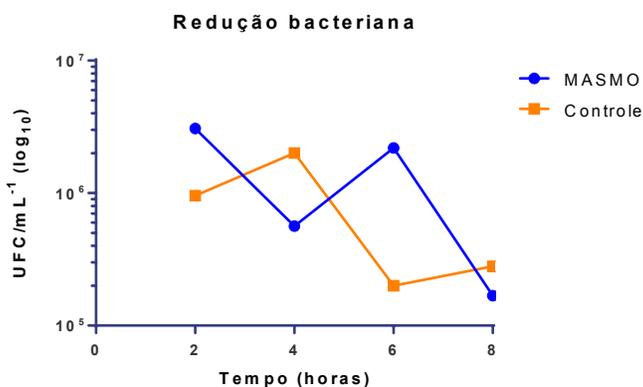


Figura 6: Variação em unidades formadoras de colônias de *E. coli* após tratamento com MASMO. Controle e tratamento (MASMO) estão representados respectivamente em laranja e azul.

Considerando o fenômeno de sedimentação após 8h de MASMO houve redução de 90% de *E. coli*, PCV-2 e HAdV-2. Explica-se que com a precipitação de MASMO ao longo na coluna de efluente houve uma maior sedimentação viral ou sua inativação, comprovando assim o efeito agregativo ou inativatório em relação aos controles não tratados com MASMO e igualmente sedimentados.

Essa possível atração deve-se a capacidade adsorptiva de patógenos às membranas que podem desempenhar um importante papel como biofiltros, como foi demonstrado por Xiong *et al.* (2017) a qual aumentou significativamente a eficácia a retenção de impurezas d'água após a adição de sementes de *M. oleífera* em filtros de areia. Assim como Francisco *et al.* (2014), a qual aumentou a eficiência de biofiltros compostos orgânicos

como carvão e folhas de eucalipto e bambu, após a adição do extrato do interior da semente de *M. oleifera*. Ao invés do extrato do interior da semente, a qual é comumente utilizado para aumentar capacidades de retenção de partículas em suspensão, MASMO poderia ser possivelmente utilizado como aditivo em diferentes tipos de filtros, utilizando tal material que seria normalmente descartado.

Em suma, com o aumento de 2,5 vezes do número total de suínos entre 1960 e 2010 (FAO, 2019) e com a perspectiva da população mundial de alcançar 9,6 bilhões de indivíduos em 2050 (UN, 2013), demandando proteína para fonte nutricional, bem como produção de grãos, cada vez mais o aspecto sanitário e epidemiológico se torna necessário na reciclagem de efluentes animais. Nisso, tratamentos adicionais acessíveis para uma própria eliminação de vírus e bactérias presentes no sistema de digestão anaeróbia, são de grande interesse.

Neste contexto, resíduos de sementes de *M. oleifera* como aqui estudado (resíduos da semente - membrana alada) podem ser de grande utilidade, por se tratar de um recurso barato, biodegradável, comumente descartado e a qual apresenta capacidade na redução de patógenos virais e bacterianos.

4 | CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram o potencial do uso de membranas aladas de cascas de sementes de *M. oleifera* seguido de sedimentação (membranas usualmente descartadas na produção de alimentos e medicamentos), alcançando a redução de patógenos bacterianos e virais em efluentes da suinocultura, visando melhorias para fins de biofertilização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento pelas bolsas disponibilizadas aos autores: CNPq (Estêvão Brasiliense de Souza), CAPES/PNPD (Doris Sobral Marques Souza), CAPES (Paula Rogovski) e FAPESC (Rafael Dorighello Cadamuro; Termo de Outorga: 2020TR715), bem como ao Projeto Extensionista (Sigpex-UFSC: 201917940) do Laboratório de Virologia Aplicada-MIP-CCB-UFSC.

REFERÊNCIAS

ACHESON, D. et al. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 15 abr. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/319760>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Atlas esgotos**: despoluição de bacias hidrográficas. Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Brasília: ANA, 2017a. 88 p.

AKIN, E.W., et al (1971). Enteric viruses in ground and surface waters: a view of their occurrence and survival. In: *Water Quality: Occurrence and Control, Thirteenth Water Quality Conference Proceeding*, University of Illinois, Urbana-Champaign, pp. 59–74

AL-BADALI F, SHUHAIMI-OTHMAN M (2015) Water pollution and its impact on the prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* and total coliform bacteria: a study of the Semenyih River, Peninsular Malaysia. *Water Qual Exp Health* 7:319–330

AL-ANIZI, Ali Adnan et al. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. **Water Research**, [S.L.], v. 56, p. 77-87, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.045>.

AMARAL, André C. do et al. Swine effluent treatment using anaerobic digestion at different loading rates. **Engenharia Agrícola**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 567-576, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69162014000300019>.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. “**Proibidos alimentos com Moringa oleifera**” **Resolução RE 1.478/2019**, de 4 de maio de 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/proibidos-alimentos-com-moringa-oleifera/219201?p_p_auth=VVlavxiK&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DVLavxiK%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3D_118_INSTANCE_KzfwbqagUNdE__column-2%26p_p_col_count%3D2> Acessado em: 20 julh. 2019.

APPELS, Lise et al. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress In Energy And Combustion Science**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 755-781, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>.

AUER, Agathe et al. Agricultural anaerobic digestion power plants in Ireland and Germany: policy and practice. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 97, n. 3, p. 719-723, 28 set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8005>.

BAPTISTA, Aline Takaoka Alves et al. Protein fractionation of seeds of *Moringa oleifera* lam and its application in superficial water treatment. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 180, p.114-124, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.02.040>

BARAKAT, Hassan et al. Physicochemical Properties of *Moringa oleifera* Seeds and Their Edible Oil Cultivated at Different Regions in Egypt. **Food And Nutrition Sciences**, [S.L.], v. 07, n. 06, p. 472-484, 2016. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.76049>.

BELLI FILHO, P. Stockage et odeurs des dejections animales cas du lisier de porc. Tese (Doutorado). Universidade de Rennes I. France. 181 p, 1995

BHUPTAWAT, Hitendra et al. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 142, n. 1-2, p. 477-482, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.044>.

BIDAWID, S., et al. "Norovirus Cross-Contamination during Food Handling and Interruption of Virus Transfer by Hand Antisepsis: Experiments with Feline Calicivirus as a Surrogate†". *Journal of Food Protection*, vol. 67, nº 1, janeiro de 2004, p. 103–09. DOI.org (Crossref), doi:10.4315/0362-028X-67.1.103.

BOSCH, A., GUIX, S., SANO, D., & PINTÓ, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano. 2006. Disponível em:<http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/diretriz_nacional_plano_amostragem_agua.pdf> Acessado em 20 julh. 2019.

BUKOWSKI, E. *Houston Chronicle*. 1986.

CHASNYYK, O. et al. Historical, technical and economic aspects of biogas development: case of poland and ukraine. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 52, p. 227-239, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.122>.

CHATTOPADHYAY, Sandip et al. Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil. **Chemosphere**, [S.L.], v. 41, n. 8, p. 1279-1286, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(99\)00519-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(99)00519-6).

CHATURVEDI U.C. Shrivastava R. Upreti R.K. (2004) Viral infections and trace metals: a complex interaction. *Curr. Sci*. 87.

CHOLLOM S. C. "Investigation of aqueous extract of Moringa oleifera lam seed for antiviral activity against newcastle disease virus in ovo". *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, nº 22, junho de 2012. DOI.org (Crossref), doi:10.5897/JMPR12.394.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 822-880, 1 out. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00022-13>.

DELELEGN, A., Sahile, S. & Husen, A. Water purification and antibacterial efficacy of Moringa oleifera Lam. *Agric & Food Secur* 7, 25 (2018) doi:10.1186/s40066-018-0177-1

EGGESBØ, Merete et al. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. **Apmis**, [S.L.], v. 119, n. 1, p. 17-35, 25 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02688.x>.

FAO. FAO Statistical Database. 2009. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/>> Acessado em 20 julh. 2019.

FERREIRA, Douglisnilson de Moraes et al. WASTEWATER USE IN AGRICULTURE: ANALYTICAL LIMITS OF SEWAGE FOR IMPACT CONTROL IN BRAZIL. **Revista Caatinga**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1048-1059, dez. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252019v32n421rc>.

FONGARO, G. et al. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 24, p.20060-20066, 25 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5196-x>.

FONGARO, G. et al. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 479-480, p. 277-283, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.004>.

FONGARO, G. Higienização de dejetos suínos visando reciclo agrícola sanitariamente seguro. 2016. Tese. (Doutorado em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2016.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2019 Disponível em:<<http://www.fao.org/traditional-crops/moringa/en/>> Acessado em 20 julh. 2019.

FRANCISCO, João P. *et al.* Evaluation of the effect of the seed extract of Moringa oleifera Lam over the efficiency of organic filters in wastewater treatment of dairy cattle breeding. **Engenharia Agrícola**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 143-152, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69162014000100015>.

GARCÍA, Nerea et al. Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 20-24, 28 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02990>.

GARCIA-FAYOS, B. et al. Use of Moringa oleifera in drinking water treatment: study of storage conditions and performance of the coagulant extract. **Desalination And Water Treatment**, [s.l.], v. 57, n. 48-49, p.23365-23371, 23 nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2015.117820>.

GIÁCOMAN-VALLEJOS, G. et al. Pathogen removal from domestic and swine wastewater by experimental constructed wetlands. **Water Science And Technology**, [S.L.], v. 71, n. 8, p. 1263-1270, 4 mar. 2015. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2015.102>.

GIBSON, Kristen E. et al. Detection of Bacterial Indicators and Human and Bovine Enteric Viruses in Surface Water and Groundwater Sources Potentially Impacted by Animal and Human Wastes in Lower Yakima Valley, Washington. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 355-362, 12 nov. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01407-10>.

GIGLIO, Osvalda de et al. Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.558-700, 24 maio 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14060558>.

GIRONES, Rosina et al. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, [s.l.], v. 44, n. 15, p.4325-4339, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>.

GONÇALVES JUNIOR, Affonso C. *et al.* Applicability of Moringa oleifera Lam. pie as an adsorbent for removal of heavy metals from waters. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 94-99, jan. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-43662013000100013>.

GUO, J. et al. Zinc Finger Structures in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Facilitate Efficient Minus- and Plus-Strand Transfer. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 74, n. 19, p.8980-8988, 1 out. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.19.8980-8988.2000>.

GUAN, Tat Yee et al. Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-A Review. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 383-392, mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2003.3830>.

GRAHAM, D. Y. et al. Minimal infective dose of rotavirus. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 92, n. 3-4, p. 261-271, set. 1987. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01317483>.

HERNROTH, Bodil E. *et al.* Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the first scandinavian report. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 9, p. 4523-4533, set. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.9.4523-4533.2002>.

HESPANHOL, Ivanildo. Potencial de Reuso de Água no Brasil Agricultura, Industria, Municípios, Recarga de Aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.75-95, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.21168/rbrh.v7n4.p75-95>.

HOA, Nguyen Thanh; HUE, Cao Thi. Enhanced water treatment by *Moringa oleifera* seeds extract as the bio-coagulant: role of the extraction method. **Journal Of Water Supply: Research and Technology-Aqua**, [s.l.], p.634-647, 19 set. 2018. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/aqua.2018.070>.

HUNDESA, A. et al. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 158, n. 1-2, p. 130-135, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.006>.

HUSMAN, A.M. de Roda et al. Quantitative risk assessment for food- and waterborne viruses. **Viruses In Food And Water**, [S.L.], p. 159-175, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857098870.2.159>.

JILANI, Nishat et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 676-682, 18 abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04913.x>.

JINGURA, Raphael M. et al. Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1116-1120, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2007.06.015>.

JOTHIKUMAR, Narayanan *et al.* A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 65-71, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>.

KAVITHA, Chokkalingam et al. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 64, n. 7-8, p. 681-687, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.01.001>.

KHAN, M.A. et al. Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 214, p. 816-825, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.013>.

KLOUS, Gijs et al. Human–livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. **One Health**, [S.L.], v. 2, p. 65-76, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.03.001>.

Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), 2013. *Fields Virology*, 6 th. ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia.

KUNZ, A. et al, 2005. Biodigestor para o tratamento de dejetos de suínos: influência da temperatura ambiente. Comunicado Técnico, Embrapa/CNPISA, vol. 416, pp. 1–5.

KUNZ, A. et al. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 100, n. 22, p. 5485-5489, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.039>.

LANATA, Claudio F. et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children: a systematic review. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-13, 4 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>.

LOPMAN, Ben A. et al. Epidemiology and Cost of Nosocomial Gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1827-1834, out. 2004. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1010.030941>.

MADRONA, Grasielle Scaramal et al. Evaluation of extracts of *Moringa oleifera* Lam seeds obtained with NaCl and their effects on water treatment. **Acta Scientiarum. Technology**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 1-5, 28 maio 2012. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitech.2012.v34i3.9605>.

YEGAMBARAM, Manivannan *et al.* Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: a review. **Current Alzheimer Research**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 116-146, 24 fev. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1567205012666150204121719>.

MATIC, Ivana et al. Investigation of medicinal plants traditionally used as dietary supplements: a review on *Moringa oleifera*. **Journal Of Public Health In Africa**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.1-20, 21 dez. 2018. PAGEPress Publications.

MATILAINEN, A. et al. Comparison of the Efficiency of Aluminium and Ferric Sulphate in the Removal of Natural Organic Matter During Drinking Water Treatment Process. **Environmental Technology**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 867-876, ago. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09593332608618502>.

MENG, Xiang-jin. Zoonotic and Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 33, n. 01, p.041-049, 5 abr. 2013. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1338113>.

NDABIGENGESERE, Anselme, et al. "Active Agents and Mechanism of Coagulation of Turbid Waters Using *Moringa Oleifera*". *Water Research*, vol. 29, nº 2, fevereiro de 1995, p. 703–10. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/0043-1354(94)00161-Y.

NGUYEN, Nhung Thi Hong, et al. Influence of Three Soil Types in Okinawa, Japan and N, P, K Fertilizations on Growth, Yield, and Oxyphinatanine Concentration of *Hemerocallis Fulva* L. Var. *Sempervirens*. Japanese Society for Tropical Agriculture, 2016. DOI.org (CSL JSON), <https://doi.org/10.11248/jsta.60.109>.

NOUHI, Shirin et al. Comparative study of flocculation and adsorption behaviour of water treatment proteins from *Moringa peregrina* and *Moringa oleifera* seeds. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 45-111, 29 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54069-2>.

OGORZALY, Leslie, et al. "Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 24, dezembro de 2010, p. 8019–25. DOI.org (Crossref), doi:10.1128/AEM.00917-10.

OLIVEIRA, P. et al. Geração e utilização do biogás em unidades de produção de suínos. Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA II; Projeto de Controle da Degradação Ambiental Decorrente da Suinocultura em Santa Catarina. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, p. 41, 2006

OPRIESSNIG, T. et al. Effect of Vaccination with Selective Bacterins on Conventional Pigs Infected with Type 2 Porcine Circovirus. **Veterinary Pathology**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 521-529, set. 2003. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1354/vp.40-5-521>.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 591-615, nov. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870701900601>.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus Research**, [S.L.], v. 286, p. 198044, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198044>.

PALHARES, Júlio César Pascale et al. Pegada hídrica dos suínos abatidos nos Estados da Região Centro-Sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 1-6, 8 jun. 2011. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i3.9924>.

PESARO, F. et al. In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl Environ Microbiol* 61(1):92–97. 1995.

Raphael, Roderick A., et al. "Long-Term Survival of Human Rotavirus in Raw and Treated River Water". *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 31, n° 2, fevereiro de 1985, p. 124–28. DOI.org (Crossref), doi:10.1139/m85-024.

REIN, David B. et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. **Hepatology**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 988-997, 27 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.25505>.

REIS, Deyse Almeida dos et al. The Relationship Between Human Adenovirus and Metals and Semimetals in the Waters of the Rio Doce, Brazil. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.144-153, 11 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-019-00625-w>.

ROSE, Nicolas et al. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, [S.L.], v. 164, n. 1-2, p. 78-89, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.002>.

RUPPACH, H. Log10 Reduction Factors in Viral Clearance Studies, *BioProcess. J.*, **12(4)**, 24–30 [Online] <https://www.bioprocessingjournal.com/> (7 January 2014)

- RZEŠUTKA, Artur et al. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 441-453, out. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.02.001>.
- SÁNCHEZ, Gloria et al. Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. **Viruses In Foods**, [S.L.], p. 367-392, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_13.
- SATTAR, S.A. et al (1981) Virus survival in receiving waters. In: *Viruses and Wastewater Treatment* (Goddard, M., Burler, M., Eds.), pp.91–108 Pergamon Press, New York.
- SCALLAN, Elaine et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 16-22, jan. 2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.p21101>.
- SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 24 jul. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICROS E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. Irrigação e uso racional da água no campo. 2014. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/irrigacao-e-uso-racional-da-agua-no-campo/>. Acesso em: 18 fev. 2016.
- SIDHU, J. P. S. et al. Pathogen Decay during Managed Aquifer Recharge at Four Sites with Different Geochemical Characteristics and Recharge Water Sources. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 1402-1412, set. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2015.03.0118>.
- SOUZA, Doris Sobral Marques et al. Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018–2019. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 2045, 21 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8122045>.
- STROMBERG, Zachary R. et al. Pathogenic and non-pathogenic Escherichia coli colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. **Disease Models & Mechanisms**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-13, 1 nov. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.035063>.
- Sutherland JP, Folkard G, Grant WD. Natural coagulants for appropriate water treatment: a novel approach. *Waterlines*. 1990;8:30–2. <https://doi.org/10.3362/0262-8104.1990.020>
- THAPALIYA, Dipendra et al. Zoonotic Diseases of Swine: food-borne and occupational aspects of infection. **Zoonoses - Infections Affecting Humans And Animals**, [S.L.], p. 23-68, 9 dez. 2014. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2_2.
- THACKER, Eileen L. et al. Immunology of the Porcine Respiratory Disease Complex. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 551-565, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30006-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30006-2).
- TRETER, Janine et al. Washing-resistant surfactant coated surface is able to inhibit pathogenic bacteria adhesion. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 303, p. 147-154, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.123>.

UN, 2012. World Population Prospects, the 2012 Revision. Disponível em:<<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html>> Acessado em 5 agosto de 2019.

VELHO, Viviane F et al. The viability of treated piggery wastewater for reuse in agricultural irrigation. **International Journal Of Recycling Of Organic Waste In Agriculture**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 10, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2251-7715-1-10>.

VIANCELLI, Aline et al. A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 43, n. 12, p. 2117-2129, 17 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02410-9>.

VIANCELLI, A. et al. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.538-543, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.022>.

VIANCELLI, A. et al. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. **Chemosphere**, [S.L.], v. 90, n. 4, p. 1539-1544, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.055>.

VLASOVA, Anastasia et al. Porcine Rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies. **Viruses**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 48, 18 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9030048>.

WEBER, Kela et al. Pathogen removal in constructed wetlands. 2008.

WEN, Xiaotong et al. Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality—A Review. **Sustainability**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 2249, 13 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su12062249>.

WHO. Guideline for drinking water quality incorporation first addendum. Vol.1, Recommendations 3rd ed. 2006.

WHO, 2011. Hepatitis E [WWW Document]. World Heal. Organ. URL www.who.int (acessado em 4.27.20).

XIONG, Boya *et al.* Moringa oleifera f-sand Filters for Sustainable Water Purification. **Environmental Science & Technology Letters**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 38-42, 28 nov. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00490>.

ZHANG, Di et al. Impacts of Small-Scale Industrialized Swine Farming on Local Soil, Water and Crop Qualities in a Hilly Red Soil Region of Subtropical China. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 1524, 6 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14121524>.

ZENG, S.-Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 153, n. 2, p. 238-240, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004>.

DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA A TRIAGEM DE NANOFÁRMACOS UTILIZANDO COMO MODELO ESFEROIDES CELULARES

Data de aceite: 01/07/2021

João Pedro Dantas Ferreira

Programa de graduação em Nanotecnologia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ), Duque de Caxias, RJ, Brasil.

Gabriel Vieira de Oliveira

Programa de graduação em Nanotecnologia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ), Cidade Universitária, RJ, Brasil.

Letícia Emiliano Charelli

Programa de Engenharia de Nanotecnologia
(PENT), Instituto Alberto Luiz Coimbra de
pós graduação e pesquisa em engenharia
(COPPE), Universidade Federal do Rio de
Janeiro, RJ, Brasil.
Laboratório de nano e microfluídica e
microsistemas (LabMEMS)

Tiago Albertini Balbino

Programa de Engenharia de Nanotecnologia
(PENT), Instituto Alberto Luiz Coimbra de
pós graduação e pesquisa em engenharia
(COPPE), Universidade Federal do Rio de
Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO: Desenvolver sistemas microfisiológicos é indispensável para melhorar a previsibilidade e acurácia no desenvolvimento de fármacos. Dispositivos microfluídicos podem integrar cultivos celulares 3D, a fim de criar microambientes fisiologicamente relevantes que podem ser utilizados como modelos *in vitro*

avancados para estudos biológicos. No presente trabalho, um estudo *in silico* foi conduzido para criar uma plataforma microfluídica capaz de gerar gradientes de concentração para triagem de medicamentos, especialmente nanofármacos. Esta plataforma contém uma região de geração de gradiente de concentração e uma de cultivo celular. A primeira região foi desenvolvida com uma rede de microcanais em formato de “árvore de natal”, tal que dois compostos dos canais de entrada gradualmente se difundem um no outro por meio de bifurcações sucessivas. Esta região é sucedida por cinco microcâmaras, onde os esferoides celulares serão localizados. Dentro desta plataforma, é possível testar diversos compostos diretamente em esferoides teciduais. Simulações numéricas foram obtidas utilizando o software Comsol Multiphysics. Os resultados obtidos foram capazes de descrever perfis de velocidade, pressão e concentração dentro do dispositivo. A magnitude da velocidade de fluxo apresentou maior intensidade no início dos microcanais, seguida por gradual redução. O processo de mistura provocado pela advecção caótica nos micromisturadores apresentou-se suficiente para misturar dois compostos, apesar da mudança no valor de Re . Foi demonstrado que o dispositivo gera concentrações com valores definidos iguais a 0, 0.20, 0.50, 0.76 e 1 mol/m³. Portanto, a plataforma proposta pode ser utilizada para o aperfeiçoamento da descoberta de medicamentos. Os próximos experimentos visam explorar a geometria microfluídica apresentada neste projeto em ensaios biológicos, a fim de avaliar a interação de diferentes sistemas de entrega de fármacos

nanoestruturados associados a esferoides celulares para aplicações biomédicas *in vitro*.

PALAVRAS - CHAVE: Modelagem computacional; órgão-on-chip; Nanobiotecnologia; Cultivo celular 3D, esferoides celulares.

IN SILICO DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC DEVICES FOR NANOMEDICINE SCREENINGS USING CELLULAR SPHEROIDS AS MODELS

ABSTRACT: To engineer biochip platforms is mandatory to enhance the predictability and accuracy in drug development. Microfluidic devices can be integrated into 3D cell cultures to create physiological relevant microenvironments that can be used as advanced *in vitro* models for efficient biological cell studies. In the present work, an *in silico* study was conducted to create a microfluidic platform capable of generating concentration gradients for the screening of new drugs, specially nanopharmaceuticals. This platform contains two main regions: the first one generates concentration gradients, whilst the second region allocates tissue spheroids. The first region is designed with a tree-shaped microchannel network, where two compounds from the inlet channels gradually diffuse into each other through bifurcation channels. This region is then followed by five microchambers on which the tissue spheroids are located. Within this platform, one is able to test several compounds directly into tissue spheroids. The numerical simulations were obtained using the software Comsol Multiphysics. The results obtained were capable of describing the velocity, pressure and concentration profiles inside the microfluidic device. The flow velocity magnitude showed higher intensity in the beginning of the microchannel, followed by gradual decrease. The mixing process caused by chaotic advection in the micromixers showed to be suitable to mix the two compounds, despite the change in Re . It was shown that the device generates mixtures with defined values equal to 0, 0.2, 0.5, 0.76 and 1 mol/m³. Therefore, the proposed platform may be used for the improvement of drug discovery. The next experiments aim to explore the microfluidic geometry presented herein in biological assays to evaluate the interactions of different nanostructured drug delivery systems with cell spheroids for *in vitro* biomedical applicabilities.

KEYWORDS: Computational modeling; Organ-on-chip; Bionanotechnology; 3D cell culture; Cellular spheroids.

1 | INTRODUÇÃO

A predição de possíveis efeitos tóxicos, antes dos testes clínicos em humanos, está no cerne dos processos de rastreamento e descoberta de novos medicamentos. No entanto, essa previsibilidade tem sido limitada devido ao baixo mimetismo que os sistemas de cultivo tradicionais em monocamada e os modelos animais representam. A toxicidade cardíaca e a hepática, por exemplo, são as principais causas de retirada de medicamentos após a aprovação para comercialização (Kim et al., 2012). Dados mostram que, até 20% das lesões renais agudas adquiridas após internações hospitalares são atribuídas à nefrotoxicidade induzida por drogas, que não foram previstas através dos modelos pré-clínicos (Kim et al., 2012).

Com isso, metodologias alternativas - mais preditivas e acuradas - são necessárias

e estão sendo adotadas internacionalmente (Tang et al., 2020; Yu et al., 2018). Sistemas microfisiológicos, ou *organ-on-chip*, são dispositivos compostos por canais microfluídicos onde é possível a manipulação precisa e repetível de líquidos em escala micro ou nano. Uma das grandes vantagens destes sistemas é a possibilidade de replicar o microambiente celular, promovendo estímulos biomecânicos às células (Yu et al., 2018). Nesta abordagem, é possível mimetizar as interfaces entre o tecido e processos físico-químicos, assim como a perfusão sanguínea, sendo um ótimo modelo para ensaios de distribuição de drogas e as respostas específicas que estes desencadeariam em um ou mais tecidos. Esses dispositivos podem fornecer informações-chave sobre a função normal do órgão humano e a fisiopatologia da doença, bem como prever, com mais precisão, a segurança e a eficácia dos medicamentos em fase pré-clínica (Tang et al., 2020).

Enquanto os sistemas microfisiológicos são capazes de melhor mimetizar o microambiente das células, os esferoides celulares - que são um modelo de cultivo 3D - possuem a capacidade de melhor mimetizar os micro tecidos humanos (Laschke e Menger, 2016). Esferoides celulares são compostos por um agregado de células que se auto organizam e se compactam em um processo natural, através de ligações entre célula-célula e célula-matriz extracelular (Laschke e Menger, 2016). Devido a sua arquitetura 3D, os esferoides celulares exibem propriedades biológicas mais similares com as encontradas nos tecidos *in vivo*, quando comparado com o cultivo bidimensional (2D) (Laschke e Menger, 2016). Dentre estas estão; maior viabilidade celular, aumento da atividade metabólica e de secreção, e dinâmica de citoesqueleto mais real (o que influencia diretamente na regulação e expressão gênica) (Laschke e Menger, 2016).

Dessa forma, a combinação entre os sistemas microfisiológicos e os esferoides celulares é vantajosa porque une o melhor das duas tecnologias: Um modelo de cultivo fisiologicamente relevante, associado a uma plataforma microfluidica capaz de replicar e monitorar o microambiente celular em tempo real. E, por isso, essa abordagem tem sido amplamente considerada como modelos *in vitro* fisiologicamente mais relevantes (Tang et al., 2020).

Por serem modelos mais representativos, estes podem ser utilizados em diversas áreas, como no desenvolvimento de novos fármacos, na modelagem de doenças, na medicina personalizada, na biologia do desenvolvimento, assim como em áreas de fronteira, como a nanomedicina (Tang et al., 2020). A nanomedicina é um ramo da medicina que aplica os conceitos e ferramentas da nanotecnologia para prevenir/tratar doenças. A nanomedicina envolve o uso de materiais nanoestruturados tais como; nanopartículas metálicas, poliméricas, a base de carbono para fins de diagnóstico, entrega, detecção ou atuação em um organismo vivo (Jahangirian et al., 2017).

A nanomedicina tem ganhado grande destaque, principalmente no campo da oncologia, devido às propriedades aprimoradas que os nanomateriais possuem quando comparados com a sua versão em macroescala (Martin et al., 2020). Os nanofármacos

apresentam maior área de superfície a qual pode interagir de forma mais biocompatível e mais específica com o órgão-alvo. Ademais, eles podem ser sintetizados, funcionalizados e dopados para que o sistema imune não os encontre, aumentando assim o seu tempo de circulação na corrente sanguínea (Martin et al., 2020). Uma outra qualidade, muito relevante, é a capacidade desses nanofármacos de carrear princípios ativos que são tóxicos e/ou hidrofóbicos. Estes nanossistemas podem carrear-los até o sítio-alvo, de forma específica e com maior eficiência, do que os medicamentos em escala macro, reduzindo assim os efeitos colaterais (Martin et al., 2020).

No entanto, duas das grandes limitações encontradas atualmente consistem em termos modelos *in vitro* miméticos o suficiente para entendermos as possíveis implicações de se administrar um nanofármaco, assim como testes *in silico* que possam prever o comportamento destas nanopartículas antes mesmo delas serem sintetizadas e testadas experimentalmente. Realizar a análise prévia, *in silico*, permite ao pesquisador antever possíveis comportamentos do nanossistema que está sendo considerado como nanofármaco (Stillman et al., 2020). Ademais, utilizar esta abordagem como etapa anterior as análises experimentais, culmina na redução de gastos e tempo, uma vez que haverá uma triagem inicial dos melhores parâmetros para que então a etapa experimental possa suceder (Stillman et al., 2020).

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal a avaliação *in silico* de um dispositivo microfluídico composto de duas regiões principais: Um micromisturador e câmaras para cultivo, monitoramento e análise de esferoides celulares. Este dispositivo está sendo desenvolvido para atuar como uma plataforma de avaliação *in vitro* de nanomedicamentos. A pré-validação *in silico* é um passo fundamental para melhor direcionar os pesquisadores antes de entrarem nas próximas fases de avaliação, poupando-os tempo e recursos.

2 | METODOLOGIA

A geometria do dispositivo microfluídico foi desenvolvida no software Adobe Illustrator® e, posteriormente, exportada para o software Comsol Multiphysics®, a fim de se estudar a fluidodinâmica do dispositivo a partir de simulações numéricas. A geometria contém duas regiões principais: uma de gradiente de concentração e outra de cultivo celular. A primeira região é composta por uma rede de canais que sofrem sucessivas separações e recombinações, baseado em um modelo “árvore de natal” (Figura 1-a). Deste modo, esta região permite a introdução e o escoamento de dois compostos, assim como a difusão gradual de um fluido sobre o outro dentro de canais em zigue-zague, gerando um gradiente de concentração ao longo do dispositivo microfluídico.

O regime de escoamento dentro do dispositivo microfluídico é laminar, ou seja, as linhas de fluxo referentes ao escoamento tendem a permanecer paralelas entre si. O

processo de mistura sob essas condições, portanto, depende fortemente do processo de difusão molecular, em que a mistura entre fluidos ocorre de forma mais lenta. Um modo de se promover a melhoria do processo de mistura ainda em um regime laminar é a introdução de zonas de advecção caótica e recirculação dentro do dispositivo. Estas regiões permitem a manipulação das linhas de fluxo do escoamento, reduzindo o seu caráter paralelo e, por consequência, otimizando o processo de mistura. Os micromisturadores são os responsáveis pela promoção destas regiões dentro do dispositivo microfluídico, a partir de seguidas expansões, contrações e mudanças de direção repentina de seus canais. Cada micromisturador possui um total de 10 voltas, a fim de se garantir um processo de mistura e a geração de um gradiente de concentração de forma rápida e eficiente (Figura 1-b).

Após o término do processo de mistura, os fluidos são direcionados à região de cultivo celular, composta por 5 canais de saída contendo microcâmaras em triplicatas (Figura 1-c), responsáveis por alocar os esferoides celulares. A geometria do dispositivo foi projetada para que cada canal de saída receba uma concentração diferente do fármaco em estudo. É possível, portanto, analisar de forma simultânea os efeitos dos nanofármacos em diversas concentrações sobre os esferoides celulares. O dispositivo possui dimensões totais iguais a 27,5 mm, 14,1 mm e 0,6 mm, referentes ao seu comprimento, largura e altura, respectivamente. Os canais principais possuem 0,15 mm de largura, enquanto que os canais referentes aos micromisturadores sofrem expansão a cada volta do zigue-zague, apresentando largura máxima de 0,25 mm.

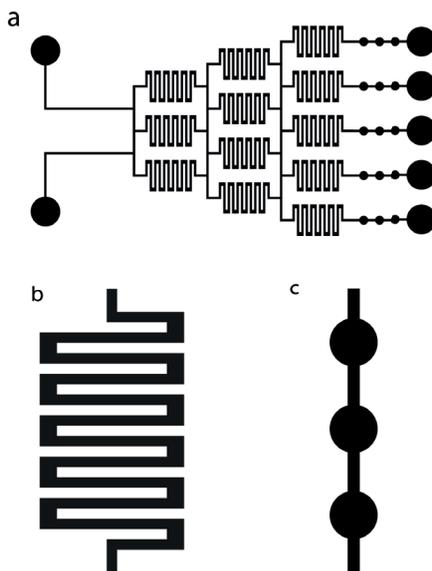


Figura 1. Geometria desenvolvida para o dispositivo microfluídico. (a) Geometria completa. Toda a estrutura pode ser dividida na região de geração de gradiente de concentração, constituída pelas duas entradas e os canais de misturas centrais, e na região de cultivo celular, constituída pelas 5 microcâmaras em triplicatas ao final do dispositivo. (b) Geometria do micromisturador. Local onde é realizado o encontro de dois compostos diferentes e sua posterior mistura. (c) Geometria para as microcâmaras. Local onde será depositado esferoides celulares para estudos biológicos.

A fim de discretizar o modelo, o software COMSOL Multiphysics® utiliza técnicas numéricas que variam de acordo com a situação física em questão. Os métodos de discretização são baseados em elementos finitos, uma técnica que dá soluções aproximadas para equações diferenciais as quais modelam problemas físicos e de engenharia. Esse método consiste na subdivisão de um sistema grande em outros menores e mais simples por meio da criação de malhas com os tipos de elementos que sejam apropriados para o problema em questão. O algoritmo pode usar uma malha livre ou combinações de diferentes malhas, de acordo com a necessidade de obter resultados mais rápidos e precisos. É possível também fazer o refinamento dessa mesma malha para obter uma maior precisão.

Para estudos de dinâmica dos fluidos, o software precisa solucionar as equações de Navier-Stokes, que são equações diferenciais responsáveis por descrever o escoamento de fluidos. Por meio dessas equações, é possível determinar os campos de velocidade e de pressão no escoamento em questão. Elas estabelecem relações entre as taxas de variação ou fluxo tanto de velocidade quanto de pressão. Para um escoamento laminar, a equação de Navier-Stokes e a equação de continuidade, sendo esta última correspondente à conservação de massa, são dadas respectivamente por:

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} + \rho(v \cdot \nabla)v - \eta \nabla^2 v + \nabla p = 0$$

$$\nabla \cdot v = 0$$

Onde v , p , ρ e η correspondem respectivamente ao vetor velocidade, à pressão, densidade do fluido e viscosidade dinâmica (Baccar; Kieffer; Charcosset, 2009).

Além disso, foi utilizada a equação de convecção-difusão:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \cdot \nabla C = \nabla \cdot (D \nabla C)$$

Onde D representa o coeficiente de difusão e C representa a concentração (Baccar; Kieffer; Charcosset, 2009).

A realização de simulações numéricas possuem como objetivo estudar a dinâmica de escoamento do fluido, compreender o seu comportamento dentro do dispositivo microfluídico e, por fim, possibilitar avaliações sobre os parâmetros referentes a sua geometria. Para a realização deste estudo, definiram-se condições de contorno, sendo estas:

1. O fluido foi definido como incompressível;
2. A influência da gravidade sobre o sistema foi desconsiderada;
3. Aplicação da condição “no-slip” sobre as paredes dos microcanais: garantia do perfil parabólico de escoamento do fluido;
4. Introdução do fluido no dispositivo sob regime estacionário e Re 1, 10 e 100;

5. Introdução de um composto com concentrações iguais a 1 mol/m^3 e 0 mol/m^3 nas entradas do dispositivo microfluídico.

Neste processo, a malha sobre o dispositivo foi definida manualmente. 320,876 elementos de domínio e 27,730 elementos de contorno foram gerados sobre toda a geometria, com tamanho máximo de 0.05 mm e mínimo de $2.8 \cdot 10^{-4}$ mm. Desta forma, a simulação é calculada com boa acurácia, apesar de uma maior demanda computacional.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de velocidade, pressão e concentração obtidos para Re 1, 10 e 100 não apresentaram distinção visual relevante; mantiveram, em sua maioria, a mesma forma, alterando-se apenas a escala dos valores obtidos. Portanto, serão exibidos apenas resultados referentes a Re 100. Os perfis de velocidade e pressão estão presentes na Figura 2. É possível perceber que a velocidade total de escoamento do fluido é decrescente ao longo do dispositivo microfluídico. Esta perda de velocidade tem origem na ramificação sucessiva do fluido ao longo dos canais, e na imposição de resistência hidrodinâmica promovida pela presença dos micromisturadores. Deste modo, a cada camada de bifurcações, o fluido sofre uma perda em sua velocidade de escoamento. Para Re 100, o fluido perde 25% de sua velocidade entre a primeira camada e a segunda. Entre a segunda camada e a terceira, a velocidade é reduzida em 19%. Após o processo de geração de gradiente, o fluido é entregue aos esferoides celulares com uma perda de velocidade de aproximadamente 40% de seu valor original, como visto na figura 3. Portanto, é necessário levar em conta a perda de velocidade ocorrida neste processo ao se definir a velocidade de escoamento imposta no início do dispositivo. A distribuição de pressão segue o mesmo padrão encontrado para o perfil da magnitude da velocidade. Ao início do canal, a pressão relativa exercida pelo bombeamento do fluido para dentro do sistema assume um valor máximo próximo a 100 Pascal. Ao final do dispositivo, a pressão relativa é zero, o que significa que o fluido sai do dispositivo microfluídico sob pressão atmosférica.

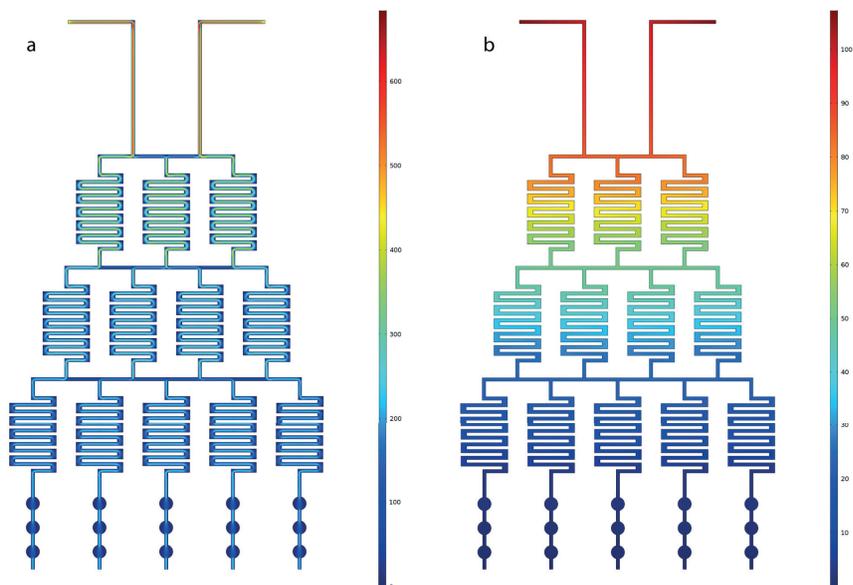


Figura 2. Perfis de velocidade e pressão para $Re = 100$ obtidos com as simulações numéricas. (a) Perfil de velocidade em $Re = 100$. A perda gradual de velocidade ao longo do dispositivo é evidenciada, devido a resistência hidrodinâmica e a ramificação do fluido. (b) O perfil reflete a pressão máxima no início do canal necessária para o escoamento do fluido, e sua gradual perda até o fim do dispositivo, por onde o fluido escoava sob pressão atmosférica.

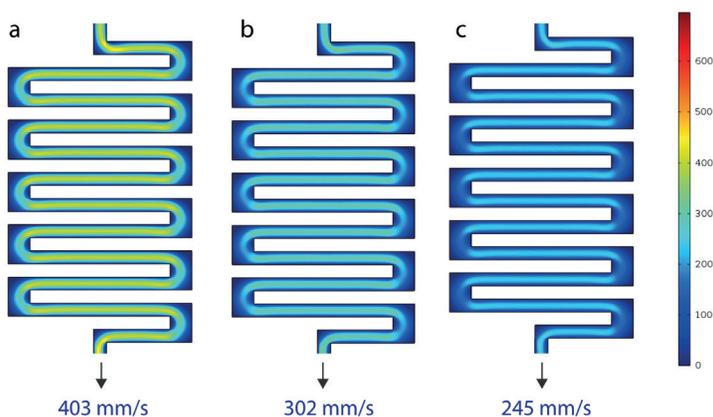


Figura 3. Redução na velocidade de escoamento nos micromisturadores ao longo do dispositivo. (a) Perfil de velocidade na primeira camada de micromisturadores. A velocidade máxima encontrada neste nível foi igual a 403 mm/s. (b) Perfil de velocidade na segunda camada de micromisturadores. Neste micromisturador, a velocidade máxima foi reduzida a 302 mm/s. (c) Perfil de velocidade na última camada de micromisturadores. A velocidade máxima sofreu nova redução, alcançando o valor de 245 mm/s.

O perfil de concentração dentro do micromisturador e suas linhas de fluxo para Re 1, 10 e 100 podem ser encontrados na Figura 4. Nota-se que para Re 1 e Re 10, as linhas de fluxo se mantêm majoritariamente paralelas entre si, tal que o processo de mistura entre os compostos depende da difusão molecular do nanofármaco e das expansões e contrações que os microcanais sofrem a cada volta do micromisturador. Em Re 10, apesar do aumento na magnitude da velocidade de escoamento, as linhas permanecem paralelas entre si. O que implica em uma redução da eficiência no processo de mistura, pois o fluido entra e sai mais rápido pelos micromisturadores, não havendo tempo o suficiente para que o processo de difusão molecular ocorra de forma ampla. Em Re 100, nota-se uma leve otimização da mistura ao final do micromisturador. Este resultado deve-se ao aparecimento de pequenas zonas de recirculação dentro dos microcanais, provocados pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido, como mostrado na figura 4-c. A presença destas condições em um regime laminar permite um aumento da instabilidade das linhas de fluxo, o que reduz o seu paralelismo e otimiza o processo de mistura. É esperado que estas condições de advecção caótica possuam intensidade maior conforme o valor de Re ou a complexidade da geometria também aumentem.

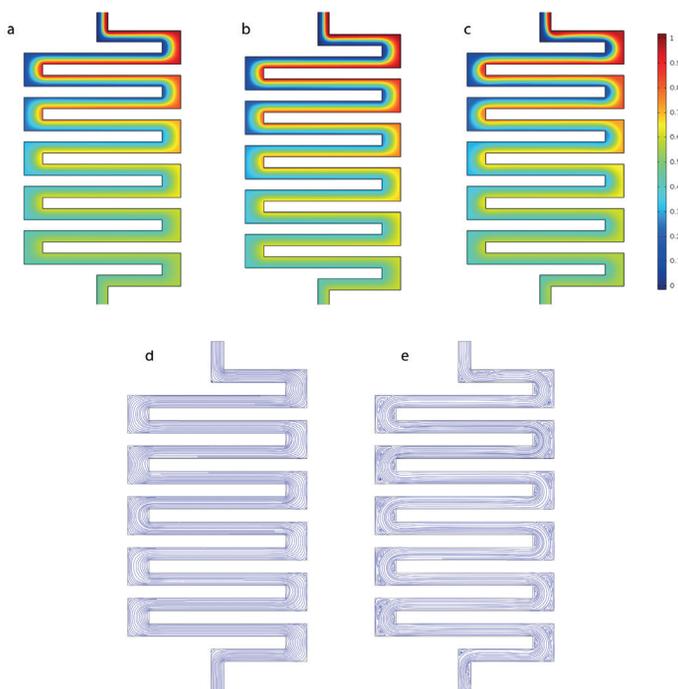


Figura 4. Comparação entre o processo de mistura e as linhas de fluxo sob Re = 1, 10 e 100. (a) Processo de mistura sob Re = 1. (b) Processo de mistura sob Re = 10. (c) Processo de mistura sob Re = 100. (d) Linhas de fluxo referentes a Re = 1 e 10. As linhas de fluxo são majoritariamente paralelas o que torna o processo de mistura lento. (e) Regiões de recirculação começam a aparecer no micromisturador, aumentando a eficiência do processo de mistura dos compostos.

O perfil de concentração para o dispositivo está apresentado na figura 5. Os valores de concentração obtidos ao final de cada saída do dispositivo foram iguais a 0, 0.20, 0.50, 0.76 e 1.00 mol/m³. Deste modo, a partir deste dispositivo será possível estudar a influência direta de um determinado nanofármaco sob esta faixa de concentrações em esferóides celulares. É possível ampliar a faixa de concentração aumentando-se também a complexidade do modelo “árvore de natal” presente na rede de microcanais, de forma que a introdução de mais regiões de bifurcações deverá resultar em uma maior uniformização dos valores de concentração ao final do dispositivo.

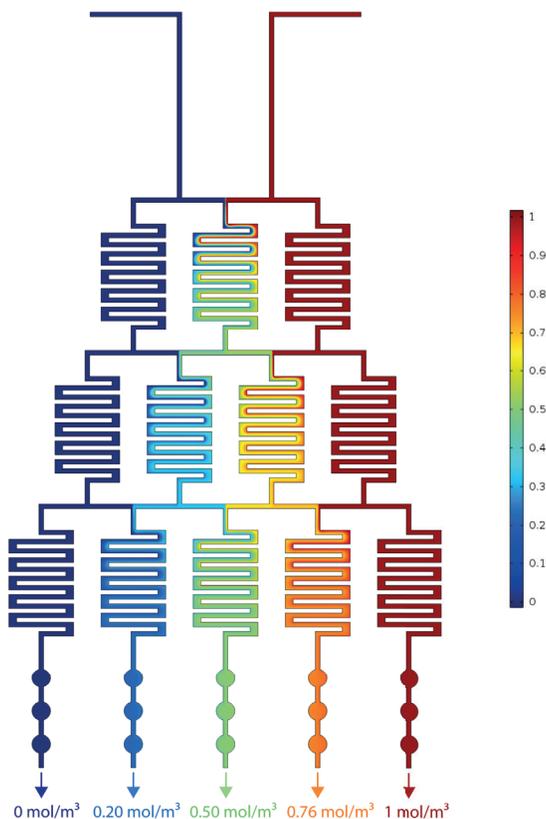


Figura 5. Perfil de concentração obtido sob $Re = 100$. Os valores referentes à distribuição de concentrações ao longo do dispositivo foram iguais a 0, 0.2, 0.5, 0.76 e 1 mol/m³.

Geometria desenvolvida nesta pesquisa é extremamente portátil e de fácil manuseio, devido às suas dimensões totais reduzidas. Esta característica permite que o dispositivo seja integrado a outros sistemas microfluídicos, tal que suas entradas ou saídas podem ser conectadas a outros dispositivos, constituindo sistemas analíticos completos (i.e., unidades modulares) (Stillman et al., 2020). Apesar de uma possível integração complexa com outras

plataformas microfluídicas, uma vantagem do dispositivo apresentado é a dispensabilidade de mão de obra especializada para a sua operação. Desta forma, o modo de operação torna-se acessível à maioria dos pesquisadores que já trabalham com cultivo celular *in vitro*. Somado à facilidade de operação do dispositivo, o seu tamanho reduzido permite que este seja transportado facilmente entre locais de pesquisa. O desenvolvimento de plataformas microfluídicas - simples e portáteis - é de grande importância para triagem de fármacos e aplicações biológicas, pois implica na redução de custos com materiais de fabricação, reagentes e mão de obra, um grande problema relativo às áreas citadas (Probst et al., 2018).

A complexidade dos micromisturadores e a quantidade de saídas do dispositivo microfluídico podem ser alteradas, de forma a aumentar a eficiência de todo o processo. Apesar de simples, a geometria atual dos micromisturadores impõe uma resistência hidrodinâmica que influencia de forma significativa o escoamento do fluido, de modo que 40% de sua velocidade é perdida entre o início e o final do dispositivo microfluídico. Dado este que implica em menor estresse mecânico de fluxo diretamente nos esferoides. A pressão necessária para o bombeamento do fluido no sistema também é afetada por este parâmetro, o que, dependendo da magnitude necessária para o escoamento, pode levar a pressões excessivas sobre o dispositivo. A geometria proposta necessita que estas características de escoamento sejam levadas em consideração, tal que o fluido deve ser inserido sempre com velocidade maior do que a calculada para um determinado estudo científico. Este aumento na velocidade, no entanto, nem sempre é possível, devido a limitações experimentais relativas ao equipamento ou ao material de construção do dispositivo. Esta perda impacta diretamente futuros ensaios biológicos, análises de mecanotransdução e estudos sobre a influência de nanofármacos sobre a superfície de esferoides celulares. Portanto, um novo processo de otimização pode ser realizado a fim de amenizar a resistência hidrodinâmica e a perda de velocidade ao longo dos canais.

4 | CONCLUSÃO

Foi possível o desenvolvimento *in silico* de uma plataforma microfluídica para o cultivo, análise e monitoramento de esferoides celulares. Os dados obtidos sugerem que a geometria está apta a diluir em diferentes concentrações os agentes farmacológicos, como os nanoterapêuticos. A análise prévia *in silico* permitirá ao pesquisador prever as melhores condições para que as etapas experimentais seguintes possam ser mais rápidas e mais eficazes. Ademais, o dispositivo desenvolvido é de fácil manuseio, com interface amigável e passível de ser acoplado em dispositivos microfluídicos já existentes.

O estudo aqui reportado combina três grandes áreas de fronteira: Simulação computacional, microfluídica e cultivo celular 3D a fim de desenvolver soluções práticas, menos onerosas e rápidas para áreas como de desenvolvimento de fármacos, modelagem

de doenças e medicina personalizada.

REFERÊNCIAS

BACCAR, N.; KIEFFER, R.; CHARCOSSET, C.. Characterization of mixing in a hollow fiber membrane contactor by the iodide–iodate method: numerical simulations and experiments. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 148, n. 2-3, p. 517-524, 15 maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2008.12.020>.

JAHANGIRIAN, Hossein; LEMRASKI, Ensieh Ghasemian; WEBSTER, Thomas J; RAFIEE-MOGHADDAM, Roshanak; ABDOLLAHI, Yadollah. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 12, p. 2957-2978, abr. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s127683>.

KIM, Sun-Young; MOON, A-Ree. Drug-Induced Nephrotoxicity and Its Biomarkers. **Biomolecules And Therapeutics**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 268-272, 31 maio 2012. The Korean Society of Applied Pharmacology. <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.268>.

LASCHKE, Matthias W.; MENGER, Michael D.. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.782-791, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.002>.

MARTIN, John D.; CABRAL, Horacio; STYLIANOPOULOS, Triantafyllos; JAIN, Rakesh K.. Improving cancer immunotherapy using nanomedicines: progress, opportunities and challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 251-266, 7 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0308-z>.

MENCATTINI, Arianna; MATTEI, Fabrizio; SCHIAVONI, Giovanna; GERARDINO, Annamaria; BUSINARO, Luca; NATALE, Corrado di; MARTINELLI, Eugenio. From Petri Dishes to Organ on Chip Platform: the increasing importance of machine learning and image analysis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 10, p. 1-13, 26 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2019.00100>.

PROBST, Christopher; SCHNEIDER, Stefan; LOSKILL, Peter. High-throughput organ-on-a-chip systems: current status and remaining challenges. **Current Opinion In Biomedical Engineering**, [S.L.], v. 6, p. 33-41, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cobme.2018.02.004>.

STILLMAN, Namid R.; KOVACEVIC, Marina; BALAZ, Igor; HAUERT, Sabine. In silico modelling of cancer nanomedicine, across scales and transport barriers. **Npj Computational Materials**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-13, 8 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41524-020-00366-8>.

TANG, Huaqi; ABOULEILA, Yasmine; SI, Longlong; ORTEGA-PRIETO, Ana Maria; MUMMERY, Christine L.; INGBER, Donald E.; MASHAGHI, Alireza. Human Organs-on-Chips for Virology. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 934-946, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.005>.

YU, Fang et al. Microfluidic platforms for modeling b circulatory system. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 23, n Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.03>

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES DE BIGNONIACEAE

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 15/05/2021

Nathália Duques

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/3771195083256771>

Maria Anita Lemos Vasconcelos Ambrosio

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/4241282867555715>

Osvaine Júnior Alvarenga Alves

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/2967261053050187>

Valéria Maria Melleiro Gimenez

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/0681115290354067>

Márcio Luís Andrade e Silva

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/3379459480976790>

Wilson Roberto Cunha

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/0167858725923432>

Ana Helena Januario

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/5596725243630872>

Patrícia Mendonça Pauletti

Universidade de Franca, Franca – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/5900037029288245>

RESUMO: Bignoniaceae é uma família de plantas com 82 gêneros e cerca de 827 espécies,

de ampla distribuição nos neotrópicos, onde ocorrem como plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. Plantas da família Bignoniaceae são conhecidas por produzir lignanas, flavonóides, iridóides, triterpenos, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzoicos, C-glicosilxantonas, fenilpropanóides, antocianidinas e alantoínas. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir de espécies de Bignoniaceae. Os galhos e folhas das espécies *Adenocalymma axillarum*, *Amphilophium elongatum*, *Cuspidaria floribunda*, *Fridericia craterophora*, *Fridericia florida* e *Stizophyllum perforatum* foram extraídos com etanol e, após eliminação do solvente, foram avaliados frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os extratos obtidos foram analisados por Cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os extratos apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) maior que 400 µg/mL. As análises fitoquímicas preliminares indicaram a presença de flavonoides e triterpenos. Assim, este estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento sobre espécies da família Bignoniaceae.

PALAVRAS - CHAVE: Bignoniaceae, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY EVALUATION OF BIGNONIACEAE SPECIES

ABSTRACT: Bignoniaceae is a family of plants with 82 genera and around 827 species, widely distributed in the neotropics, where they occur as

a shrub, tree, and climbing plants. Plants of the Bignoniaceae family are known to produce lignans, flavonoids, iridoids, triterpenes, naphthoquinones, cinnamic and benzoic acids, C-glycosylxanthones, phenylpropanoids, anthocyanidins, and allantoin. This study main objective was to evaluate the antibacterial activity of extracts obtained from Bignoniaceae species. The branches and leaves of the species *Adenocalymma axillarum*, *Amphilophium elongatum*, *Cuspidaria floribunda*, *Fridericia craterophora*, *Fridericia florida*, and *Stizophyllum perforatum* were extracted with ethanol and, after elimination of the solvent, were evaluated against the microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The extracts obtained were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The extracts showed minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) greater than 400 µg/mL. Preliminary phytochemical analyzes indicated the presence of flavonoids and triterpenes. Thus, this study contributed to the expansion of knowledge about Bignoniaceae species.

KEYWORDS: Bignoniaceae, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

1 | INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae possui aproximadamente 82 gêneros e 827 espécies, de ampla distribuição nos neotrópicos, onde ocorrem como plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras (LOHMANN e TAYLOR, 2014). Plantas da família Bignoniaceae apresentam uma diversidade grande de metabólitos secundários entre os quais se incluem lignanas, flavonóides, iridóides, triterpenos, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzoicos, C-glicosilxantonas, fenilpropanóides, antocianidinas e alantóinas. Os alcalóides são raramente encontrados, deste modo, não são considerados como marcadores quimiotaxonômicos desta família (VON POSER *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1990; PAULETTI *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2003; TAKEMURA *et al.*, 1995; MILANI *et al.*, 2020; GONZALEZ *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2001; 2006; ALVARENGA *et al.*, 2012; 2015; BERTANHA *et al.*, 2020).

As espécies selecionadas neste estudo foram: *Stizophyllum perforatum* (Cham.) Miers, *Adenocalymma axillarum* (K.Schum.) L.G.Lohmann, *Amphilophium elongatum* (Vahl) L.G.Lohmann, *Fridericia florida* (DC.) L.G.Lohmann, *Fridericia craterophora* (DC.) L.G.Lohmann e *Cuspidaria floribunda* (DC.) A.H.Gentry, pertencem à tribo Bignonieae, que inclui 393 espécies e 21 gêneros e constitui o grupo mais abundante e diverso de lianas, raramente arbustos (LOHMANN, 2006; LOHMANN e TAYLOR, 2014).

Teste *in vitro* no ensaio de inibição da enzima conversora de angiotensina I do extrato das folhas de *S. perforatum* mostrou que o extrato foi inativo (Castro Braga *et al.*, 2000). No gênero *Stizophyllum* foi relatada a ocorrência de esteróides e triterpenos citotóxicos na espécie *S. riparium* (DUH *et al.*, 1987; DUH *et al.*, 1991).

A espécie vegetal *A. axillare*, sinonímia, *Memora axillaris* K.Schum. está sendo avaliada pela primeira vez. No gênero *Adenocalymma*, a principal espécie estudada é *A. alliaceum*, conhecida popularmente como “cipo-d’alho”, de onde foram isolados triterpenos, flavonóides e seu óleo essencial contém di-, tri-, tetra-sulfeto de dialil (PANDEY *et al.*, 1992;

MISRA *et al.*, 1995; RAO e RAO, 1982, APPARAO *et al.*, 1978).

O estudo fitoquímico do extrato clorofórmico das raízes de *A. elongatum*, sinônimo, *Distictella elongata* (Vahl) Urb., resultou no isolamento de uma nova naftoquinona. Este extrato demonstrou ainda significativa inibição no crescimento de células do tipo SK-MEL (melanoma) e SK-OV-3 (carcinoma de ovário), com valores de IC₅₀ de 40 µg/mL e 56 µg/mL, respectivamente. Porém, a naftoquinona foi inativa (BEDIR *et al.*, 2009). A pesquisa com o extrato etanólico das folhas de *D. elongata* resultou no isolamento de uma flavona, a pectolarina, como também dos ácidos ursólico, oleanólico e pomólico, além do β-sitosterol (SIMÕES *et al.*, 2013). O extrato etanólico das folhas de *D. elongata* também apresentou atividade antiviral frente aos vírus HSV-1 (vírus humano do herpes tipo I) e DENV-2 (dengue vírus 2). A atividade apresentada pelo extrato foi atribuída à presença dos flavonóides pectolarina e acacetina-7-O-rutinosídeo (SIMÕES *et al.*, 2011).

As espécies *F. florida*, sinônimo, *Arrabidaea florida* DC., *F. craterophora*, sinônimo, *Arrabidaea craterophora* (DC.) Bureau e *C. floribunda*, sinônimos *Adenocalymma floribundum* DC. são espécie que estão sendo estudadas pela primeira vez.

Sobre o gênero *Arrabidaea* existem vários trabalhos que evidenciaram uma diversidade grande de constituintes químicos entre os quais se incluem flavonóides, triterpenos, C-glicosilxantonas e fenilpropanóides glicosídeos (TAKEMURA *et al.*, 1995; LEITE *et al.*, 2001; 2006; PAULETTI *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2003; BERTANHA *et al.*, 2020; GONZALEZ *et al.*, 2008). As espécies que pertenciam ao gênero *Arrabidaea* foram reclassificadas nos gêneros *Fridericia*, *Cuspidaria* e *Tanaecium* (LOHMANN e TAYLOR, 2014). O gênero *Cuspidaria* apresenta poucos estudos, mas estes indicam a ocorrência de triterpenos, flavonóides e fenilpropanóides glicosídeos (ALVARENGA *et al.*, 2012; 2015).

A resistência das bactérias aos antibióticos é um fenômeno natural e preocupante que requer pesquisa de novos agentes antibacterianos, aliado ao fato de que o número de descoberta de novos antibióticos nos últimos 25 anos foram muito baixos (THEURETZBACHER *et al.*, 2020; SILVER *et al.*, 2011). Diante deste panorama, extratos vegetais podem ser empregados na pesquisa por novos agentes antibacterianos em ensaios *in vitro* empregando diretamente cepas de bactérias (ABRÃO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2018).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As partes aéreas das espécies *Amphilophium elongatum* (Altitude 578 m, S 21° 35' 11,5", N 47° 46' 43,3"), *Adenocalymma axillarum* (Altitude 563 m, S 21° 35' 49,5", N 47° 47' 20,2") e *Fridericia craterophora* (Altitude 541 m, S 21° 8' 16,6", N 47° 42' 58,2") foram coletadas na Estação Ecológica do Jataí (EEJ). As espécies *Stizophyllum perforatum*

(Altitude 590 m, S 21° 7' 55,4", N 47° 43' 56,4") e *Fridericia florida* (Altitude 539 m, S 21° 8' 16,6", N 47° 42' 58,2") foram coletadas no Assentamento Mário Lago em Ribeirão Preto-SP. E *Cuspidaria floribunda* foi coletada no Campus da USP em Pirassununga. As exsiccatas das espécies foram depositadas no Herbário da FFCL-USP-RP (SPFR 16255, SPFR 16314, SPFR 16313, SPFR 16312 e SPFR 16256, respectivamente). As coletas e a identificação das espécies foram realizadas pela Dra. Valéria Maria Melleiro Gimenez.

As licenças para coleta de material vegetal e para acesso ao patrimônio genético foram no. 42929-3 e COTEC no. SMA-260108-009.545/2015, e SisGen no. A1484F8, no. AC7C911 e no. A71BA2D.

2.2 Obtenção dos Extratos

Após o processo de secagem e trituração, o material vegetal (5 g) foi submetido à extração à temperatura ambiente, por maceração com etanol (100 mL), durante aproximadamente 3 dias, com três repetições. As soluções obtidas foram então rotaevaporadas e forneceram os extratos brutos.

2.3 Estudo fitoquímico

Os extratos brutos das espécies selecionadas (1 mg/mL) foram dissolvidos em metanol HPLC (1 mL) e foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Estas análises foram realizadas em cromatógrafo de sistema binário SHIMADZU Prominence LC-20AD e coluna analítica, SHIMADZU, Shim-pack ODS (250 x 4,20 mm, 5 µm). O solvente usado foi metanol grau HPLC e água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q. Uma alíquota dos extratos também foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) placas da Sigma-Aldrich (sílica gel em folhas de alumínio 20 x 20 cm, com indicador fluoresceína). Os solventes utilizados como fase móvel foram: CHCl₃-CH₃OH 9:1 v/v, hexano-AcOEt (7:3 v/v) e CHCl₃-CH₃OH-H₂O (43:37:20, v/v/v, fase inferior). O revelador empregado foi a vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

2.4 Atividade antimicrobiana

Neste estudo foram utilizadas duas bactérias (Tabela 1) provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e a técnica de microdiluição em caldo em placas de 96 poços foi empregada para a obtenção da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração Bactericida Mínima) (CLSI, 2012). Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1,0 mg/mL e diluído com caldo BHI, as concentrações finais avaliadas foram na faixa de 0,195 a 400 µg/mL, que foram aplicadas em triplicata. A concentração final de DMSO foi 5% (v/v). Como controle positivo foi utilizado o antibiótico tetraciclina, que foi avaliado nas concentrações entre 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. O inóculo foi ajustado de modo a fornecer 5 x 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) com uso do caldo BHI.

Em microplacas foram pipetados o caldo BHI, com as amostras a serem testadas e 20 µL do inóculo, o que forneceu um volume final de 100 µL. Para as duas as bactérias testadas foi realizado o controle do solvente (5 % DMSO), o controle do crescimento da cultura, o controle de esterilidade do caldo, o extrato e controle positivo (tetraciclina). As placas foram em seguida incubadas a 36°C em estufa bacteriológica por 24h. Após o período de incubação foi adicionado em cada poço 30 µL de solução aquosa de resazurina (0,02 %). A leitura dos resultados foi observada pela mudança ou permanência de coloração da mesma, sendo azul (ausência de crescimento microbiano) e rosa (presença de crescimento microbiano). Antes da adição da resazurina e para determinar a CBM, uma alíquota de 10 µL foi removida de cada poço sem crescimento bacteriano visível e semeada em ágar BHI e as placas foram incubadas.

Microorganismos	Origem	Requerimento gasoso (24 h)	Morfotipo	Ágar	Caldo
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Aeróbio	Coco Gram positivo	BHI	BHI
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Aeróbio	Bacilo Gram negativo	BHI	BHI

Tabela 1. Bactérias utilizadas nas atividades antibacterianas, origem e morfotipo.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão apresentados os rendimentos obtidos para cada extrato etanólico obtido. Os extratos que apresentaram os maiores rendimentos foram *F. craterophora* galhos (24,0 %) e *A. elongatum* folhas (21,0 %).

Espécie	Parte	Material vegetal	Massa extrato	Rendimento (%)
<i>Stizophyllum perforatum</i>	folhas	5 g	0,54 g	10,8
	galhos	5 g	0,20 g	4,0
<i>Cuspidaria floribunda</i>	folhas	5 g	0,45 g	9,0
	galhos	5 g	0,30 g	6,0
<i>Adenocalymma axillare</i>	folhas	5 g	0,61 g	12,2
	galhos	5 g	0,23 g	4,6
<i>Amphilophium elongatum</i>	folhas	5 g	1,05 g	21,0
	galhos	5 g	0,48 g	9,6
<i>Fridericia florida</i>	folhas	5 g	0,65 g	13,0
	galhos	5 g	0,798 g	16,0
<i>Fridericia craterophora</i>	folhas	5 g	0,87 g	17,4
	galhos	5 g	1,20 g	24,0

Tabela 1. Extratos obtidos a partir das espécies selecionadas para estudo.

Um dos principais objetivos desse estudo foi avaliar o potencial antibacteriano pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração bactericida mínima (CBM) frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, que são importantes microrganismos infecciosos em humanos. A CIM e a CBM são parâmetros importantes na avaliação *in vitro* das propriedades antibacterianas, principalmente de extratos vegetais (VIEIRA *et al.*, 2018). Estas duas bactérias foram selecionadas também devido a diferença na parede celular.

Os resultados obtidos para os extrato bruto das folhas e dos galhos das espécies selecionadas neste estudo estão descritos na Tabela 2. Os valores de CIM e CBM dos extratos foram todos maiores que 400 µg/mL. Demonstrando que não houve inibição do crescimento, pelo menos na faixa de concentração avaliada que foi de 0,195 a 400 µg/mL. Os resultados encontrados neste estudo foram analisados em comparados com os dados da CIM de HOLETZ *et al.* (2002), que considera a atividade antimicrobiana boa quando a CIM é menor que 100 µg/mL e atividade moderada quando a CIM obtida está entre 100 e 500 µg/mL, por esse motivo, neste estudo a concentração máxima avaliada foi de 400 µg/mL.

Espécie	Parte	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
		ATCC 29213 [µg/mL]		ATCC 25922 [µg/mL]	
		CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Stizophyllum perforatum</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
<i>Cuspidaria floribunda</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
<i>Adenocalymma axillare</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
<i>Amphilophium elongatum</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
<i>Fridericia florida</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
<i>Fridericia craterophora</i>	folhas	>400	>400	>400	>400
	galhos	>400	>400	>400	>400
Tetraciclina	-	0,3688	n.t.	0,7375	n.t.

Tabela 2. CIM e CBM dos extratos.

n.t. não testado

Os extratos foram primeiramente analisados por CCD (Figura 1) e por CLAE-DAD (Figuras 2 e 3). Os dados obtidos indicam a presença de vários metabólitos secundários, principalmente das classes dos flavonoides e triterpenos.

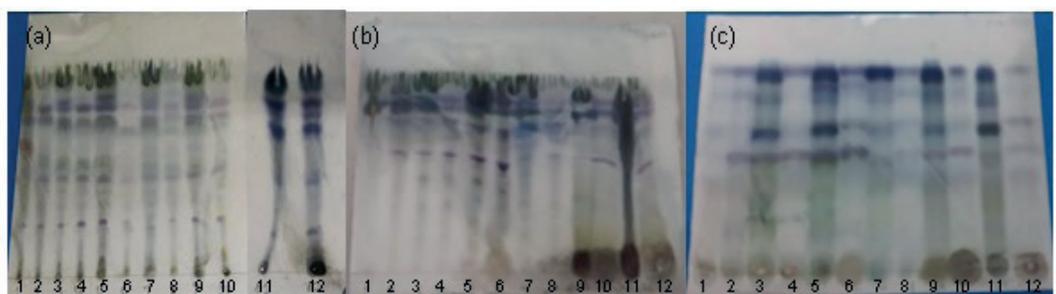


Figura 1. Cromatoplasas obtidas para os extratos: *S. perforatum* folhas (1) galhos (2), *C. floribunda* folhas (3) e galhos (4), *A. axillarum* folha (5) e galhos (6), *A. elongatum* folhas (7) e galhos (8), *F. florida* folhas (9) e galhos (10), *F. craterophora* folhas (11) e galhos (12). (a) Fase móvel: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ 9:1 v/v. (b) Fase móvel: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ 43:37:20 v/v/v fase inferior (c) Hex-AcOEt 7:3 v/v. Revelador vanilina sulfúrica.

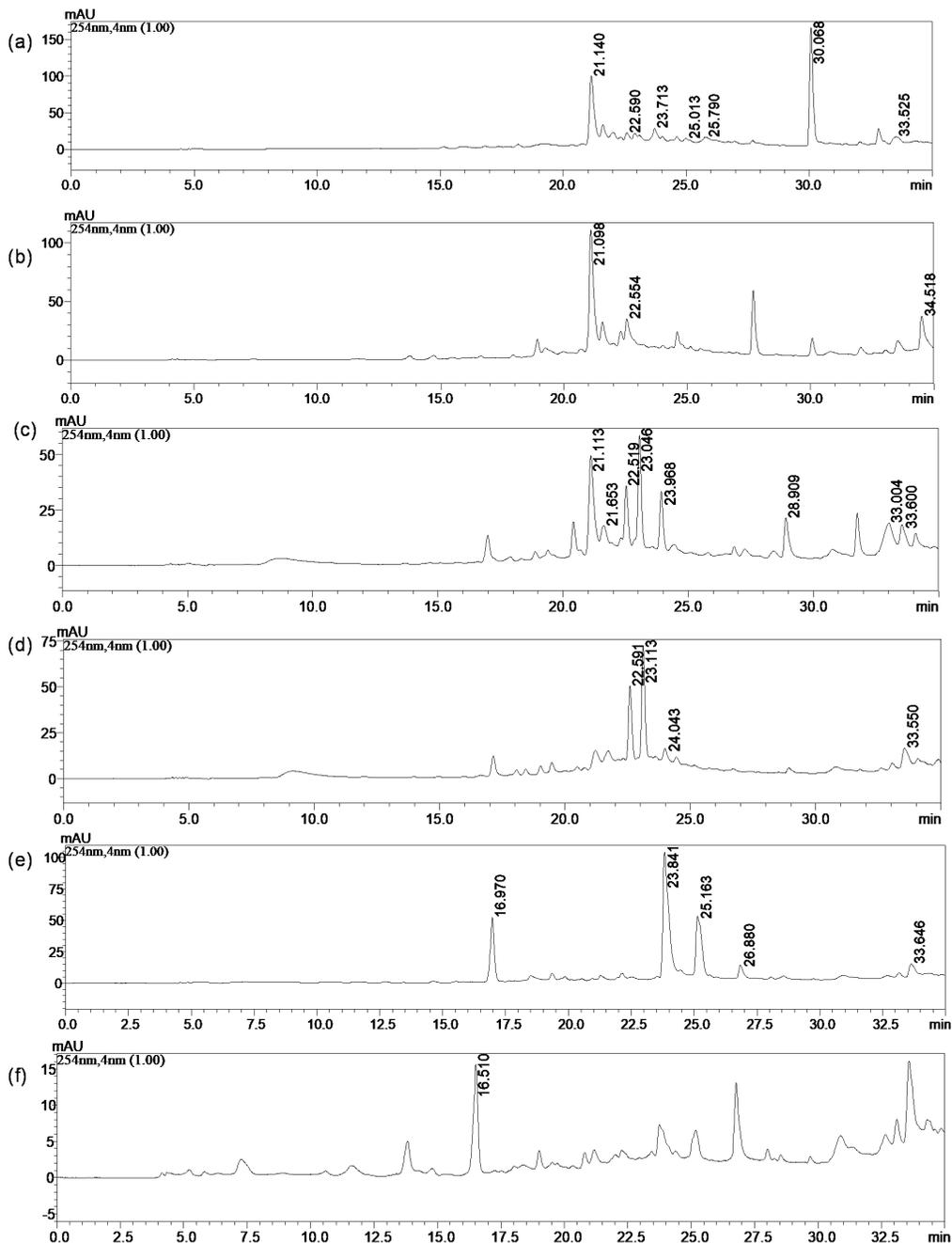


Figura 2. Cromatograma dos extratos etanólico: (a) folhas de *S. perforatum*; (b) galhos de *S. perforatum*; (c) folhas de *C. floribunda*; (d) galhos de *C. floribunda*; (e) folhas de *A. axillanum* e (f) galhos de *A. axillanum*. Condição: água (+0,1% ácido acético): metanol, gradiente linear, (5% →100%) em 30 minutos, 5 minutos 100% metanol, coluna ODS, λ 254 nm, volume de injeção: 20 μ L, fluxo: 0,8 mL/min. Concentração das amostras [1 mg/mL].

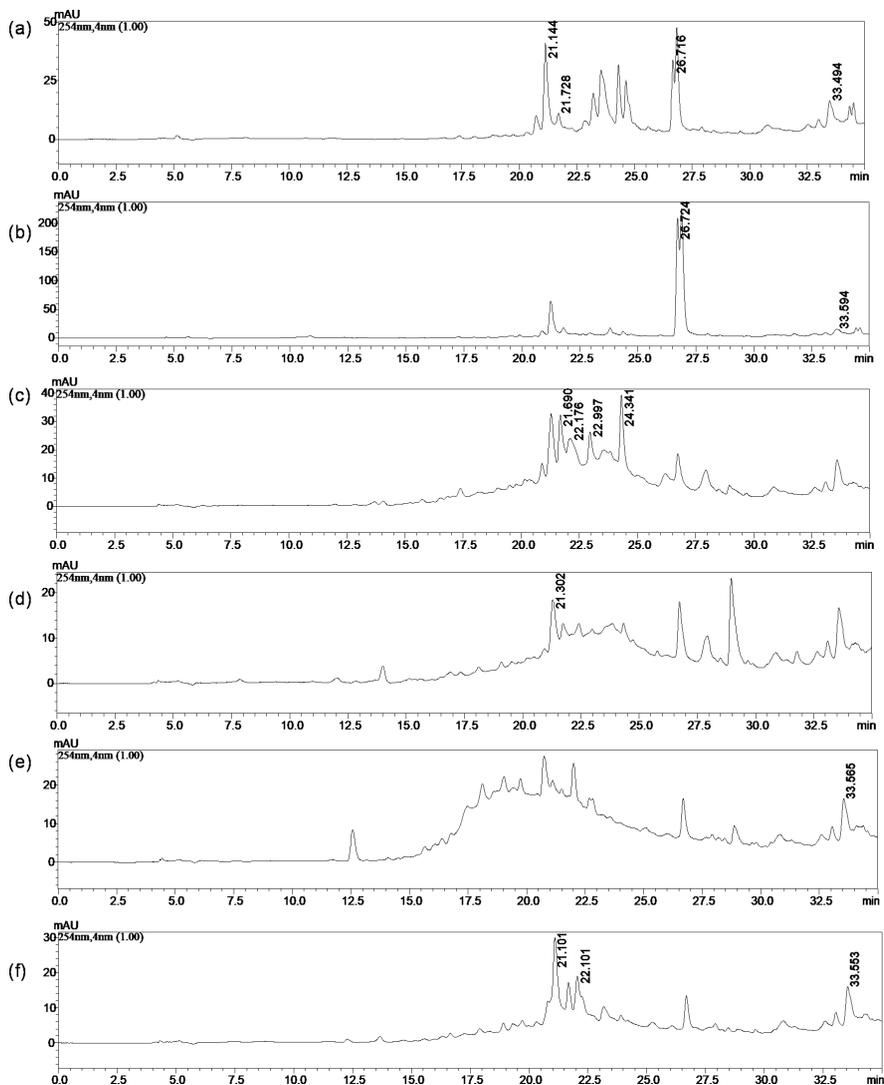


Figura 3. Cromatograma dos extratos etanólico: (a) folhas de *A. elongatum*; (b) caules de *A. elongatum*; (c) folhas de *F. florida*; (d) caules de *F. florida*; (e) folhas de *F. cratophora*; (f) caules de *F. cratophora*. Condição: água (+0,1% ácido acético): metanol, gradiente linear, (5% □100%) em 30 minutos, 5 minutos 100% metanol, coluna ODS, λ 254 nm, volume de injeção: 20 µL, fluxo: 0,8 mL/min. Concentração das amostras [1 mg/mL].

CONCLUSÕES

O trabalho experimental com as espécies coletadas de Bignoniaceae, apresentou resultados satisfatórios. Os dados obtidos por CCD e CLAE-DAD evidenciaram a presença de duas classes principais de metabólitos secundários os flavonoides e os triterpenos. Os ensaios biológicos indicaram que os extratos não apresentaram uma boa atividade antimicrobiana. Porém este estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre as

espécies de Bignoniaceae.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio na realização deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processo no. 2016/10313-4).

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F.; DE ARAÚJO COSTA, L. D.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; DE CASTRO, P. T.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 443, 2015.
- ALVARENGA, T. A.; BÊDO, T. R. F. O.; BRAGUINE, C. G.; GONÇALVES, U. O.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; GIMENEZ, V. M. M.; GROppo, M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Evaluation of *Cuspidaria pulchra* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, n. 2, p. 122-127, 2012.
- ALVARENGA, T. A.; BERTANHA, C. S.; DE OLIVEIRA, P. F.; TAVARES, D. C.; GIMENEZ, V. M.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Lipoxygenase inhibitory activity of *Cuspidaria pulchra* and isolated compounds. **Natural Product Research**, v. 29, n. 11, 1083-1086, 2015.
- APPARAO, M.; KJAER, A.; MADSEN, J. O.; RAO, E. V. Diallyl di-, tri- and tetrasulfide from *Adenocalymma alliaceae*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1660-1661, 1978.
- BEDIR, E.; PEREIRA, M. A. S.; KHAN, S. I.; CHITTIBOYIANA, A.; MORAES, R. M.; KHAN, I. A. **2009**. A new β -Lapachone derivative from *Distictella elongate* (Vahl) Urb. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 383-386, 2009.
- BERTANHA, C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. E.; JANUÁRIO, A. H.; BORGES, A.; KAWANO, D. F.; PARREIRA, R. L. T.; PAULETTI, P. M. Isolation, *in vitro* and *in silico* Evaluation of Phenylethanoid Glycoside from *Arrabidaea brachypoda* as Lipoxygenase Inhibitor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 849-855, 2020.
- CASTRO BRAGA, F.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. **2000**. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 245-250, 2000.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard, 9 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- DUH, C. Y.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Cell-cycle specific cytotoxicity mediated by stizophyllin (2 α ,3 β ,12 β -trihydroxypregna-4,7,16-trien-20-one), a novel electrophilic pregnane isolated from *Stizophyllum riparium*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, n. 1, p. 43-56 1991.

DUH, C. Y.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; LEUNG, S. L.; FARNSWORTH, N. R. 1987. Plant anticancer agents XLIV. Cytotoxic constituents from *Stizophyllum riparium*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 1, p. 63-74, 1987.

GONZALEZ, B.; SUAREZ-ROCA, H.; BRAVO, A.; SALAS-AUVERT, R.; AVILA, D. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea bilabiata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, 287-290, 2008.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMUR, C. V. Screening of some plants used in the brasilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

LEITE, J. P.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.

LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.

LIMA, C. S. D. A.; CAVALCANTI DE AMORIM, E. L.; XISTO DA FONSECA, K.; DE SENA, R.; CHIAPPETA, A. A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; DA-CUNHA, V. L.; DA SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 77-81, 2003.

LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 304-318, 2006.

LOHMANN, L. G.; TAYLOR, C. M. A new generic classification of tribe Binonieae (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, n. 3, p. 348-489, 2014.

MILANI, R. R.; ALVES, O. J. A.; BERTANHA, C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; SQUARISI, I. S.; NICOLELLA, H. D.; PAGOTTI, M. C.; TAVARES, D. C.; SILVA, M. L. A. E.; CUNHA, W. R.; MAGALHÃES, L. G.; JANUARIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Antipromastigote and cytotoxic activities of flavonoides from *Fridericia speciosa* leaves. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1404-1407, 2020.

MISRA, T. N.; SINGH, R. S.; PANDEY, H. S.; PRASAD, C.; SHARMA, S. C. A Novel Pentacyclic Triterpene Acid from *Adenocalymma alliaceum* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 7, p. 1056-1058, 1995.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceae brasileiras. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 302-307, 1990.

PANDEY, H. S.; SHARMA, S. C.; SINGH, R. S.; MISRA, T. N. Glycyrrhetol and beta-Peltoboykinolic Acid from *Adenocalymma alliaceum*. **Planta Medica**, v. 58, n. 2, 225, 1992.

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; YOUNG, M. C.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; DA SILVA BOLZANI, V. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydooides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

RAO, E. V.; RAO, M. A. Apigenin-7-*O*-methylglucuronide from *Adenocalymma alliaceum*. **Current Science**, v. 51, p. 1040-1040, 1982.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

SIMÕES, L. R.; MACIEL, G. M.; BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 602-607, 2011.

SIMÕES, L. R.; MACIEL, G. M.; BRANDÃO, G. C.; FILHO, J. D. S.; OLIVEIRA, A. B.; CASTILHO, R. O. Chemical constituents of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 873-879, 2013.

TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1299-1300, 1995.

THEURETZBACHER, U.; OUTTERSON, K.; ENGEL, A.; KARLÉN, A. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 275-285, 2020.

VIEIRA, R.; MORAES, T.; SILVA, L. O.; BIANCHI, T. C.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; PIRES, R. H.; MARTINS, C. *In vitro* studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, 14, 2018.

VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 4, p. 351-366, 2000.

CAPÍTULO 8

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM DIFERENTES ETAPAS NA CRIAÇÃO DE FRANGO

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 05/05/2021

Hellen Yukari Kitagawa

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/0915462058754985>

Maísa Fabiana Menck Costa

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/0129229325996162>

Thiago Hideo Endo

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/0237690212110424>

Leonardo Pinto Medeiros

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/1623802596414818>

Natália Yukari Kashiwaqui

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/5201500698928027>

Luís Eduardo de Souza Gazal

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/6421225079734590>

Victor Dellevedove Cruz

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/4835491770133863>

Ana Angelita Sampaio Baptista

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva
Londrina - PR
<http://lattes.cnpq.br/7922260898687833>

Gerson Nakazato

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/2532741243269868>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Departamento de Microbiologia
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/3188392520162374>

RESUMO: O Brasil, um dos maiores produtores e o maior exportador de carne de frango no mundo, utiliza antimicrobianos como prevenção e tratamento de doenças com o propósito de melhorar a qualidade da carne. Porém, o uso de antibióticos de forma não racional nas granjas promove a seleção e disseminação de bactérias resistentes, podendo causar doenças para as aves e para os seres humanos. Assim, o monitoramento da resistência aos antimicrobianos na criação de animais é uma das estratégias para a promoção do uso racional de antimicrobianos.

O objetivo deste trabalho foi viabilizar uma técnica simples e rápida que pode ser utilizada para a pesquisa de bactérias multirresistentes em ambientes de produção animal. Esse trabalho detectou e quantificou bactérias multirresistentes presentes na produção de frango por meio da técnica de *replica plating* e semeadura em meios de cultura suplementados com antimicrobianos. A técnica proposta mostrou-se mais eficaz, econômica e aplicável na rotina microbiológica que as técnicas usualmente utilizadas, tornando viável sua implantação e possibilitando o monitoramento da resistência aos antimicrobianos na produção avícola. Além disso, possibilitou proporcionar uma maior segurança e qualidade ao frango brasileiro, contribuindo para o fortalecimento do Agronegócio brasileiro.

PALAVRAS - CHAVE: avicultura, *replica plating*, cefotaxima, ciprofloxacina.

DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR ISOLATION OF MULTIDRUG-RESISTANCE BACTERIA AT DIFFERENT STAGES IN POULTRY FARMING

ABSTRACT: Brazil, one of the largest producers and the largest exporter of chicken meat in the world, uses antimicrobials to prevent and treat diseases to improve the quality of the meat. However, the use of antibiotics in a non-rational way promotes the selection and dissemination of resistant bacteria, which can cause diseases for birds and humans. Thus, monitoring resistance to antimicrobials in animal husbandry is one of the strategies for promoting the rational use of antimicrobials. The objective of this study was to make possible a simple and fast technique that can be used for the research of multidrug-resistant bacteria in animal production environments. This study detected and quantified multidrug resistant bacteria present in chicken production using the replica plating technique and culture media supplement with antimicrobials. The proposed technique proved to be more effective, economical, and applicable in the microbiological routine than the techniques usually used, making its implantation viable and enabling the monitoring of resistance to antimicrobials in poultry production. In addition, it made it possible to provide greater safety and quality to Brazilian chicken and contributing to the strengthening of agribusiness.

KEYWORDS: aviculture, replica plating, cefotaxime, ciprofloxacin.

1 | INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2019, o Brasil destacou-se por ser um dos grandes produtores e exportadores da carne de frango, sendo o terceiro lugar na produção e o primeiro em exportação (ABPA, 2020). Para manter essa intensa produção, o Brasil utiliza uma grande quantidade de antibióticos (NETTO et al., 2014). Porém, o uso excessivo desses fármacos pode selecionar bactérias multirresistentes (FOUNOU, 2016), conseqüentemente, trazendo riscos aos trabalhadores da granja e aos consumidores através da cadeia alimentar (PADUNGTOD, 2008).

Os antimicrobianos na criação de animais são utilizados para uso terapêutico em animais doentes e na prevenção de doenças quando os animais saudáveis estão muito susceptíveis a desenvolvê-las (CARUSO, 2018). Entretanto, a alta demanda por aves e produtos avícolas, gera um confinamento de muitas aves em espaços pequenos e com isso, os animais ficam propensos a infecções bacterianas, necessitando de altas doses

de antibióticos (BHOGOJU et al., 2018). Logo, seleciona bactérias como *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Salmonella* resistentes (MURPHY, et al., 2018). Outro problema são as APEC (*Avian pathogenic E.coli*) multirresistentes, que podem causar aerossaculite, pericardite e sepse, entre outras doenças extraintestinais em frangos (YU et al., 2020), acarretando uma maior mortalidade e morbidade e portanto, perda econômica na indústria avícola (KIM, et al., 2020).

Os betalactâmicos são uma família de antimicrobianos compostos por penicilina, cefalosporina, carbapenens e monobactâmicos (SUARÉZ, 2009). Atuam inibindo a formação da ligação cruzada entre as cadeias polissacarídeas e de peptídeos, consequentemente impedindo a formação da parede celular bacteriana (CHEN et al., 2020). Além disso, representam a classe mais utilizada atualmente para doenças infecciosas (BUSH, 2016), por conta do seu amplo espectro e baixa toxicidade seletiva (VEIGA, 2018). A cefotaxima representa a terceira geração das cefalosporinas, com um amplo espectro e baixa toxicidade (ALTAYBAN et al., 2020).

Os beta-lactâmicos podem ser inativados por beta-lactamases, que podem hidrolisar o anel beta-lactâmico (KNOTT, et al., 1979). Um exemplo é a beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), uma enzima que hidrolisa monobactâmicos e cefalosporinas de terceira geração (PITOUT, 2008).

A ciprofloxacina é um antibiótico da segunda geração das fluorquinolonas (ZHANG et al., 2018), o mais utilizado mundialmente por ser eficiente, segura e com um baixo custo, além de ser responsável por impedir o DNA girase bacteriano e estabilizar o complexo DNA topoisomerase (CONLEY, et al., 2018).

A replica plating, segundo o estudo de Lederberg et al. (1952), foi desenvolvido com o intuito de facilitar os testes de rotina que envolvem inoculações repetitivas de muitos isolados em diferentes meios de cultura. Além disso, permite a cópia de um padrão de crescimento para outros meios, determina a sensibilidade das bactérias aos antibióticos e por fim, é efetivo para o isolamento de mutantes que necessitam de um ou mais fatores novos de crescimento.

Por conta da disseminação de bactérias multirresistentes na produção aviária, o objetivo desse trabalho foi padronizar e aprimorar a quantificação destas bactérias pela contagem em placa contendo os antibióticos cefotaxima e ciprofloxacina através da semeadura e da *replica plating*. O desenvolvimento desta técnica torna viável sua implantação para quantificação de bactérias multirresistentes em granjas avícolas. A quantificação poderá auxiliar o poder público a monitorar a resistência antimicrobiana nos aviários e assim controlar a disseminação e contribuir para o uso responsável dos antimicrobianos.

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras foram coletadas em três momentos diferentes da criação de frango (Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UDEL, nº22867.2015.23). Foram coletadas amostras da cama de produção/alojamento por meio de propés, conservado em uma sacola estéril contendo água peptonada. Na primeira coleta, as aves estavam com 33 dias de vida, na segunda coleta, 1 dia de vida e na terceira coleta, 40 dias de vida. Todas as coletas foram realizadas em granjas diferentes. Nas três coletas, foram realizadas o pool das amostras (dois propés por granja) e após esse procedimento, por meio da diluição seriada, as diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram plaqueadas (Fig. 1).

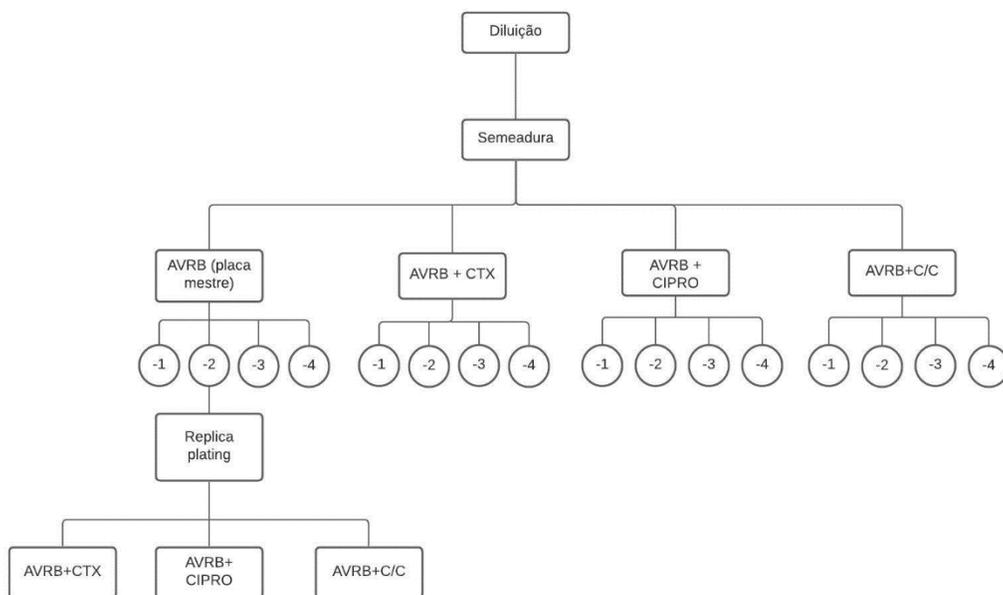


Figura 1. Organograma demonstrando as sementeiras realizadas após a diluição (10^{-1} a 10^{-4}) e a Replica Plating. CTX: Cefotaxima, CIPRO: Ciprofloxacina, C/C: Cefotaxima/Ciprofloxacina.

2.2 Semeadura

Após a preparação da diluição seriada, 100L das amostras diluídas, de 10^{-1} a 10^{-4} , foram sementeiras com o auxílio da Drigalski no meio Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (AVRB) (Fig. 2), AVRB contendo cefotaxima (CTX), AVRB contendo ciprofloxacina (CIPRO) e AVRB contendo cefotaxima e ciprofloxacina (C/C). O meio de cultura AVRB é seletivo e contém glicose, utilizado para a enumeração de enterobactérias em produtos alimentícios (Manual Oxoid). A concentração utilizada de cefotaxima e ciprofloxacina foi de 8g/mL. As

placas foram incubadas por 24h a 37°C. Por fim, foi executado a contagem das placas e consequentemente, as placas de AVRΒ com contagem de 30 a 300 colônias, foram utilizadas como placa mestre para a *replica plating*.

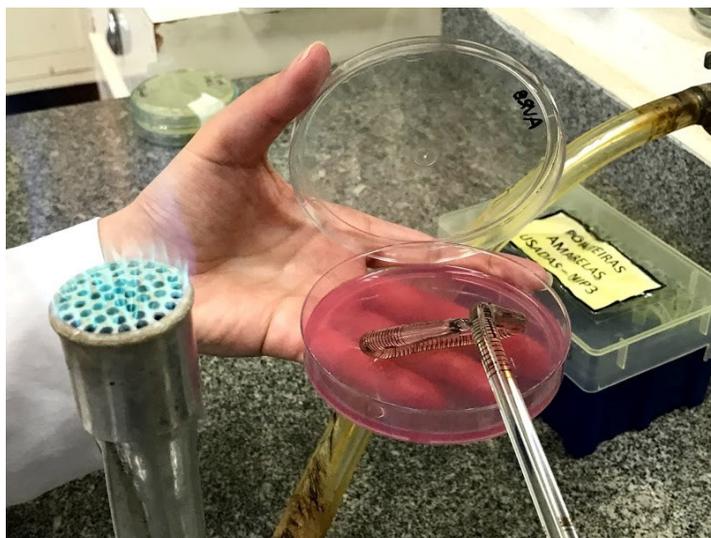


Figura 2. Semeadura com o uso da Drigalski no meio Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (AVRB).

2.3 *Replica Plating*

Esta técnica desenvolvida por Lederberg et. al (1952), possibilita a cópia de um padrão de crescimento de uma placa para outras contendo outros meios. Além disso, pode determinar a sensibilidade da bactéria aos antibióticos. Para realizar essa técnica, foi utilizado um carimbo revestido por pano de veludo que foi recortado em quadrado de 20 cm devidamente autoclavado (Fig. 3). Desse modo, o carimbo foi pressionado levemente por 5 segundos na placa mestre em que o crescimento estava presente (Fig. 4 e 5) e transferido para as placas que continham cefotaxima, ciprofloxacina e os dois antibióticos associados. As placas foram autoclavadas por 24h a 37°C. Após esse processo, foi executada a contagem das placas e a comparação com a placa mestre.

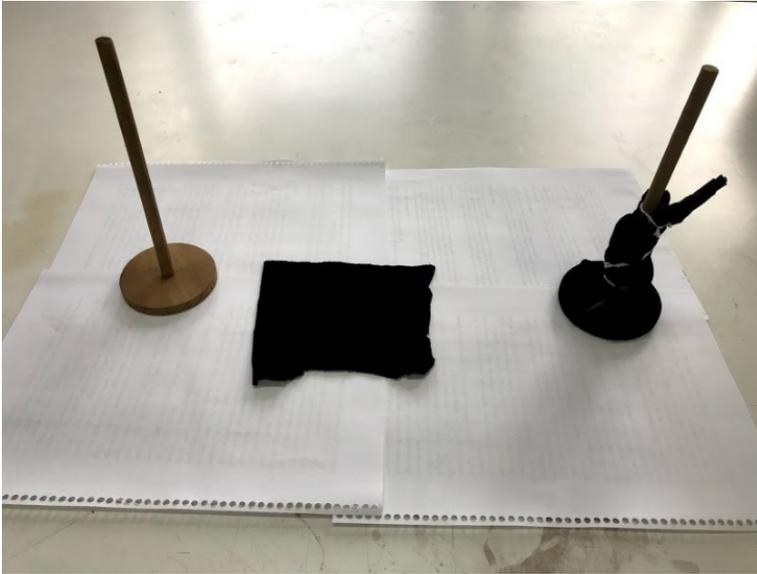


Figura 3. Materiais da *replica plating*: Carimbo e pano de veludo.



Figura 4. Semeadura e *replica plating*: Carimbo e a placa mestre (AVRB) com crescimento microbiano



Figura 5. Semeadura e *replica plating*: O carimbo foi pressionado levemente por 5 segundos na placa mestre que continha o crescimento.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi efetuada a semeadura em AVRB sem antibiótico para que fosse viável utilizá-la como placa mestre na *replica plating* e comparar os resultados da semeadura direta das diluições com as placas da *replica plating*. Dessa forma, tanto para a leitura da semeadura das diluições quanto para a placa mestre da *replica plating*, foram utilizadas as placas contendo de 30 a 300 colônias.

Através da *replica plating*, foi possível a quantificação do número de isolados sem antibiótico (placa mestre), o número de isolados resistentes a cefotaxima, ciprofloxacina e aos dois antibióticos associados (Fig. 6):

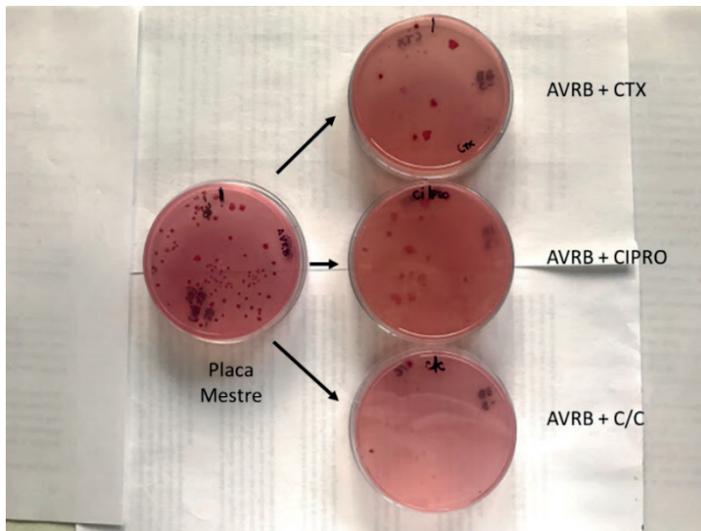


Figura 6. Placas com presença de crescimento microbiano após a sementeira por *replica plating*. Placa mestre, AVRB + Cefotaxima, AVRB + Ciprofloxacina, AVRB + Cefotaxima/Ciprofloxacina

A seguir, o gráfico (Fig. 7) envolvendo os resultados.

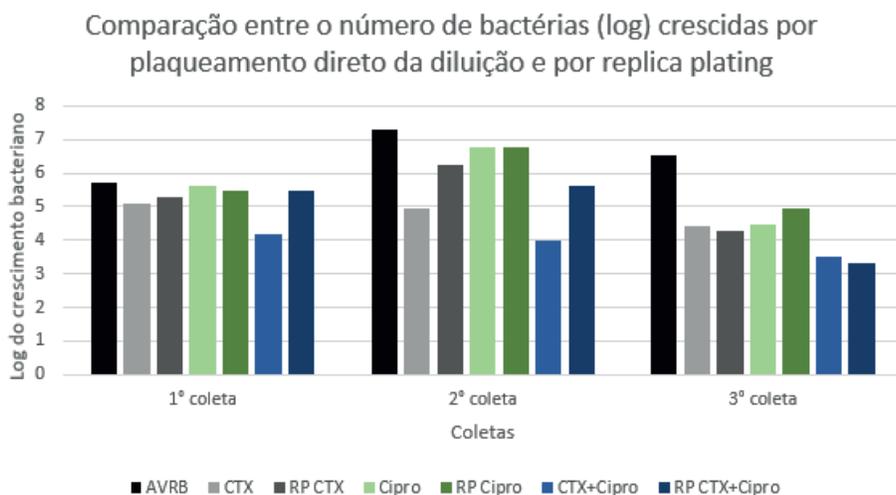


Figura 7. Gráfico comparativo do número de bactérias crescidas (log) por plaqueamento direto da diluição e por *replica plating*. CTX: Cefotaxima, RP: *Replica plating*, Cipro: Ciprofloxacina. Não existe diferença significativa entre os métodos (p -valor=0,1947).

Ao comparar os dados obtidos com o crescimento bacteriano do plaqueamento por meio das diluições em placas suplementadas com antibiótico com os da *replica plating*, observamos os seguintes resultados: Executando o teste de normalidade de Shapiro-

Wilk por meio do Software R, notou-se que os dados seguem a distribuição normal (p -valor=0,8009). Logo, foi realizado o teste T de Student para comparar duas amostras pareadas, comparando os resultados adquiridos na semeadura com os da *replica plating*. Com isso, o teste indicou a ausência de diferenças significativas entre os métodos (p -valor=0,1947). Concluindo, a semeadura e a *replica plating* apresentam resultados semelhantes. Porém, a *replica plating* apresenta vantagens por ser mais econômica e prática, em comparação a semeadura.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização da técnica da *replica plating* é importante para que os laboratórios relacionados ao agronegócio possam utilizar para a quantificação de bactérias multirresistentes, visto que apresentam um método mais prático e com um menor uso de placas. Dessa forma, por meio destes experimentos, comprovamos que a técnica da *replica plating* pode ser utilizada para a seleção de bactérias multirresistentes à beta-lactâmicos e quinolonas presentes na produção aviária. Além disso, é possível a contribuição para o monitoramento da resistência aos antimicrobianos e ao uso consciente de antimicrobianos, proporcionando uma maior segurança e qualidade ao frango brasileiro.

REFERÊNCIAS

ALTAYBAN, Abdullah et al. **Cefotaxime pharmacokinetics in Arabian camel (*Camelus dromedarius*) calves after single intravenous injection**. Tropical animal health and production, v. 52, n. 2, p. 887-891, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2020**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 27 de abril de 2021.

BHOGOJU, Sarayu et al. **A comparative analysis of microbial profile of Guinea fowl and chicken using metagenomic approach**. PloS one, v. 13, n. 3, p. e0191029, 2018.

BRIDSON, E. **The OXOID MANUAL 9th Edition 2006**. Disponível em: <http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/manuales/oxid-manual-9th-edition.pdf>. Acesso em: 24 de abril de 2021.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. **β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview**. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

CARUSO, Giorgia. **Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from farm livestock and related analytical methods: a review**. Journal of AOAC International, v. 101, n. 4, p. 916-922, 2018.

CHEN, Chun-Hsien et al. **Characterisation of the β -lactam resistance enzyme in *Acanthamoeba castellanii***. International journal of antimicrobial agents, v. 55, n. 2, p. 105823, 2020.

- CONLEY, Zachary C. et al. **Wicked: The untold story of ciprofloxacin**. PLoS pathogens, v. 14, n. 3, p. e1006805, 2018.
- FOUNOU, Luria Leslie; FOUNOU, Raspail Carrel; ESSACK, Sabiha Yusuf. **Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective**. Frontiers in microbiology, v. 7, p. 1881, 2016.
- KIM, Yeong Bin et al. **Molecular characterization of avian pathogenic Escherichia coli from broiler chickens with colibacillosis**. Poultry science, v. 99, n. 2, p. 1088-1095, 2020.
- KNOTT-HUNZIKER, Vroni et al. **Penicillinase active sites: Labelling of serine-44 in β -lactamase I by 6 β -bromopenicillanic acid**. FEBS letters, v. 99, n. 1, p. 59-61, 1979.
- LEDERBERG, Joshua; LEDERBERG, Esther M. **Replica plating and indirect selection of bacterial mutants**. Journal of bacteriology, v. 63, n. 3, p. 399, 1952.
- MURPHY, Colleen P. et al. **Factors potentially linked with the occurrence of antimicrobial resistance in selected bacteria from cattle, chickens and pigs: a scoping review of publications for use in modelling of antimicrobial resistance (IAM. AMR Project)**. Zoonoses and public health, v. 65, n. 8, p. 957-971, 2018.
- NETTO, Pedro Toledo *et al.* **Antimicrobianos Veterinários: Uso na Avicultura e Ocorrência em Cama de Frango**. Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 17, n. 2, p. 9-22, 2014.
- PADUNGTOD, Pawin; KADOHIRA, Mutsuyo; HILL, Glen. **Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand**. Journal of Veterinary Medical Science, v. 70, n. 9, p. 873-879, 2008.
- PITOUT, Johann DD; LAUPLAND, Kevin B. **Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern**. The Lancet infectious diseases, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.
- ROSSI, Flávia. **The challenges of antimicrobial resistance in Brazil**. Clinical infectious diseases, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.
- SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. **Antibióticos betalactámicos**. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.
- VEIGA, Rui Pedro; PAIVA, Jose-Artur. **Pharmacokinetics–pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients**. Critical Care, v. 22, n. 1, p. 1-34, 2018.
- YU, Lumin et al. **Role of LsrR in the regulation of antibiotic sensitivity in avian pathogenic Escherichia coli**. Poultry science, v. 99, n. 7, p. 3675-3687, 2020.
- ZHANG, Gui-Fu et al. **Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities**. European journal of medicinal chemistry, v. 146, p. 599-612, 2018.

CAPÍTULO 9

FINDRISK: ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO PARA DIABETES MELLITUS 2 COMO PREVENÇÃO NO CAMPO DA SAÚDE COLETIVA

Data de aceite: 01/07/2021

José Auricélio Bernardo Cândido

Enfermeiro. Estratégia de Saúde da Família de Horizonte, Ceará, Brasil;

Geanne Maria Costa Torres

Enfermeira. Professora do Curso de Enfermagem da Universidade Regional do Cariri, URCA, Crato, Ceará, Brasil

Inês Dolores Teles Figueiredo

Enfermeira. Estratégia Saúde da Família de Salitre, Ceará, Brasil

Ana Sávía de Brito Lopes Lima e Souza

Educadora Física. Centro de Atenção Psicossocial, CAPS, Horizonte, Ceará, Brasil

Slayton Frota Sá Nogueira Neves

Cirurgião-dentista. Estratégia de Saúde da Família de Horizonte, Ceará, Brasil

Tháusi Frota Sá Nogueira Neves Souza

Cirurgiã-dentista. Estratégia de Saúde da Família de Fortaleza, Ceará, Brasil

Ivina Nicássia de Melo Fernandes

Enfermeira. Prefeitura Municipal de Fortaleza, Ceará, Brasil

Ana Paula Pires Gadelha de Lima

Enfermeira. Estratégia Saúde da Família de Horizonte, Ceará, Brasil

RESUMO: OBJETIVO: analisar a importância da estratificação do risco de desenvolver DM2, como estratégia de prevenção de doença crônica

no campo da saúde coletiva. **MÉTODOS:** estudo epidemiológico, descritivo e analítico, realizado em 371 pessoas, com idades entre 30 a 69 anos, de ambos os sexos, entre agosto/março de 2016, em um município do Nordeste brasileiro. Utilizou-se o *FINDRISK* para coleta de dados e análise por estatística inferencial e cálculo das razões de prevalências ao nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** as maiores prevalências foram: 85,7% nenhum/baixo/moderado risco de desenvolver DM2 em dez anos; 66,8 % sexo feminino; 59% idade >45 anos; 72% IMC elevado; 77% CA aumentada; 54% praticavam atividade física; 67% não comiam verduras/frutas regularmente; 80% não tomavam anti-hipertensivos; 92% não tinham registro de glicose elevada e 52% tinham familiar com DM. **CONCLUSÃO:** a aplicação do *FINDRISK* permitiu identificar pessoas com alta prevalência de risco para DM2, principalmente relacionado aos fatores modificáveis. Portanto, a estratificação se mostra uma tecnologia leve, de baixo custo, de fácil aplicabilidade e efetiva para a estratificação do risco; sendo potencialmente indutora no planejamento de ações de prevenção e promoção à saúde no âmbito da saúde coletiva. **PALAVRAS - CHAVE:** Diabetes mellitus; Fatores de Risco; Promoção da Saúde.

FINDRISK: RISK STRATIFICATION FOR DIABETES MELLITUS 2 AS PREVENTION IN THE FIELD OF COLLECTIVE HEALTH

ABSTRACT: OBJECTIVE: to analyze the importance of stratifying the risk of developing DM2 as a strategy for prevention in the field

of public health. **METHODS:** Epidemiological, descriptive and analytical study, carried out with 371 people between August / March 2016, in a municipality in the Northeast of Brazil, aged between 30 and 69 years and both sexes. FINDRISK was used for data collection and analysis by inferential statistics and calculation of prevalence ratios at a significance level of 5%. **RESULTS:** the highest prevalences were: 85.7% none / low / moderate risk of developing DM2 in ten years; 66.8% female; 59% age > 45 years; 72% high BMI; 77% increased AC; 54% practiced physical activity; 67% did not eat vegetables / fruits regularly; 80% did not take antihypertensive drugs; 92% had no record of high glucose and 52% had a family member with DM. **CONCLUSION:** the application of FINDRISK allowed the identification of people with a high prevalence of risk for DM2, mainly in the modifiable factors. Therefore, stratification proves to be a light, low-cost, easy-to-apply and effective technology for stratifying risk and potentially inducing prevention and health promotion actions in public health, according to the level of severity.

KEYWORDS: Diabetes mellitus; Risk factors; Health promotion.

INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é o termo que descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos^{1,2}. O Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma mais presente destas manifestações, atingindo mais de 90% dos casos, e caracteriza-se por defeitos tanto na ação quanto na secreção de insulina. Desenvolve-se geralmente em adultos e tem sido relacionada à obesidade, inatividade física e hábitos alimentares não saudáveis³. É uma condição crônica, considerada importante problema de saúde pública, cuja prevalência está também relacionada à idade, ao sedentarismo e ao estresse da vida urbana⁴.

No final da década de 80, dados sobre prevalência de DM, representativos da população residente em nove capitais brasileiras, indicaram que em média, 7,6% dos brasileiros entre 30 a 69 anos de idade apresentaram DM e que a incidência em ambos os sexos aumentava com a idade e a adiposidade corporal. Esses dados revelaram as maiores taxas para as cidades de São Paulo e Porto Alegre, sugerindo o papel da urbanização e da industrialização como agentes determinantes na patogênese do DM2 no Brasil⁵.

Frente a essa problemática, percebe-se a necessidade da realização de ações efetivas de prevenção às doenças e promoção da saúde, tais como estratégias de monitoramento da prevalência dos fatores de risco, especialmente os de natureza comportamental, que permitem a implementação de ações com menor custo e maior efetividade⁶.

Modificações de estilo de vida ou intervenção farmacêutica tem sido demonstradas em ensaios clínicos randomizados na China, Estados Unidos, Índia e países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, como medidas de prevenção de DM2. Entretanto, como, forma de reduzir custos, os programas de intervenção são dirigidos a indivíduos com alto risco para DM2⁷.

Nesse sentido, a estratificação de risco para prever DM2 tem sido desenvolvida a partir da observação de fatores clássicos como idade, sexo, obesidade, metabolismo e estilo de vida, história familiar de diabetes e etnia. Desse modo, após a identificação da etiologia, dos fatores e estratificação do risco para DM2, torna-se possível intervir de forma sistematizada e individualizada nos fatores passíveis de mudança⁸.

Entretanto, observa-se que a estratificação com escores de risco para prever o aparecimento do DM2, ainda não é utilizada com frequência na saúde pública, embora seja o melhor recurso aplicável no âmbito da saúde coletiva, haja vista ser uma tecnologia de o baixo custo, que aplicada antes do rastreamento laboratorial com as dosagens de glicemia de jejum, Teste Oral de Tolerância à Glicose ou Teste de Hemoglobina Glicada, possibilita o uso racional dos testes laboratoriais⁹.

Buscando reorganizar a rede de Atenção Básica, a Política Nacional da Atenção Básica (PNAB) surge com propostas de mudança do modelo de atenção e de reorientação das práticas de saúde no âmbito individual e coletivo¹⁰ e apresenta como uma das atribuições a atenção integral por áreas estratégicas, dentre as quais estão, a promoção da saúde e o controle do diabetes mellitus.

Nesse sentido, as ações de promoção à saúde voltadas para essas áreas são estabelecidas através de processos de trabalho, que se concretizam em espaços sociais. A abordagem direcionada à adoção de alimentação saudável e prática de atividade física torna-se imprescindível, tendo em vista que as evidências científicas demonstram que estes fatores estão envolvidos com o desenvolvimento de obesidade, DM2, doenças cardiovasculares, além de câncer, doenças da cavidade bucal e osteoporose¹⁰.

Transpondo-se para o contexto da Atenção Primária à Saúde (APS), percebe-se que as ações preventivas em indivíduos com alto risco de desenvolver diabetes são incipientes ou ocorrem de maneira individualizada. Na maioria das vezes, a abordagem individualizada se restringe ao atendimento no consultório, onde se faz uso de terapêutica medicamentosa, limitando-se, portanto, ao atendimento dos indivíduos com diagnóstico prévio de diabetes. Fato, que sinaliza a necessidade de reavaliação das práticas profissionais no âmbito da Atenção Básica.

A tecnologia da estratificação de risco surge portanto, como parte dos macroprocessos básicos preconizados para o trabalho no âmbito da APS, possibilitando identificar as gradações de risco, priorizar situações de maior urgência e evitar ou postergar o aparecimento de doenças^{11, 12}.

Entende-se a relevância social deste estudo quando se busca analisar a estratificação do risco de DM2 como subsídio de ações de promoção à saúde e prevenção à doença, baseadas na equidade e na priorização, favorecendo o estímulo para mudanças no estilo de vida. Sob outro prisma, sua importância acadêmica e profissional emerge quando evidencia que trabalhar de forma preventiva é uma ação complexa que permeia a atenção intersetorial e multidisciplinar, indicando formas de ações com menos custo e mais eficiência.

O objetivo desta pesquisa é analisar a importância da estratificação do risco de desenvolver DM2 como estratégia para prevenção no campo da saúde coletiva.

MÉTODOS

Estudo epidemiológico, quantitativo com abordagem descritiva e analítica, realizado no Distrito de Dourados, município de Horizonte – Ceará, no período de agosto de 2015 a março de 2016, uma com uma população de 30 a 69 anos de idade de ambos os sexos.

O município de Horizonte está localizado na Região Metropolitana de Fortaleza a 40,1 km da capital cearense. Possui 20 equipes da Estratégia de Saúde da Família, sendo 19 na sede e 04 na zona rural do município. Possui uma área geográfica de 191,9 km² dividida em quatro distritos: Aningas, Dourados, Queimadas e Sede13. Com mais de 54 mil habitantes, a cidade ocupa a 8ª colocação no grupo de municípios mais populosos da Região Metropolitana de Fortaleza e seu crescente desenvolvimento populacional é consequência da qualidade de pólo industrial atribuído à cidade¹⁴. O município contabiliza 1.950 pessoas com DM2 cadastradas nessas equipes, destas, 1.582 (81 %) são acompanhadas com frequência mensal¹⁵. Dourados faz parte da zona rural e é assistida por uma equipe de Saúde da Família, pela Equipe Multiprofissional de Assistência Domiciliar, além dos profissionais que compõem o Núcleo de Apoio à Saúde da Família, a Residência Integrada em Saúde e a Academia da Saúde.

Segundo dados do IBGE (2010), o município de Horizonte tem uma população de aproximadamente 18 mil famílias num total de quase 56 mil pessoas, destas, estimam-se, de acordo com a faixa etária estabelecida para este estudo, 30 a 69 anos, um quantitativo de 27.560 pessoas, que corresponde a 40,5% da população para ambos os sexos. Dados do Sistema de Informação da Atenção Básica - SIAB¹⁵ mostram que a população do distrito de Dourados possui 1.578 famílias com aproximadamente 5.272 pessoas. Escolheu-se o Distrito de Dourados por ser a área com maior número de famílias cadastradas; possui a terceira maior população na faixa etária de 30 a 69 anos de idade, 1.420 pessoas; e o segundo maior número de pessoas com DM cadastradas por Unidade Básica de Saúde¹⁵.

Após realização do cálculo de 40,5% do número de pessoas do distrito, o resultado foi de 2.109 pessoas para fins dos cálculos amostrais.

A amostra do estudo foi calculada a partir da fórmula indicada para o cálculo em estudos transversais de população finita¹⁶, considerando-se um coeficiente de confiança de 95%, erro amostral de 5% e a prevalência dos fatores de risco para DM2 de 50% (p=50% q=50%). Esse valor proporciona o tamanho máximo de amostra que foi de 325 usuários, acrescido de 10% para evitar as possíveis perdas e/ou desistências, resultando em uma amostra final de 358 participantes. Porém, alguns ACS, obedecendo a quantidade de pessoas na faixa etária das famílias, aplicaram mais 21 questionários totalizando 371 participantes.

A escolha das pessoas a submeter-se a pesquisa foi feita a partir das Fichas “A” pois são formulários que dão estrutura ao trabalho das equipes da Atenção Básica com o intuito de produzir dados para a composição do SIAB e são utilizadas para cadastrar as famílias, fazer o acompanhamento dos usuários em domicílio e registrar as atividades, procedimentos e notificações das pessoas em suas áreas adscritas nos territórios. Desta forma, houve facilidade em se eleger as que nasceram entre 1985 e 1946 (30 a 69 anos de idade) a partir da leitura de seus prontuários familiares. Os números dos prontuários das nove microáreas com pessoas incluídas na faixa etária em estudo foram digitados no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18.0, onde se utilizou a aleatorização para se eleger os participantes, por domicílio, obedecendo aos critérios de inclusão: ter idade entre 30 e 69 anos de idade e estar em seu domicílio no momento da pesquisa e de exclusão: ter diagnóstico prévio de diabetes tipo 1 ou 2 e/ou possuir alguma condição crônica como gestantes, incapacidades físicas, pessoas acamadas entre outras, que pudesse interferir diretamente nas medições antropométricas.

Nos casos em que os participantes escolhidos se recusaram a responder o questionário ou não estavam em sua residência no momento da visita do ACS, foram buscados novos participantes, até que se atingisse o número da amostra final.

Para coletar os dados, utilizou-se o *Finnish Diabetes Risk Score – FINDRISK*, questionário finlandês de escore de risco, amplamente divulgado pela internet, que pode ser acessado e respondido por qualquer pessoa, sendo emitida, ao final, a pontuação resultante e o risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 em 10 anos¹⁹. Trata-se de uma ferramenta de triagem prática para estimar o risco de DM2 e a probabilidade do diabetes assintomático sem a necessidade de testes de laboratório. Validado pelo Departamento de Saúde Pública da Universidade de Helsinque, na Finlândia, esse questionário mostrou sensibilidade de 81% e especificidade de 76%¹⁷ para a população daquele país. No Brasil, este questionário vem sendo utilizado em pesquisas realizadas por diferentes áreas da saúde, como doenças cardiovasculares, obesidade e metabólicas, por ser um instrumento de fácil cálculo e de baixo custo¹⁸, no qual as variáveis investigadas são consideradas universais para a temática em estudo, sendo, portanto, adequado para pesquisas em variados cenários, independente do país no qual reside a população a ser investigada. O *FINDRISK* é composto por oito itens que englobam informações quanto à idade, pressão arterial, índice de massa corporal (IMC), circunferência da cintura, atividade física, dieta, uso de medicação anti-hipertensiva, história de glicose no sangue elevada e história familiar de diabetes.

O Risco para desenvolver DM 2 em dez anos segundo o *FINDRISK* obedece os seguintes escores padronizados: ≤ 7 pontos - risco baixo, isto estima que 1 a cada 100 pessoas desenvolverá a doença; de 7 a 11 pontos - risco pouco elevado, com estimativa de 1 em cada 25 pessoas desenvolverá a doença; de 12 a 14 - risco moderado, ou seja, 1 em cada 6 pessoas desenvolverá a doença; de 15 a 20 pontos - risco alto, estima que

1 a cada 3 pessoas desenvolverá a doença; e, > 20 pontos, risco muito alto, 1 em cada 2 pessoas desenvolverá a doença.

Para mensurar o peso, altura e circunferência abdominal dos participantes foram utilizadas balanças digitais portáteis da marca *Your Way*, com capacidade de 180 kg e precisão de 0,1 kg, e fitas métricas inelásticas da marca NYBC, com comprimento de 150 cm.

Para a realização dos procedimentos antropométricos foi construído um Protocolo de Operação Padrão – POP baseado no Manual de Antropometria do IBGE¹⁹.

Os demais dados foram coletados mediante entrevista com os participantes da pesquisa e tabulados com dupla digitação em planilha do programa *Microsoft Excel®* e exportados ao software SPSS, versão 18.0, para processamento dos dados e analisados de forma descritiva, utilizando-se as frequências absolutas e percentuais.

Esta pesquisa abordou como variável desfecho: Risco de Desenvolver DM2 em 10 anos: Nenhum/Baixo/Moderado (<15) e Alto/Muito Alto (≥15). As variáveis explicativas foram distribuídas em: sociodemográficas: sexo (masculino e feminino) e idade (≥45 anos); estilo de vida: atividade física (pelo menos 30 minutos ao dia) e ingestão de frutas e verduras (consumo diário); e clínicas: peso e altura (utilizados para calcular o IMC); IMC normal (<25Kg/m²) e sobrepeso/obesidade (≥25Kg/m²); circunferência abdominal: normal (mulheres <80cm e homens <94cm), risco aumentado ou muito aumentado (mulheres >88cm e homens 102cm); uso de medicação anti-hipertensiva: medido a partir da informação sobre o uso ou não de medicamentos anti-hipertensivos; história de glicose alterada: medida a partir da informação da existência ou não de elevação de níveis glicêmicos sanguíneos; e história familiar de DM: medida a partir da informação sobre a existência ou não de familiar com diagnóstico de Diabetes *mellitus* tipo 1 ou tipo 2.

Para comparação das características associadas ao desfecho, foi utilizada a estatística inferencial, com o cálculo das razões de prevalências (RP), utilizando-se a regressão de Poisson ao nível de significância de 5%.

A Pesquisa considerou os preceitos éticos estabelecidos pela Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012⁶ que versa sobre Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual do Ceará – UECE, sob parecer nº 1.206.470. Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e a forma de condução da pesquisa; e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, em duas vias, onde declaram estarem cientes da finalidade da pesquisa e autorizaram o uso das informações prestadas para fins científicos.

RESULTADOS

Nesta pesquisa, participaram 371 pessoas moradoras da localidade de Dourados

situado no Município de Horizonte - Ceará, na faixa etária de 30 e 69 anos.

A estratificação do risco de desenvolver DM2 utilizando o *FINDRISK* foi fácil e de baixo custo. Os agentes comunitários de saúde participaram da coleta de dados de forma precisa após a utilização do POP.

Entre as prevalências encontradas, a maioria foi: 318 (85,7%) para nenhum/baixo/moderado risco de desenvolver DM2 em dez anos; 248 (66,8 %) do sexo feminino; 218 (59%) tinham idade acima de 45 anos, com média de 44,4 anos ($dp \pm 9,7$); 267 (72%) IMC elevado; 284 (77%) circunferência abdominal aumentada; 202 (54%) praticavam atividade física; 250 (67%) não comiam verduras e/ou frutas regularmente; 297 (80%) não tomavam medicamentos anti-hipertensivos; 342 (92%) não tinham registro de glicose elevada e 194 (52%) tinham familiar com de DM tipo 1 ou tipo 2 (Tabela 1).

VARIÁVEIS	<i>f</i>	%
Risco para DM2		
< 15	318	85,7
≥ 15	53	14,3
Sexo		
Masculino	123	33,2
Feminino	248	66,8
Idade ≥ 45 anos		
Sim	218	59,0
Não	153	41,0
Índice de Massa Corpórea		
Normal	101	27,0
Sobrepeso	153	42,0
Obesidade	117	31,0
Circunferência Abdominal		
Normal	79	22,0
Risco Aumentado	78	21,0
Risco Muito Aumentado	214	57,0
Pratica atividade física		
Sim	201	54,0
Não	170	46,0
Come frutas/verduras diariamente		
Sim	122	33,0
Não	249	67,0
Toma anti-hipertensivos		
Sim	74	20,0
Não	297	80,0
História de glicose alterada		
Sim	29	8,0

	Não	342	92,0
História familiar de DM2			
	Sim	194	52,0
	Não	177	48,0

Tabela 1. Caracterização dos participantes segundo o risco e as variáveis sociodemográficas, estilo de vida e clínicas. Horizonte, Ceará, 2015.

Fonte: Própria pesquisa.

Realizaram-se associações entre o risco de desenvolver DM2 em dez anos e as variáveis sociodemográficas, clínicas e estilo de vida (Tabela 2).

VARIÁVEIS	CLASSIFICAÇÃO DO RISCO DE DM2						p
	Total	Alto/ Muito Alto		Nenhum Baixo/Moderado		p	
		f	%	f	%		
Sexo							
Feminino	248	45	18,1	203	81,9	0,005	
Masculino	123	09	7,3	114	92,7		
Idade ≥ 45 anos							
Sim	218	35	22,9	118	77,1	< 0,001	
Não	153	19	8,7	199	91,3		
IMC							
Normal < 30	251	22	8,8	229	91,2	< 0,001	
Obesidade ≥ 30	120	32	26,7	88	73,3		
Circunferência Abdominal							
Aumentado	292	53	18,2	239	81,8	< 0,001	
Não Aumentado	79	01	1,3	78	98,7		
Pratica atividade física							
Sim	201	25	12,4	176	87,6	0,209	
Não	170	29	17,1	141	82,9		
Come frutas/verduras diariamente							
Todo dia	122	16	13,1	106	86,9	0,582	
Não todo dia	249	38	15,3	211	84,7		
Toma anti-hipertensivos							
Sim	74	32	43,2	42	56,8	< 0,001	
Não	297	22	7,4	275	92,6		
História de glicose alterada							
Sim	29	17	58,6	12	41,4	< 0,001	
Não	342	37	10,8	305	89,2		
História familiar de DM2							
Sim	194	51	26,3	143	73,7	< 0,001	
Não	177	03	1,7	174	98,3		

Tabela 2. Associação entre o risco de desenvolver DM2 em dez anos e as variáveis sociodemográficas, clínicas e estilo de vida. Horizonte, Ceará, 2015.

Fonte: Própria pesquisa.

Em relação aos participantes que apresentaram risco Alto/Muito Alto em desenvolver DM2 em dez anos verificou-se que a pluralidade foi: sexo feminino 45 (18,1%); idade ≥ 45 anos, 35 (22,9%); apresentavam obesidade (IMC ≥ 30), 32 (26,7%); circunferência abdominal aumentada, 53 (18,2%); não praticavam atividade física, 29 (17,1%); não comiam frutas/verduras diariamente, 38 (15,3%); tomavam anti-hipertensivos, 32 (43,2%); não tinham história de glicose alterada, 37 (10,8%) e tinham história familiar de DM2, 51 (26,3%).

DISCUSSÃO

O alto risco para desenvolver DM2 pressupõe condições em que o indivíduo está abaixo do nível de pré-diabetes (situação em que a glicose sanguínea está acima dos valores de referência normais, mas ainda sem diagnóstico de diabetes). Desta forma pessoas com alto risco para DM2 correm mais risco do aparecimento da doença²⁰. Para estes casos, recomenda-se que seja feito rastreamento com o objetivo de conhecer a história progressiva da pessoa; realizar o exame físico, incluindo a verificação de pressão arterial, de dados antropométricos (peso, altura e circunferência abdominal) e do cálculo do IMC; identificar os fatores de risco para DM; avaliar as condições de saúde e solicitar os exames laboratoriais necessários que possam contribuir para o diagnóstico e decisão terapêutica ou preventiva²¹.

Em relação à variável sexo, este estudo mostra que a maioria foi do sexo feminino e o risco de desenvolver DM2 em dez anos foi alto/muito alto. Estes dados assemelharam-se às fontes encontradas na literatura²². Em contraposição a estas fontes, outros autores apontam para a maioria era do sexo masculino¹. Em outro estudo evidenciou-se uma paridade aproximada entre os sexos²². Não existe, ainda, consenso, nos estudos pesquisados, de prevalência em relação ao sexo para DM2.

A explicação para os achados majoritários para o sexo feminino, foram evidenciados em pesquisas, sugerindo que a participação destas nas pesquisas se dá pelo fato de serem mais preocupadas com a saúde do que os homens²³.

Dentre os participantes desta pesquisa, 14,3% apresentaram risco alto e muito alto risco para desenvolver DM2 nos próximos 10 anos. Estes resultados são diferentes dos encontrados em outros estudos realizados no mundo inteiro, conforme citação na literatura: Espanha (19,5%)²⁴; Portugal (12,8%)²⁵; Cuba (10,5%)²⁶ e Noruega (28,5%)²⁷.

No Brasil, foram encontradas prevalências em Colantina - ES (27%)²⁷ sendo a menor prevalência encontrada no município de Tubarão - SC (3,8%)²⁸.

No Nordeste, encontraram-se estudos em Campina Grande – PB²⁹; Picos – PI²⁷; contudo, estas pesquisas não relataram o alto risco para DM2.

No Ceará, identificou-se estudo semelhante, (11,7%) no município de Itapipoca¹⁰. Em Fortaleza pesquisadores determinaram a frequência dos fatores de risco, porém não

determinaram a prevalência em alto/muito alto risco em desenvolver DM2 em dez anos^{29,30}.

Diante dos valores encontrados nesta pesquisa, presume-se não existir um percentual determinado para se calcular o risco alto/muito alto para desenvolver DM2 em dez anos, estando esse valor diretamente relacionado à população estudada e seus fatores de risco pesquisados.

Verificando-se a existência de associação entre o risco de desenvolver DM2 em dez anos e as variáveis sociodemográficas e clínicas, observou-se significância estatística ($p < 0,05$), sugerindo que estes fatores estão presentes em pessoas com alto/muito alto risco para DM2.

Em outros estudos foi evidenciado que a probabilidade de apresentar diabetes ou um estado intermediário de glicemia alterada dependendo da presença de fatores de risco¹. Também foi encontrada significância estatística, nas mesmas variáveis, em estudos realizados em Campina Grande²⁹, Itapipoca e Fortaleza¹⁸. Outros autores também investigaram os mesmos fatores de risco pra DM2, evidenciando suas prevalências e significância estatística²¹.

Em relação às variáveis clínicas antropométricas, os valores de IMC indicam que a maior parte dos entrevistados está com sobrepeso e obesidade, enquanto os valores da circunferência Abdominal mostraram que a maioria dos entrevistados apresentou risco muito aumentado para doenças metabólicas como obesidade, diabetes, hipertensão e infarto.

A elevada prevalência de indivíduos com DM acima do peso e/ou com predomínio de circunferência abdominal aumentada foram encontradas em pesquisas epidemiológicas⁴.

Desta forma, percebe-se que existe uma associação entre a atividade física e a alimentação que interfere nas medidas antropométricas e, conseqüentemente, nos riscos de desenvolver DM2.

Os resultados apontaram para a importância de se utilizar a estratificação de risco por meio de instrumentos para nortear as ações preventivas e de promoção da saúde no âmbito da APS, pois desta forma permite-se a participação direta das pessoas, envolvendo-as no empoderamento pelo acesso a educação e informação sobre seu estado de saúde³¹.

Evidenciou-se, ainda, a viabilidade de obter-se a estratificação do risco de desenvolver DM2 utilizando o questionário *FINDRISK*, por ser um instrumento prático, de baixo custo, sem necessidade de exames laboratoriais e de fácil utilização por profissionais no âmbito da atenção primária em saúde, constituindo uma tecnologia leve e útil na práxis do trabalho em saúde, possibilitando à equipe de saúde desenvolver medidas de promoção de saúde à partir da quantificação e do agrupamento das pessoas pelo risco de desenvolver a doença.

CONCLUSÕES

O estudo foi realizado no cenário da Estratégia de Saúde da Família, utilizando-se como ferramenta de investigação o questionário *FINDRISK*, que possibilitou evidenciar, na população investigada, alta prevalência de fatores de risco não modificáveis: sexo feminino, idade ≥ 45 anos e história familiar com DM tipo 1 ou tipo 2; e fatores de risco modificáveis para DM2: obesidade central, sobrepeso/obesidade e alimentação inadequada.

Percebeu-se que o estilo de vida interfere nos fatores de risco modificáveis, elevando os escores para o diabetes tipo 2. O IMC, a medida da circunferência abdominal e a alimentação inadequada foram os achados mais significativos na amostra, que impactam negativamente, contribuindo para o aparecimento da doença e suas co-morbidades, podendo acarretar distúrbios emocionais e alto custo financeiro à sociedade.

Ao final, estratificou-se o risco para DM2 na população, observando-se que, exceto um participante, todos apresentaram algum risco em desenvolver DM2, embora a maioria tenha evidenciado risco baixo/moderado.

Contudo, percebe-se que a dificuldade em desenvolver ações de prevenção e promoção da saúde, permeia pela desordem no atendimento ainda pautado na doença, na divisão da demanda. Em contraponto a estratificação de risco ordena a assistência classificando e agrupando as pessoas pela necessidade imediata e tardia de cuidados, permitindo o desenvolvimento de atividades individuais e grupais, pois permite identificar a quantidade e as pessoas que apresentam risco para desenvolver doenças a fim de prevenir ou postergar o aparecimento de DM2 nas comunidades adscritas.

Espera-se que este estudo possa contribuir para adoção de medidas preventivas e de promoção da saúde por meio de planos terapêuticos individualizados ou coletivos com foco na clientela de maior risco, acompanhados por equipes multiprofissionais que possibilitem a conscientização sobre os fatores de risco, mudança no estilo de vida e hábitos saudáveis.

Portanto, sente-se a necessidade de realizar a estratificação de risco no cotidiano das equipes de saúde da família, evidenciando a identificação de precoce do risco em nível primário ou secundário, possibilitando planejar e desenvolver ações direcionadas a promoção e prevenção da saúde.

É necessário, entretanto, que os profissionais de saúde estejam capacitados para implantar em seus serviços as estratificações adequadas para as doenças crônicas, a fim de não apenas quantificar a frequência dos fatores de risco, mas implementarem medidas preventivas das condições que possuem alta morbimortalidade.

REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Type 2 Diabetes Risk Test. Estados Unidos da América. [INTERNET]. Disponível em: <http://www.diabetes.org/are-you-at-risk/diabetes-risk-test/?referrer=https://www.google.com.br/>.
2. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva; 1999.
3. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – Relatório nº 103. Insulinas análogas de longa ação Diabetes Mellitus tipo II. Brasília: Ministério da saúde, 2014.
4. Sociedade Brasileira de Diabetes. Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2, 2014. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/attachments/posicionamento/posicionamento-sbd-n-04-2014.pdf>.
5. Ferreira SRG, Pititto BA. Aspectos epidemiológicos de Diabetes Mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade. In: Diabetes na Prática Clínica, Sociedade Brasileira de Diabetes, ebook 2.0, módulo 1, cap.1, 2015. Disponível em: <http://ebook.diabetes.org.br/>.
6. Ribeiro AG, Cotta RMM, Ribeiro SMR. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Ciênc. saúde coletiva, vol.17, no.1, Rio de Janeiro, Jan, 2012.
7. Leite SAO, Umpierrez G. Prevenção primária do Diabetes tipo 2: como traduzir os resultados de estudos clínicos para aplicação na saúde pública. In: Diabetes na Prática Clínica, Sociedade Brasileira de Diabetes, e-book 2.0, mod. 3, cap.3, 2015. Disponível em: <http://ebook.diabetes.org.br/>.
8. Marinho NBP. Avaliação do Risco para Diabetes Mellitus tipo 2 entre adultos de Itapipoca – Ceará, [Dissertação], Itapipoca (CE): Universidade Federal do Ceará, 2010.
9. Monken M, Barcellos C. O Território na Promoção e Vigilância em Saúde. Promoção, Prevenção e Vigilância da Saúde: conceitos e estratégias. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2016. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/pdts/index.php?livro_id=6&area_id=2&autor_id=&capitulo_id=22&arquivo=ver_conteudo_2
10. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Atenção Básica. – Brasília, DF. 2012. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/pnab.pdf>.
11. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Acolhimento à demanda espontânea. Cadernos de Atenção Básica nº. 28, V. 1, 1ªed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/acolhimento_demanda_espontanea_cab28v1.pdf.
12. Mendes, EV. A construção social da atenção primária à saúde. Brasília: Conselho Nacional de Secretários de Saúde – CONASS, 2015. Disponível em: <http://www.conass.org.br/biblioteca/a-construcao-social-da-atencao-primaria-a-saude>.
13. Cândido JAB. Fatores de risco para diabetes mellitus tipo 2. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará, 2016.

14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico do Ceará, [INTERNET], 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=8>.
15. Ministério da Saúde (BR). Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Sistema de Atenção da Atenção Básica, SIAB. 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?siab/cnv/SIABSCE.def>.
16. Santos GE de O. *Cálculo amostral*: calculadora on-line. [INTERNET] Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>.
17. Lindstrom J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical score to predict risk of type two diabetes. US National Library of Medicine National Institutes of Health, PubMed. Diabetes Care. USA, 2003;26(3):725-31. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610029>.
18. Marinho NBP, Vasconcelos HCA de, Alencar MPG, Almeida PC de, Damasceno MMC. Risco para Diabetes *mellitus* e fatores associados. Acta Paul Enferm. vol.26 n.6 São Paulo Nov./Dec. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002013000600010.
19. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual de antropometria. **Pesquisa nacional de saúde**, 2013. Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.
20. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Saúde Suplementar. Manual técnico para promoção da saúde e prevenção de riscos e doenças na saúde suplementar, 4. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro : ANS, 2011. Disponível em: http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/manual_promoprev_web.pdf.
19. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: Diabetes Mellitus. Cadernos de Atenção Básica, n. 36. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategias_cuidado_pessoa_diabetes_mellitus_cab36.pdf.
20. Petermann XB, Machado IS, Pimentel BN, Miolo, SB, Martins LR, Fedosse E. Epidemiologia e cuidado à Diabetes Mellitus praticado na Atenção Primária à Saúde: uma revisão narrativa, 2015. Rev. Saúde, 2015. Vol.41, n.1, Jan./Jul. 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasauade/articulo/view/14905/pdf>.
21. Medeiros CCM, Bessa GG, Coura AS, França ISX de, Sousa FS de. Prevalência dos fatores de risco para diabetes mellitus de servidores públicos. Rev. Elet. de Enferm.[Internet]. 2012 jul/sep;14(3):559-69. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v14/n3/v14n3a12.htm>.
22. Barros CR, Cezaretto A, Salvador EP, Santos TC, Siqueira-Catania A, Ferreira SRG. Implementation of a structured healthy lifestyle program to reduce cardiometabolic risk. Arq Bras Endocrinol Metab. 2013;57(1):7-18. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440094>.
23. Diabetes Foundation. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. Clinical Diabetes Journals. 2011;29:116-22. Disponível em: <http://clinical.diabetesjournals.org/content/29/3/116>. Acesso em: 15.06.2016.
24. Sartorelli DS, Franco LJ, Cardoso MA. Intervenção nutricional e prevenção primária do diabetes mellitus tipo 2: uma revisão sistemática. Cad Saude Publica. 2006;22(1):7-18. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006000100002.

25. Naranjo AA, Rodríguez ÁY, Llera RE, Aroche R. Diabetes risk in a cuban primary care setting in persons with no known glucose abnormalities. *Medicc Review*. 2013;15(2):16-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686250>.
26. Hjellset VT, Bjorge B, Eriksen HR. Risk Factors for Type 2 Diabetes Among Female Pakistani Immigrants: The InvaDiab-DEPLAN Study on Pakistani Immigrant Women Living in Oslo, Norway. *J. Immigrant Minority Health*. 2011;13(1):101-10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779820>.
27. Bruno A, Pereira LR, Almeida H dos S. Avaliação da prevalência de fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 em pacientes da Clínica Unesc Saúde. Espírito Santo. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 2014; 9(3); 661-680. Disponível em: <http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/demetra/article/view/10659#.Vm7EuvkrLIU>.
28. Bittencourt A, Vinholes DB. Estimativa do risco para diabetes mellitus tipo 2 em bancários da cidade de Tubarão, estado de Santa Catarina, Brasil. *Scientia Medica*, 2013; 23(2):82-9. Disponível em: <http://revistas eletrônicas. pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/12756/9660>.
29. Vasconcelos HCA, Araújo MFM, Damasceno MMC, Almeida PC, Freitas RWJF. Fatores de risco para diabetes mellitus tipo 2 entre adolescentes. *Rev Esc Enferm. USP*, 2010; 44(4):881-7. Disponível: <http://www.scielo. br/pdf/reeusp/v44n4/04.pdf>.
30. Lima ACS, Araújo MFM, Freitas RWJF, Zanetti ML, Almeida PC, Damasceno MMC. Fatores de risco para *diabetes mellitus* tipo 2 em crianças. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 18(5):[08 telas]18(5set-out 2010). Disponível: www.eerp.usp.br/rlae.
31. Lopes MSV, Saraiva KRO, Fernandes AFC, Ximenes LB. Análise do conceito de promoção da saúde. *Rev. Texto Contexto Enferm.*, Florianópolis, 2010 Jul-Set; 19(3): 461-8.

CAPÍTULO 10

COMPORTAMENTO E HÁBITOS DAS CORUJAS BURAQUEIRAS *ATHENE CUNICULARIA*: COMPILAÇÃO DAS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Data de aceite: 01/07/2021

Nari Victoria Takahashi

Graduanda em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal – FACIMED

Andréa Fagundes Grava

Orientadora PhD Biotecnologia em Saúde/ Biologia Molecular e Professora do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal – FACIMED

RESUMO: A *Athene cunicularia*, conhecida como coruja buraqueira é uma das corujas mais comuns no Brasil, destacam-se pela proximidade com o homem e adaptação ao meio urbano. Esta espécie apresenta habituação à presença de humanos perto de seus ninhos, dependendo do grau de perturbação de seu ambiente. Diante disso, o trabalho tem como objetivo descrever o habitat, comportamentos e hábitos das corujas buraqueiras a partir de um levantamento bibliográfico dos últimos 10 anos tendo com plataforma de pesquisa revistas científicas através do Google Acadêmico, SCIELO e Lilacs. Entre os cuidados parentais, o comportamento dos casais de corujas buraqueiras é influenciado pela variação do clima durante o dia. A condição tempo, no caso no período onde ocorrem mais ventos é preferencialmente o momento que os filhotes planam no ar. A característica dócil da coruja buraqueira acaba prejudicando um pouco a espécie por conta dos locais onde elas fazem

os ninhos. Adultos e filhotes são facilmente encontrados em frente ao ninho ou pousados em postes e montes de terra próximos do seu abrigo. A toca é um importante artifício na vida das corujas buraqueiras, sendo usado para nidificação, refúgio contra inimigos, armazenamento de alimento e proteção. A importância de seu modo de vida está relacionada à manutenção do ecossistema local, assim como controle da cadeia alimentar beneficiando outras espécies, incluindo o homem.

PALAVRAS - CHAVE: Albinismo, Cuidado Parental, representações Socioculturais, hábitos noturnos, Cadeia Ecológica.

BEHAVIOR AND HABITS OF BURROWING OWL *ATHENE CUNICULARIA*: COMPILATION OF BIBLIOGRAPHIC PRODUCTION

ABSTRACT: The *Athene cunicularia*, known as burrowing owl is one of the most common owls in Brazil, it out stands for the proximity with man and adaptation to the urban environment. This species presents habituation in the presence of humans near their nests, depending on the degree o disturbance of their environment. The aim of this task is to describe the habitat, behaviors and habits of *Athene cunicularia* owls, based on a bibliographical survey of the last 10 years, with research platform and scientific journals through Google Scholar, SCIELO and Lilacs. Among parental care, the behavior of couples of *Athene cunicularia* owls is influenced by the variation of the climate during the day. The time condition, in this case in the period where there is more wind, this is the moment where the

young owls glides in the air. The docile characteristic of the *Athene cunicularia* owls ends up harming the species a little because of the places where they make their nests. Adults and young owls are easily found in front of the nest or perched on poles and heaps of land near their burrows. The burrow is an important artifice in the life of *Athene cunicularia* owls, being used for nesting, refuge against enemies, food storage and protection. The importance of their way of life is related to the maintenance of the local ecosystem, as well as control of the food chain benefiting other species, including man.

KEYWORDS: Albinism, Parental Care, social-cultural representations, nocturnal habits, Ecological Chain.

1 | INTRODUÇÃO

A coruja-buraqueira é a coruja mais conhecida e abundante do Brasil. Pode ser encontrada em qualquer área aberta ou semi-aberta, como campos naturais, restinga em praias, pastagens, gramados e terrenos baldios em áreas urbanas. Possuem hábitos diurnos e noturnos. Como seu próprio nome diz, é uma espécie terrícola cavam os seus próprios ou reformam ninhos abandonados por outros animais. Por isso, é comum encontrar adultos e filhotes em cima de montes de terra, cercas, fios e postes, ou no solo próximos aos ninhos. Elas caçam artrópodes, pequenos roedores, répteis e aves (BASTIAN, 2008; MENQ, 2018).

A coruja se alimenta principalmente de insetos (besouros, libélulas, grilos, mariposas), aranhas e outros invertebrados. Em menor frequência caça roedores, morcegos, répteis e anfíbios. Um casal de corujas buraqueiras consome de 12.300 a 26.200 de insetos, e de 540 a 1.100 roedores por ano. Essa espécie de coruja é basicamente insetívora em relação à quantidade de presas consumidas, mas em relação à biomassa pode ser considerada como predadora de pequenos roedores. (MENQ, 2018).

Dispõem de uma excelente audição e boa visão para localizar suas presas pode virar a cabeça em ângulo de até 270°, compensando assim o estreito campo visual oferecido pelos olhos em disposição frontal (SIGRIST, 2013). Esta espécie possui plumagem cor de terra, às vezes, avermelhado dependendo do local onde a coruja está fazendo o seu ninho, pesando de 145 a 185 g e medindo cerca de 30 cm (SICK, 1997).

A coruja buraqueira fêmea coloca de 6 a 11 ovos, com período de incubação de 28-30 dias. A fêmea é responsável pela incubação, enquanto o macho pela entrega de alimento ao ninho. Estas consistem em um túnel que termina em uma câmara de ovipostura, geralmente forrada de capim, esterco ou mesmo restos de papel e outros resíduos encontrados em ambiente urbano. Os filhotes começam a se aventurar para fora do ninho com 14 dias de vida, normalmente ficam na entrada do buraco aguardando os adultos. Já com 44 dias de vida, os filhotes saem do ninho, e com 49-56 dias aprendem a caçar (MENQ, 2018).

O presente trabalho é um levantamento bibliográfico que visa descrever o habitat, comportamentos e hábitos das corujas buraqueiras (*Athene cunicularia*) a partir de estudos

realizados entre 2008 a 2018.

2 | METODOLOGIA

Este estudo constitui em uma revisão bibliográfica sobre as corujas buraqueiras (*Athene cunicularia*), tendo com plataforma de pesquisa o Google Acadêmico, SCIELO e revista científicas, utilizando as palavras chave: comportamento das corujas buraqueiras, riqueza e abundancia das corujas buraqueiras, *Athene cunicularia* copro necrófagos, importância ecológica da coruja buraqueira, coruja buraqueira e *Athene cunicularia*.

Durante a pesquisa foram encontrados alguns artigos científicos, utilizando como critério de inclusão o período de 2008 a 2018. Foram selecionados esses artigos por se referir-se ao modo que as corujas buraqueiras se comporta em qualquer ambiente.

3 | REFERENCIAL TEORICO

Nas escolas durante as aulas de ciências e biologia os professores poderiam ensinar os alunos a começarem a preservar o meio ambiente e cuidar dos locais onde são encontrados esses animais, incluindo os ninhos das corujas buraqueiras para que o ecossistema seja preservado e assim a manutenção do meio ambiente e da cadeia alimentar seja controlado (SANTOS et al., 2017).

Segundo Gomes, Barreiros & Santana (2013), perceberam que está tendo registros de *Athene cunicularia* na região central do estado do Amazonas por conta do desmatamento desenfreado que vem acontecendo nessa região, por conta de áreas de pastagens e terrenos para a agricultura. As corujas buraqueiras não são comuns em áreas de florestas, elas são mais vistas em áreas onde não tem muita concentração de florestas. Até então não tinha registros dessas corujas no estado do Amazonas, entre 2010 e 2012 começaram a aparecer algumas famílias de *A. cunicularia* em alguns pontos da região central do estado do Amazonas.

Perillo e colaboradores (2012) e Scobiell, Baynel, Wellicome (2014), as *A. cunicularia* (coruja buraqueira) escolhem para fazer os ninhos, que são locais bastante movimentados de pessoas, como campus de Universidades, áreas de pastos, terrenos abandonados, terrenos para a agricultura, aeroportos e locais próximos as estradas, são esses locais que os seres humanos deverão tomar cuidado para proteger os locais onde as corujas buraqueiras escolhem para fazerem os ninhos e geralmente esses ninhos são protegidos por órgãos ambientais para que a população não destrua.

Segundo Rodrigues e Dantas (2008) as *Athene cunicularia* apresentam uma excelente visão tanto diurna quanto crepuscular. Esses pesquisadores chegaram a essas respostas pelo teste que realizaram usando uma luz aplicada de cor branca onde foram usadas sete corujas e nenhuma delas apresentaram alguma diferença. O teste foi realizado

para testar o estímulo fotópico e escotópico, esses estímulos foram executados após 20 minutos de adaptação ao escuro e 10 minutos de adaptação ao claro, e durante todos os testes as sete corujas não apresentou alguma diferença em suas visões, ambas as corujas conseguiram se adaptarem com as mudanças de claridade do ambiente.

As análises realizadas em diversos estudos através de tratamentos com egagrópilas, revelaram que as corujas buraqueiras se alimentam principalmente de folhas, gravetos, sementes, pequenos mamíferos, aves de pequeno porte, artrópodes, coleópteros, ortóptero, diplópodes e alguns artrópodes não identificados de acordo com Santos e colaboradores (2017), Faudez e colaboradores (2018) e Martinez & Junior (2018), estes corroboram com Menezes & Ludwig (2013), Bastian e colaboradores (2008), Menezes & Maira (2017), Gómez e colaboradores (2009), onde relatam que estas pelotas que as corujas regurgitam são os restos dos alimentos que não são digeridos no estomago delas.

Esses alimentos são os invertebrados (Coleópteros, Orthoptera, a classe Diplópode da ordem Polydesesmida e Artrópodes não identificados), Vertebrados (alguns mamíferos, aves de pequeno porte e ossos de vertebrados não identificados) também teve frequência de vegetais como folhas e sementes e de alguns minerais que ajudam na digestão das aves, onde mostravam a porcentagem de cada alimento que elas comem (MENEZES & LUDWIG, 2013).

Durante os estudos foram mostrados que as corujas buraqueiras tinham uma alta frequência de artrópodes na sua dieta. A dieta dessas corujas são baseadas em 100% de artrópodes, 96,0% de coleópteros, 93,3% de ortópteros, 13,3% de diplópodes, 6,6% de artrópodes não identificados são os invertebrados que as corujas consomem já de vertebrados são de 42,6%, de mamíferos 33,3%, aves 2,6% e vertebrados não identificados são de 6,6% já de minerais são de 1,3% e vegetais são de 56,0%, os minerais que foram encontrados nas pelotas são para ajudar na digestão das alimentações que as corujas consomem (MENEZES & LUDWIG, 2013).

Segundo Santos e colaboradores (2012), realizaram um estudo anatomo-topográfico do tubo digestório das espécies *Athene cunicularia* (Strigiformes, Strigidae) e *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae), para realizarem essa pesquisa foram doadas as duas espécies das corujas para analisar a anatomia de cada tubo digestório das corujas, onde mostra cada canal por onde a alimentação que essas corujas consomem passam, durante os estudos perceberam que não tinham muitas diferenças entre os tubos digestórios da *Athene cunicularia* e da *Tyto alba* onde teve poucas variações topográficas.

Froese (2016) durante as pesquisas foram estudos dois grupos de *Athene cunicularia* onde um grupo era selvagem e o outro era de cativeiro, no total foram observados 23 ninhos porém 12 ninhos tiveram algumas complicações como abandonos desconhecidos, inundações e predação, tanto no cativeiro quanto nos ninhos selvagens. Essa pesquisa também trata-se da dieta das corujas buraqueiras junto com o comportamento de reprodução das *A. cunicularia*.

Segundo Wellicomo e colaboradores (2014) a coruja buraqueira (*Athene cunicularia*) que se estiverem na época de reprodução no tempo de inverno elas migram para locais com a temperatura alta para cuidarem das proles, por conta das mudanças climáticas como tornados, granizos e chuvas fortes que podem danificarem os ninhos matando o casal e prole justas, isso acaba aumentando o trajetória das *Athene cunicularia* entre as pradarias do Canadá e do México central.

Nogueira & Alves (2011) a *Athene cunicularia* apresenta uma doença com o nome de “Leucismo” que ocorre só na ave fêmea da espécie, ocorre uma mutação no cromossomo W deixando a ave com as penas brancas, porém os olhos, o bico e as pernas tem a coloração igual de uma coruja normal. Essa anomalia acontece mas não prejudica em nada na vida dessas corujas elas acabam tendo uma vida normal como as outras corujas da espécie com a vantagem que elas conseguem se camuflarem em ambiente que nevam. As corujas com leucismo podem ser confundidas com a coruja albina mas por causa das cores dos olhos, bico e pernas elas não entram na categoria de albinismo.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante os estudos foi observado que há um grande estudo sobre a dieta da coruja buraqueira, enquanto não tem quase nada falando sobre o estudo das outras áreas que envolve o comportamento das corujas.

A vantagem de realizar um trabalho de levantamento bibliográfico é a possibilidade de estudo sobre a coruja buraqueira que existe, porém sempre é bom realizar mais trabalhos sobre elas pelo fato de sempre que vai fazer uma pesquisa os artigos que aparecem com mais frequência é sobre a dieta delas enquanto não tem quase nada falando sobre cuidado parental, doenças que são encontradas nas corujas, sobre testes que são realizadas com as corujas e sobre os locais onde elas fazem os ninhos.

REFERÊNCIAS

BASTIAN, A. M. S.; FRAGA, E. D.; GARCIA, S. A.; SANDER, M. Análise de Egagrópilas de Coruja Buraqueira, *Athene cunicularia* (MOLINA, 1782) No Câmpus da UNISINOS, São Leopoldo-RS (STRIGIFORMES: STRIGIDAE) **Biodivers. Pampeana**, v. 6, n. 2, 2008. <https://bit.ly/2Bq0FVx>. Acesso em: 02 de Agosto de 2018.

FAÚNDEZ, P.V., *et al.* Comparación de la dieta del pequén (*Athene cunicularia*) a nível intra e interespecífico en el desierto de Atacama, Chile. **Interciencia**. vol. 43 n° 2 February 2018. https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/03/93-VALLADARES-43_02.pdf Acesso em: 28 de Agosto de 2018.

FROESE, A. L.M. Breeding ecology and diet of captive-released and wild burrowing owls (*Athene cunicularia*) in southwestern Manitoba, Canada. **University of Winnipeg**, Canada. 2016. <https://bit.ly/2AajRoi>. Acesso em: 18 de Setembro de 2018.

GOMES, F. B. R.; *et al.* Novos registros da expansão geográfica de *Athene cunicularia* na Amazônia central com especial referencial as atividades humanas **Atualidade Ornitologia**. nº172 março/abril 2013. <https://bit.ly/2zop9gn>. Acesso em: 09 de Setembro de 2018.

GÓMEZ, H. E. V. *et al.* Do the winter diets of sympatric Borrowing owl and short eared owl overlap West central Mexico?. **Proceedings of the Fourth International**, pg.96-101 January 2009. <https://bit.ly/2Qb0upc> Acesso em: 09 de Setembro de 2018.

HOFLING, E.; CAMARGO, H.F.A. Aves no Campus. 3. ed. **Editora da Universidade de São Paulo**, São Paulo, Brasil. 1999. Acesso em: 09 de Agosto de 2017.

MARTINEZ, A. C. de. S. T. S.; JÚNIOR, G. de. B. F. Análise temporal da dieta de *Athene cunicularia* em Brasília-DF. **PUBVET**. v. 12, n. 8, p. 1-3, Agosto de 2018 <http://www.pubvet.com.br/uploads/3c202cc78ec09ed8c4481c0c3fdf6ccc.pdf> Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

MENQ, W. Coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*) - **Aves de Rapina Brasil 2018 in:** Motta- Junior, J. C. Relações tróficas entre cinco Strigiformes simpátricas na região central do Estado São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 14(4): 359-377. 2006, König, C. & Weick Owls of the world. 2º ed. **New Haven**, Connecticut: Yale University Press. 2008. Disponível em: http://www.avesderapinabrasil.com/athene_cunicularia.htm Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

MENEZES, L. N.; LUDWING, P. R. Diversidade alimentar da Coruja Buraqueira (*Athene cunicularia*) em ambiente antropomorfizado no município de Maracá/SP. **JHealth Sci. Inst.** 31 (4) 347-50, 2013. <https://bit.ly/2DQWAvX>. Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

MENEZES, L. N.; MAEIRA, N. T. de. Análise da ecologia alimentar da *athene cunicularia* (aves, strigidae) numa área sob influência antrópica no município de Assis-SP. **arq. Ciênc. Vet Zool.** UNIPAR. Umuarama. V. 15. N. 1, p. 37-41, jan/jun 2012. <http://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4165/2605>. Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

NOGUEIRA, D. M.; ALVES, A. S. A case of leucism in the burrowing owl *Athene cunicularia* (Aves: Strigiformes) with confirmation of species identity using cytogenetic analysis. **Sociedade Brasileira de Zoologia**. 28(1): 53-57, February 2011. <http://submission.scielo.br/index.php/zool/article/view/27738/3948>. Acesso em: 15 de Agosto de 2018.

PERILLO, A. *et al.* Padrão de atividade de coruja buraqueira, *Athene cunicularia* (strigiformes: strigidae), no campus da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, e comentários sobre um peculiar comportamento de estocagem de alimento. **Atualidades ornitológicas** On-line nº 160 Março/Abril, 2013. http://www.ao.com.br/download/AO160_55.pdf. Acesso em: 29 de Agosto de 2016.

RODRIGUES, M. P. M.; DANTAS, A. M. Avaliação da *onda b* de eletrorretinograma na *Athene cunicularia* **Rev. Bras. Ofital. Mol.** 67 (6): 287-91, 2008. http://sbportal.org.br/rbo/2008/rbo_nov_dez_2008.pdf#page=22. Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

SANTOS, A. L. Q.; *et al.* Estudo anatomo-topográfico do tubo digestório das espécies *Athene cunicularia* (Strigiformes, Strigidae) e *Tyto alba* (Strigiformes, tytonidae) **PUBVET**, Londrina, v. 6. N. 12, Ed, 19, 2012. <https://bit.ly/2AdxqU2>. Acesso em: 21 de Setembro de 2018.

SANTOS, D. M. dos.; CORDEIRO, V. L.; CARDOSO, C. B.; ANDREA, M. V.; ADORNO, E. V.; OLIVEIRA, K. N. Caracterização alimentar da *Athene cunicularia* (strigiforme/strigidae) (Coruja Buraqueira) **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 18, 1-9, 2017. <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/e-24506/24514>. Acesso em: 20 de Setembro de 2018.

SCOBIE, C.; *et al.* Influence of anthropogenic features and traffic disturbance on burrowing owl diurnal roosting behavior **Endangered Species Research Published online** vol. 24:73- 83 April 2014. https://www.int-res.com/articles/esr_oa/n024p073.pdf Acesso em: 18 de Setembro de 2018.

SICK, H. Ornitologia brasileira. Rio de Janeiro, **Nova Fronteira**. 1997. Acesso em: 17 de Agosto de 2017

SIGRIST, T; Guia de Campo Avis Brasiliis – Avifauna Brasileira. São Paulo: **Avis Brasiliis**, 2013. Acesso em: 21 de Agosto de 2016.

VIERA, L. A.; TEIXEIRA, R. L. Diet of *Athene cunicularia* (MOLINA, 1782) from a sandy coastal plain in southeast Brazil. **Bol. Mus. Biol.** Mollo Leitão. 23:5-14. Junho de 2008. <https://bit.ly/2S86kVM>. Acesso em: 19 de Setembro de 2018.

WELLCOME, T. I; FISHER, R.J; POULIN, R. G; TODD, L.D; BAYNE, E. M; FLOCKHART, D. T. T; SCHMUTZ, J. K; SMET, K. D; JAMES, P. C; Apparent survival of adult Burrowing Owls that breed in Canada is influenced by during migration and on their wintering grounds **Cooper Ornithological Society**, v. 116, pp. 446-458 2014. <file:///C:/Users/USER/Downloads/WellicomeFisherPoulinEtAl2014-CondorOrnithAppl116pp446-458.pdf>. Acesso em: 09 de Novembro de 2018.

ENFERMEIRAS NA GESTÃO DE UMA UNIDADE DE CUIDADOS DE PACIENTES PÓS-COVID-19

Data de aceite: 01/07/2021

Rosane Maria Sordi

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Porto Alegre - RS
[Http://lattes.cnpq.br/5535395350386543](http://lattes.cnpq.br/5535395350386543)

Terezinha de Fátima Gorreis

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Porto Alegre - RS
<http://lattes.cnpq.br/5389546488481447>

Rozemy Magda Vieira Gonçalves

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Porto Alegre - RS
<http://lattes.cnpq.br/1888461328023374>

RESUMO: A enfermagem tem um papel importante no combate ao coronavírus e na reabilitação dos pacientes com sequelas remanescentes da doença. Em uma ala do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, existem leitos na Unidade de Cuidados Especiais (UCE) para pneumologia, que admite atualmente também pacientes com sequelas e doenças pulmonares pós-Covid-19. Método: Relato das experiências de enfermeiras que atuam no processo de gestão de uma UCE de pacientes pós-COVID-19. Ressaltamos o protagonismo das enfermeiras atuantes na tomada de decisão. Resultados: Realizaram-se reuniões, criação de protocolos e fluxos com participação ativa do enfermeiro nas questões relacionadas à assistência direta, desenvolveu-se adaptações no processo de enfermagem com ordenamento de novos fluxos e rotinas.

O espaço físico foi estruturado, considerando-se o alto risco de transmissibilidade e diversas sequelas decorrentes da doença. Treinamentos de profissionais foram intensificados com readequação do dimensionamento conforme a complexidade do serviço. Ademais, observou-se preocupação dos enfermeiros com relação à saúde mental dos profissionais atuantes nesta unidade, percebeu-se que a relação com os pacientes, denominador de críticos ou difíceis, quer seja pela postura, quer seja pela falta de manejo e lida, muitas vezes associados aos acompanhantes e/ou parentes também tem sido citado como fonte de desordem mental ou psíquica entre a classe de profissionais de enfermagem. Conclusão: Enfatiza-se o alicerce nas evidências científicas e recomendações dos órgãos competentes em nível mundial e nacional para a estruturação da UCE clínica a fim de atender os pacientes pós-Covid-19. Destaca-se o protagonismo do enfermeiro em todas as interfaces, o qual assume papel fundamental desde a composição das comissões, passando pelo planejamento e funcionamento da estrutura física, gestão de recursos humanos, construção de protocolos e fluxos de cuidado, além de atuar diretamente na assistência e educação.

PALAVRAS - CHAVE: Enfermagem; Liderança; Gestão de riscos; Administração dos cuidados ao paciente; Infecções por coronavírus.

NURSES AT THE MANAGEMENT OF A PATIENT CARE UNIT POST-COVID-19

ABSTRACT: Nursing has an important role in the fight against coronavirus and in the rehabilitation

of patients with remaining sequels of the disease. In one of the northern wings of a large university hospital in southern Brazil, there are beds in the Special Care Unit (SCU) clinic for Pulmonology, which currently also admits patients with sequels and pulmonary diseases in post-Covid-19. Method: Experience report of nurses working in the management process of an SCU for patients after COVID-19. We emphasize the role of nurses working in decision-making. Results: Meetings were held, protocols and flows were created with the nurse's active participation in issues related to direct assistance, adaptations were developed in the nursing process with the organization of new flows and routines. The physical space was structured, considering the high risk of transmissibility and several sequels resulting from the disease. Training of professionals was intensified with readjustment of the sizing according to the complexity of the service. In addition, nurses were concerned about the mental health of professionals working in this unit, it was noticed that the relationship with patients, denominator of critics or difficult, either due to posture, or due to the lack of handling and coping, many sometimes associated with companions and, or relatives, has also been cited as a source of mental or psychological disorder among the class of nursing professionals. Conclusion: The foundation on scientific evidence and recommendations from competent bodies at the global and national level for the structuring of the clinical SCU in order to assist post-COVID-19 patients is emphasized. The role of nurses in all interfaces is highlighted, which assumes a fundamental role since the composition of the commissions, going through the planning and functioning of the physical structure, management of human resources, construction of protocols and care flows, in addition to acting directly on assistance and education.

KEYWORDS: Nursing; Leadership; Risk management; Administration of patient care; Coronavirus infections.

1 | INTRODUÇÃO

Os serviços de saúde enfrentam um novo cenário de ações em segurança e saúde voltadas aos profissionais que ali trabalham, que estão envolvidos nos cuidados aos pacientes e seus familiares e a sociedade frente a prevenção da propagação do novo Coronavírus (SARS-CoV-2), causador da Covid-19 (OMS, 2020a, 2020b). A pandemia de Covid-19 originou-se em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China, e rapidamente se disseminou por diversos países, acarretando inúmeros impactos na saúde e na sociedade (ZHANG et al., 2020).

Idosos e portadores de comorbidades, incluindo o câncer, são mais suscetíveis a complicações do novo Coronavírus (ANVISA, 2020; FISHER; HEYMANN, 2020), pois possuem maior risco de desenvolver formas mais graves de Covid-19, já que o vírus exacerba problemas de saúde já existentes, particularmente os que estão relacionados à função respiratória e à função do sistema imunológico. Além disso, pessoas pertencentes a esse grupo de risco podem ser afetadas pela pandemia por conta de graves interrupções no funcionamento dos serviços dos quais essas dependem (OMS, 2020c).

A enfermagem tem um papel importante no combate ao coronavírus e na reabilitação dos pacientes com sequelas remanescentes pela doença. Em uma das alas norte do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), existem leitos na Unidade de Cuidados Especiais (UCE) para pneumologia que admite atualmente também pacientes clínicos com sequelas e doenças pulmonares pós-Covid-19.

O objetivo deste estudo é relatar a experiência de enfermeiras na gestão de uma UCE a pacientes pós-Covid-19 de pneumologia e que necessitam de assistência de maior complexidade.

2 | MÉTODO

Trata-se de um estudo descritivo, narrativo, do tipo relato da experiência realizado no período de 2 de março de 2020 à 22 de abril de 2021 por enfermeiras assistenciais da UCE clínica, que atuam no processo de gestão desta unidade de pacientes pós-Covid-19, ressaltando o protagonismo das enfermeiras na tomada de decisão no HCPA.

O lócus de ação deste relato foi extraído do cotidiano dessas enfermeiras assistenciais, profissionais autoras deste artigo, durante a pandemia do coronavírus.

A referida UCE, realiza principalmente atendimentos direcionados ao tratamento de pacientes clínicos com sequelas e doenças pulmonares pós-Covid-19, sendo que a maioria dos pacientes atendidos possuem diversas comorbidades associadas e se enquadram no grupo de pessoas mais suscetíveis a doença.

As adequações realizadas no serviço foram embasadas na leitura de estudos científicos atuais, nas diretrizes do Ministério da Saúde (MS) brasileiro, Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES/RS) e orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS) na manutenção dos atendimentos aos pacientes crônicos durante a pandemia Covid-19.

Para a confecção deste artigo foi realizada a descrição enfatizando o alicerce nas evidências científicas e recomendações dos órgãos competentes em nível mundial e nacional para a reestruturação da UCE clínica, a fim de atender os pacientes pós-Covid-19.

A discussão foi construída através da interface entre o relato de experiência das autoras e o embasamento técnico-científico e de discussões científicas com outros membros da equipe que participaram da reestruturação desta unidade e que atuam no local. Serão destacados os processos de mudança, tomada de decisão referente aos aspectos que envolveram a reorganização da UCE clínica que atende pacientes pós-Covid-19, bem como a criação de novos fluxos e protocolos operacionais e clínicos adotados, a gestão de recursos humanos, os treinamentos e a gestão do cuidado.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As instituições de saúde estão lidando com um novo cenário de ações em saúde e segurança voltadas aos diversos profissionais envolvidos nos cuidados à população decorrente do surto mundial da doença ocasionada pelo novo Coronavírus SARS-CoV-2, a

Covid-19 (OMS, 2020d).

Uma vez que o processo de cuidado é transformado diariamente e exige dos profissionais cada vez mais a busca por aprimoramento, pela complexidade do trabalho, os ambientes de saúde são reconhecidos como de alto risco e uma cultura de segurança tem influência nos resultados dos pacientes (FUSARI et al., 2021).

Em diversos espaços e níveis de atenção à saúde, o protagonismo do enfermeiro se desvela na coordenação e gestão de equipes e serviços. Atualmente, a enfermagem constitui mais da metade da força de trabalho na área da saúde. O enfermeiro desenvolve papel essencial na reabilitação dos pacientes acometidos pela Covid-19. Deve estar atento a evolução da doença, reconhecendo de imediato sinais e sintomas que indiquem piora clínica, assim como estar capacitado a realizar educação do paciente e família durante a internação, orientar terapia, tratamento e manejo dos equipamentos e adaptações necessárias (GONÇALVES; GORREIS; SOUZA, 2021).

As competências do enfermeiro para a gestão do cuidado requerem conhecimentos, habilidades e atitudes compatíveis com o exercício do papel de gestor e líder nas instituições de saúde (KAISER; WEGNER, 2020). Principalmente ao se tratar de um grande desafio para a saúde pública mundial diante dos impactos vivenciados frente a este vírus de fácil e rápida propagação na população e que ocasiona mudança abrupta nas rotinas das instituições de saúde, pois observa-se um panorama de intensificação de internações hospitalares em detrimento dos agravos respiratórios (RODRIGUES; SILVA, 2020).

Nessa conjuntura, a enfermagem se apresenta com a excelência de uma profissão de autêntico nível superior, atuando em diversas frentes no combate à pandemia. Assim, o enfermeiro desponta de maneira semelhante a outros momentos históricos em que epidemias e catástrofes acometeram a população, colocando-se em risco para realizar assistência à saúde, expondo-se ao vírus SARS-CoV-2 diante das longas jornadas de trabalho (OMS, 2020e).

Existe uma demanda de alterações curriculares ao se buscar o ajustamento às exigências do perfil profissional do enfermeiro no Brasil, discutindo-se assim, os novos rumos para a valorização da enfermagem no interior das equipes de saúde (ARAÚJO et al., 2018).

Os profissionais enfermeiros foram se tornando protagonistas de gestão da ambiência, dimensionamento de pessoal, cuidado, treinamentos e suporte psicológico às equipes assistenciais no enfrentamento deste fenômeno de alto potencial de transmissibilidade, deliberando decisões resolutivas referentes à estruturação de áreas físicas, organização da unidade e instituição hospitalar de saúde, atuando na implementação de Protocolos Operacionais Padrão (POP), readequação de fluxos e rotinas, treinamento da equipe assistencial, entre outras medidas, com intuito de minimização do contágio pela transmissão da Covid-19.

No hospital ocorreu a intensificação da ação na higiene de mãos com o aumento

na disponibilidade de frascos e de dispensadores de álcool 70% em gel distribuídos em diferentes locais. Passou a ser fornecido pela equipe de enfermagem máscaras cirúrgicas na entrada do hospital e no serviço da UCE clínica; a temperatura corporal das pessoas circulantes começou a ser verificada na chegada da instituição. As orientações de educação em saúde, como higiene de mãos, distanciamento entre as pessoas para prevenção da contaminação foram reiteradas nesse momento.

O distanciamento social foi adotado principalmente nas áreas de acesso coletivas, como recepção e sala de espera, com restrição de acesso a visitas na unidade de atendimento a pacientes clínicos na UCE. E o enfermeiro passou a avaliar a necessidade ou não da entrada de familiar como acompanhante do paciente. Esse modelo adotado vai ao encontro de recomendações em relação ao distanciamento social como medida não farmacológica para controle da propagação de Covid-19 (ANVISA, 2020; OMS, 2020f).

Já foi provado a eficácia das medidas de distanciamento e isolamento social na pandemia, reduzindo o número de pessoas infectadas (PREM et al., 2020; SANCHE; LIN; XU, 2020; BAKKER et al., 2020). Esse cuidado torna-se relevante com vistas a reduzir o pico da pandemia, para evitar sobrecarregar os sistemas de saúde (DUCZMAL et al., 2020).

Aos profissionais de saúde, a instituição recomendou o uso e forneceu os equipamentos de proteção individual (EPI), pois a contaminação ocorre a partir da exacerbação de gotículas e o contato, já que os profissionais necessitam prestar assistência direta aos pacientes (ANVISA, 2020).

As medidas e adequações na estrutura e nos fluxos operacionais do serviço foram implementadas de forma dinâmica, ou seja, a compra de *dispensers*, otimização de distanciamento social, restrições de visitas, aumento no estoque de álcool em gel 70% e compra de EPIs, como máscaras, escudos faciais, luvas e aventais foram realizadas conforme as orientações do Ministério da Saúde e SES/RS, em virtude da magnitude da pandemia, com o intuito de otimizar novas práticas de atendimento que busquem minimizar a exposição dos funcionários da saúde e pacientes ao novo Coronavírus.

Os ajustes nas práticas organizacionais e operacionais em uma unidade de internação clínica buscam assegurar um atendimento de excelência. Otimizando a redução na incidência de contaminação pela Covid-19, tanto para a equipe assistencial quanto ao público circulante no local. E o enfermeiro como gestor e assistente torna-se importante ator frente a pandemia (GORREIS; GONÇALVES; SOUZA, 2021).

Frente à iminência da pandemia de Covid-19, as medidas implantadas na UCE foram principalmente: medidas de distanciamento entre pacientes, manutenção de cortinas entre os leitos fechadas evitando propagação de gotículas, distanciamento entre equipe durante passagem de plantão e intervalos, maior atenção à higiene de superfícies e de mãos, redução de fluxo de pessoas, promoção de treinamentos relacionados a temática Covid-19, atualização no uso de EPI com a inclusão de máscara oronasal e protetores faciais, treinamento sobre a correta paramentação e desparamentação, medidas para o

uso consciente de materiais, dada a escassez do momento, educação em saúde referentes ao uso de máscara e medidas de prevenção para pacientes e familiares (GONÇALVES; GORREIS; SOUZA, 2021). Além destas adequações, foram implementados protocolos institucionais e criados ajustes para a otimização de novas práticas de atendimento, visando minimizar a exposição dos pacientes, familiares (acompanhantes) e profissionais frente ao vírus circulante. Essas atividades foram consideradas desafiadoras, tendo em vista que os treinamentos e implantações ocorreram em tempo simultâneo, não havendo prazo adequado para um planejamento ordenado e otimização de novas práticas de atendimento que busquem minimizar a exposição do paciente ao vírus (GONÇALVES; GORREIS; SOUZA, 2021).

Realizaram-se reuniões para a tomada de decisão, criação de protocolos e fluxos com participação ativa do enfermeiro nas questões relacionadas à assistência direta, desenvolveu-se adaptações no processo de enfermagem com ordenamento de novos fluxos e rotinas. O espaço físico foi estruturado, considerando-se o alto risco de transmissibilidade e diversas sequelas decorrentes da doença. Os treinamentos de profissionais foram intensificados com dificuldade na readequação do dimensionamento conforme a complexidade do serviço, objetivando formar uma equipe de profissionais com experiência em cuidados críticos. Houve treinamentos para o desenvolvimento de conhecimentos e habilidades anteriormente aos primeiros casos, que foram mantidos sistematicamente.

Foi desafiador implementar tais medidas, pois o efetivo de profissionais não obteve incremento. Mas a implementação de vários POPs criados pelo grupo de enfermeiros, principalmente os alocados no setor de educação permanente, juntamente com a Comissão de Controle de Infecções (CCIH) propiciou que fosse possível realizar a estratégia para o atendimento e minimização do contágio pela Covid-19. A Comissão do Processo de Enfermagem (COPE) logo criou um novo diagnóstico de enfermagem para os enfermeiros realizarem com sucesso uma prescrição de enfermagem com os cuidados a serem realizados pela equipe aos pacientes internados na continuação do tratamento pós-Covid-19.

Algumas dificuldades foram encontradas pelos profissionais, principalmente relacionadas à preocupação dos enfermeiros com relação à saúde mental dos profissionais atuantes nesta unidade, percebeu-se que a relação com os pacientes, denominados de críticos ou difíceis, quer seja pela postura, quer seja pela falta de manejo e lida, muitas vezes associados aos acompanhantes e/ou parentes também tem sido citado como fonte de desordem mental ou psíquica entre a classe de profissionais de enfermagem.

Porém, apesar de ser tão grave tudo o que envolve quando um profissional enfermeiro sofre a síndrome de *Burnout*, essa é uma condição que ainda recebe menos atenção dos pesquisadores, pois é um assunto pouco estudado. Visto que na literatura não existem estudos referenciando sobre afastamentos pela doença na categoria enfermeiros.

No entanto autores descreveram recentemente que a pandemia traz um desafio

extra para a saúde mental de enfermeiros, técnicos de enfermagem e médicos. Sob maior pressão, estes profissionais tendem a descuidar da própria saúde mental na incansável e constante luta contra o Covid-19, podendo propiciar o surgimento de transtornos relacionados ao estresse e ansiedade (FUSARI et al., 2021). Sintomas que podem ser considerados em indivíduos diagnosticados com *Burnout*.

Neste contexto, ajustes nas práticas organizacionais para um atendimento interprofissional organizado e seguro ao paciente internado em uma UCE clínica em pneumologia tornam-se necessários frente a esta pandemia.

Este relato almeja embasar outros serviços de nível hospitalar em relação a novas práticas de atendimento que minimizem o paciente, seus familiares e os profissionais de saúde ao contágio da Covid-19 e assim buscar conter o avanço da pandemia.

4 | CONCLUSÃO

O impacto da pandemia gera desafios sem precedentes aos serviços de saúde, exigindo ajustes imediatos frente aos fluxos, espaço físico e habilitação de recursos humanos. Para o desenvolvimento e aprimoramento da atuação de enfermagem, é necessário que os enfermeiros compreendam que o cuidar e o gerenciar constituem a gestão do cuidado integral da enfermagem e devem ser pensadas e desenvolvidas em todas as dimensões do cuidado, principalmente em meio a pandemia de Covid-19.

Enfatiza-se o alicerce nas evidências científicas e recomendações dos órgãos competentes em nível mundial e nacional para a estruturação da UCE clínica a fim de atender os pacientes pós-Covid-19. Destaca-se o protagonismo do enfermeiro em todas as interfaces, o qual assume papel fundamental desde a composição das comissões, perpassando pelo planejamento e funcionamento da estrutura física, gestão de recursos humanos, construção de protocolos e fluxos de cuidado, além de atuar diretamente na assistência. Os enfermeiros desenvolvem papel essencial na reabilitação desses pacientes para a melhoria da qualidade de vida e na educação permanente da equipe, pacientes e familiares.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Orientações para serviços de saúde: medidas de prevenção e controle que devem ser adotadas durante a assistência aos casos suspeitos ou confirmados de infecção pelo novo Coronavírus (SARS-COV-2). **ANVISA**. 2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/NOTA+T%C3%89CNICA+N%C2%BA+05-2020+GVIMS-GGTES-ANVISA++ORIENTA%C3%87%C3%95ES+PARA+A+PREVEN%C3%87%C3%83O+E+O+CONTROLE+DE+INFEC%C3%87%C3%95ES+PELO+NOVO+CORONAV%C3%8DRUS+EM+INSTITUI%C3%87%C3%95ES+DE+LONGA+PERMAN%C3%8ANCIA+PARA+IDOSOS%28ILPI%29/8dcf5820-fe26-49dd-adf9-1cee4e6d3096>>.

ARAÚJO, J. L.; FREITAS, R. J. M.; GUEDES, M. V. C.; FREITAS, M. C.; MONTEIRO A. R. M.; SILVA, L. M. S. Brazilian Unified Health System and democracy: nursing in the context of crisis. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s. l.], v. 71, n. 4, 2066-71, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/0034-7167-2017-0352>

BAKKER, M.; BERKE, A.; GROH, M.; PENTLAND, A. S.; MORO, E. Effect of social distancing measures in the New York City metropolitan area. **MIT Connection Science**, [s. l.], 1-16, 2020. Disponível em: <<https://connection.mit.edu/sites/default/files/publication-pdfs/Effect%20of%20social%20distance%20measures%20in%20social%20distancing%20in%20the%20NY%20area.pdf>>.

DUCZMAL, L. H.; ALMEIDA, A. C. L.; DUCZMAL, D. B.; ALVES, C. R. L.; MAGALHÃES, F. C. O.; LIMA, M. S. de; SILVA, I. R.; TAKAHASHI, R. H. C. Vertical social distancing policy is ineffective to contain the COVID-19 pandemic. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 36, n. 5, e00084420, 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/csp/v36n5/1678-4464-csp-36-05-e00084420.pdf>>.

FISHER, D.; HEYMANN, D. Q&A: the novel coronavirus outbreak causing COVID-19. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1-3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01533-w>

FUSARI, M. E. K.; MEIRELLES, B. H. S.; LANZONI, G. M.; COSTA, V.T. Melhores práticas de liderança dos enfermeiros na gestão do risco hospitalar: estudo de caso. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, [s. l.], v. 42, n. esp., e20200194, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2021.20200194>.

GONÇALVES, R. M. V.; GORREIS, T. F.; SOUZA, E. Cuidados aos pacientes pós covid em uso de ventilação não invasiva: relato da experiência do enfermeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 13, 2021, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: 2021. ISSN 2237-1672. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/resumos/bma/ocs/index.php/resumos/bma/XIIISBMA/paper/view/597/617>>.

GORREIS, T. F.; GONÇALVES, R. M. V.; SOUZA, E. O papel da enfermagem nos cuidados contra a disseminação microbiológica do novo coronavírus. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 13, 2021, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: 2021. ISSN 2237-1672. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/resumos/bma/ocs/index.php/resumos/bma/XIIISBMA/paper/view/611/574>>.

KAISER, D. E.; WEGNER, W. Gestão do cuidado por enfermeiros: quais as competências necessárias? **Blog RevEnf**. 13 mar. 2020. Disponível em: <<https://blog.revenf.org/2020/03/13/gestao-do-cuidado-por-enfermeiros-quais-as-competencias-necessarias/>>.

ORGANIZAÇÃO MUNCIAL DE SAÚDE (OMS). Rolling updates on coronavirus disease. **OMS**. 2020a. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>>.

ORGANIZAÇÃO MUNCIAL DE SAÚDE (OMS). Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. **OMS**. 2020b. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>.

ORGANIZAÇÃO MUNCIAL DE SAÚDE (OMS). Disability considerations during the COVID-19 outbreak. **OMS**. 2020c. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332015/WHO-2019-nCov-Disability-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

ORGANIZAÇÃO MUNCIAL DE SAÚDE (OMS). Considerations in adjusting public health and social measures in the context of COVID-19. **OMS**. 2020d. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331773/WHO-2019-nCoV-Adjusting_PH_measures-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Coronavirus disease (COVID-19) outbreak: rights, roles and responsibilities of health workers, including key considerations for occupational safety and health. **OMS**. 2020e. Disponível em: <[https://www.who.int/publications-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-outbreak-rights-roles-and-responsibilities-of-health-workers-including-key-considerations-for-occupational-safety-and-health](https://www.who.int/publications-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-outbreak-rights-roles-and-responsibilities-of-health-workers-including-key-considerations-for-occupational-safety-and-health)>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). State of the world's nursing 2020: investing in education, jobs and leadership. **OMS**. Genebra (Suíça), 2020f. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/nursing-report-2020>>.

PREM, K.; LIU, Y.; RUSSELL, T. W.; KUCHARSKI, A. J.; EGGO, R. M.; DAVIES, N.; JIT, M.; KLEPAC, P. The effect of control strategies to reduce social mix on the results of the COVID-19 epidemic in Wuhan, China: a modeling study. **Lancet Public Health**, [s. l.] v. 5, n. 1, 261-270, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/>

RODRIGUES, N. H.; SILVA, L. G. A. Gestão da pandemia Coronavírus em um hospital: relato de experiência profissional. **Journal of Nursing and Health**, Pelotas (RS), v. 10. n. esp., e20104004, 2020.

SANCHE, S.; LIN, Y. T.; XU, C.; ROMERO-SEVERSON, E.; HENGARTNER, N.; KE, R. High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 7, 1470-1477, jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32255761/>>.

ZHANG, Y.; KOOPMANS, M.; YUEN, K. Y.; ANDERSEN, K.; PERLMAN, S.; HOGUE, B. The novel coronavirus outbreak: what we know and what we don't. **Cell**. n. 180, 19 mar. 2020. p. 1034-1036. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(20\)30171-9.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420301719%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(20)30171-9.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420301719%3Fshowall%3Dtrue)>.

LEITE FERMENTADO LIOFILIZADO DE BACURI (*PLATONIA INSIGNIS*)

Data de aceite: 01/07/2021

Vinicius Costa Barros

Imperatriz-MA

<http://lattes.cnpq.br/9069898685173531>

Adriana Crispim de Freitas

Imperatriz, MA

<http://lattes.cnpq.br/7356983319534914>

RESUMO: O leite fermentado tem se tornado cada vez mais consumido por sua característica probiótica, além do seu valor nutricional que se torna benéfico para o funcionamento do organismo. A caracterização desse produto com fruto o bacuri (*Platonia insignis*) que tem seu uso popular pelo resultado das suas diversas propriedades, tais como, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e antioxidante apresenta-se uma alternativa na caracterização do produto. Nos últimos anos, pode-se observar aumento na demanda global de produção de culturas iniciadoras desidratadas, em função da maior estabilidade e flexibilidade de aplicações e comercialização na indústria de alimentos. Com o uso de tecnologias de secagem que vem sendo empregadas há várias décadas na preservação de culturas microbianas de modo geral, pois são capazes de manter a viabilidade dos micro-organismos durante longos períodos de armazenamento. A liofilização é até então a tecnologia mais bem descrita e utilizada para secagem de culturas potencialmente probióticas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi

elaborar uma bebida láctea fermentada liofilizado sabor bacuri e avaliar sua aceitação do sensorial. A fermentação do leite foi realizada em estufa a 37 °C/12 horas, com inóculo na concentração de 5,3x10¹⁰ (*Lactobacillus casei* e *Lactobacillus bulgaricus*). Obteve um leite fermentado com pH médio 4,15 ao final da fermentação, onde foi estocado na temperatura 10°C/24h. A bebida fermentada foi padronizada em 10, 15 e 17 °Brix (com variação na adição da polpa de bacuri e calda adoçada) e liofilizada em liofilizador de bancada. Amostras foram submetidas a análise microbiológica para verificar a presença de aeróbios mesófilos e contagem de células viáveis em Câmara de Neubauer. Obteve-se contagem de 1011 células viáveis por mL, de acordo com a legislação vigente para leites fermentados. A avaliação sensorial da bebida foi realizada com 30 provadores, estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação do campus avançado do centro de ciências sociais, saúde e tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, não treinados com faixa etária entre 18 e 25 anos. Os produtos formulados e padronizados com 10, 15 e 17° Brix foram todos bem aceitos sensorialmente, obtiveram as maiores notas na região de aceitação para as variáveis cor, sabor e aroma, e em relação ao consumo do produto em sua forma em pó para reconstituição e ingerir também foi aceito, mostrando potencial de mercado com a inserção de tecnologia para melhoria da estabilidade microbiana.

PALAVRAS - CHAVE: Fermentação, Bactérias lácticas, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, aceitação sensorial.

BACURI LIOPHILIZED FERMENTED MILK (PLATONIA INSIGNIS)

ABSTRACT: Fermented milk has become increasingly consumed due to its probiotic characteristic, in addition to its nutritional value that becomes beneficial for the functioning of the organism. The characterization of this product with bacuri fruit (*Platonia insignis*), which has its popular use due to the result of its diverse properties, such as, healing, antimicrobial, antitumor, cytotoxic and antioxidant, presents an alternative in the product characterization. In recent years, there has been an increase in the global demand for the production of dehydrated starter crops, due to the greater stability and flexibility of applications and commercialization in the food industry. With the use of drying technologies that have been used for several decades in the preservation of microbial cultures in general, as they are able to maintain the viability of microorganisms during long periods of storage. Lyophilization is, until then, the best described and used technology for drying potentially probiotic cultures. In this way, the objective of this work was to elaborate a lyophilized fermented milk drink with bacuri flavor and to evaluate its acceptance of the sensorial. The fermentation of the milk was carried out in an oven at 37 ° C / 12 hours, with inoculum in the concentration of 5.3×10^{-10} (*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus*). He obtained a fermented milk with an average pH of 4.15 at the end of the fermentation, where it was stored at a temperature of 10 ° C / 24h. The fermented drink was standardized at 10, 15 and 17 ° Brix (with variation in the addition of bacuri pulp and sweetened syrup) and lyophilized in a bench lyophilizer. Samples were subjected to microbiological analysis to verify the presence of mesophilic aerobes and viable cell counts in the Neubauer Chamber. A count of 1011 viable cells per mL was obtained, according to the current legislation for fermented milk. The sensorial evaluation of the drink was carried out with 30 tasters, students of the undergraduate and graduate courses of the advanced campus of the center of social sciences, health and technology of the Federal University of Maranhão, untrained with ages between 18 and 25 years. The products formulated and standardized with 10, 15 and 17 ° Brix were all well accepted sensorially, obtained the highest scores in the region of acceptance for the variables color, flavor and aroma, and in relation to the consumption of the product in its powder form for reconstitution and ingestion was also accepted, showing market potential with the insertion of technology to improve microbial stability.

KEYWORDS: Fermentation, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, sensory acceptance.

1 | INTRODUÇÃO

O leite fermentado foi descoberto por nômades na região da Eurásia que guardavam o leite extraído durante a ordenha em sacolas feitas de estômago de bode. Que devido ao clima árido e seco dessa região proporcionou a proliferação de bactérias, que modificou a estrutura do leite, tornando ele um alimento com sabor mais agradável para aqueles indivíduos, além de ser uma forma para armazenar e conservar o leite (COSTA et al., 2013).

O leite fermentado é considerado um produto com grande potencial para desenvolver novos produtos como iogurte, sorvete e kefir, principalmente por se tratar de um alimento funcional. (CÉLIA, 2017) Esses alimentos agem no organismo auxiliando no sistema

imunológico com finalidade de promover saúde. Os produtos lácteos como probióticos, prebióticos e simbióticos são considerados muito importantes à classe de alimentos funcionais (OLIVEIRA et al., 2018).

Recentemente o leite fermentado tem se tornado cada vez mais consumido por causa das bactérias probióticas que o compõe, além dos seus valores nutricionais que se tornam benéficos para o funcionamento do organismo (COSTA, 2017), alguns fatores como oxigênio dissolvido, acidez, interação entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem interferir na sobrevivência dos microrganismos probióticos em leites fermentados (CÉLIA, 2017).

O bacuri é o fruto da espécie *Platonia insignis* Mart., pertencente à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*, 90 espécies tem os frutos comestíveis (Aguiar et al., 2008). No Brasil seu uso popular e resultado das suas diversas propriedades, tais como, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e antioxidante (Santos Junior et al., 2010).

Nos últimos anos, pode-se observar aumento na demanda global de produção de culturas iniciadoras desidratadas, em função da maior estabilidade e flexibilidade de aplicações na indústria de alimentos, ração e farmacêutica (HUANG et al., 2017). O uso de tecnologias baseadas nas diferentes metodologias de secagem vem sendo empregadas há várias décadas na preservação de culturas microbianas de modo geral, pois são capazes de manter a viabilidade dos micro-organismos durante longos períodos de armazenamento. Métodos como a liofilização (freeze-drying) em particular têm sido preferidos para estabilização de culturas probióticas, pois proporcionam maior facilidade de estocagem, transporte, manuseio e aplicação destas culturas no desenvolvimento de alimentos funcionais. A liofilização é até então a tecnologia mais bem descrita e utilizada para secagem de culturas potencialmente probióticas (MORGAN et al., 2006; MENG et al., 2008).

2 | OBJETIVO DO TESTE

Objetivo do trabalho é estabilizar o produto leite fermentado, através da diminuição da atividade de água e possibilitar a viabilidade das bactérias através do método de liofilização. Assim proporcionando o aumento da vida de prateleira, agregando valor ao produto com sabor de fruta do cerrado.

3 | METODOLOGIA

3.1 Materiais

Toda matérias-primas foram obtidos no mercado local da cidade de Imperatriz - MA.

Matérias-primas

- 3 litros de leite desnatado;
- 340 g açúcar mascavo;
- 200 mL de polpa de bacuri;
- 150 mL de água mineral;
- 0,25 g para cada microrganismo *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus bulgaricus*.

3.2 Métodos



Fluxograma 1 – fluxograma da formulação do leite fermentado liofilizado com sabor de bacuri

Fonte: Autor (2019).

4 | TRATAMENTO TERMICO

O leite foi submetido após a etapa de recepção ao tratamento térmico no equipamento Banho Maria SL-150 em temperatura de 35°C em aproximadamente 15 minutos. Com auxílio de bastões de vidro, os manipuladores mantiveram-se em constante agitação.

5 | PREPARO DO INOCULO

Adicionou-se a junção de 4% do inóculo de Lac. Casei e 4% do inóculo de Lac. Bulgaricus previamente inoculada a 12,5 mL de leite cada em temperatura de 37°C por 2 horas, em cada porções no recipiente, ainda presente no banho-maria, posteriormente na mesma agitação, homogeneizou-se o leite com inóculo. A partir desse inóculo foi realizada uma fermentação e obtido o soro dessa fermentação, que foi utilizada para ser o novo inóculo para os demais leites para a fermentação, numa concentração de 5,3. 10⁻¹⁰, caracterizando o produto como inóculo aproveitável para leite acidófilo e probiótico

6 | FERMENTAÇÃO

Em seguida foram incubados a 37°C em estufa em média 12 horas até o leite obter o pH 6,5. Com obtenção do produto já fermentado, foi separado pequena amostra de cada porções inoculado e assim submetido a análise microbiológica para verificar a presença de aeróbios mesófilos através do método da contagem de células em Câmara Neubauer para obter 10¹¹ células viáveis por mL seguindo a legislação vigente (FARIA, BENEDET e GUERROUE; 2006).

Produto foi estocado em refrigeração em temperatura 10°C por 24 horas, para que o produto possa melhorar sensorialmente a questões de textura do produto e garante a segurança de microrganismos externos.

7 | ADIÇÃO DA CALDA E POLPA

Em cada porções do leite fermentado foram adicionados uma calda de açúcar mascavo com 50 mL de água mineral e polpa de bacuri em concentrações diferentes. Em seguida adicionado no leite fermentado e homogeneizado pelo liquidificador. Finalizando com auxílio de um refratômetro obteve o valor do Brix de cada formulação final. Como apresenta a tabela abaixo.

Amostra	Poipa (mL)	Calda (g) (açúcar)	BRIX
A	100 mL	60 g	10%
B	50 mL	120 g	15%
C	50 mL	160 g	17%

Tabela 1 – Dados da formulação da calda.

Fonte: Autor (2019).

8 | PADRONIZAÇÃO

As amostras foram padronizadas como 17% de Brix

9 | LIOFILIZAÇÃO

Com o congelamento das três amostras, submeteu-se as amostras a liofilização possibilitando que a água previamente congelada passe diretamente ao estado gasoso, ocorrendo a mudança de estado físico por sublimação, com o objetivo de estabilizar produtos através da diminuição da atividade de água (YAMAGUCHI, *et al*; 2017).



Figura 1- três amostras liofilizadas

Fonte: Autor (2019).

10 | ANÁLISE SENSORIAL

Foi realizada uma análise sensorial no campus UFMA - Bom Jesus, com 30 provadores, realizada com 3 amostras para coleta de dados bem como a aceitação do produto

11 | RESULTADOS

Das características do produto

O produto liofilizado ficou com o aspecto de pó, amarelo-marrom, higroscópico e com cheiro marcante

Do produto reconstituído

Ficou um produto de baixa viscosidade, amarelo-marrom, com cheiro marcante

Dos valores de pH

Amostra A – 3,85

Amostra B – 4,23

Amostra C – 4,42

Para os valores de acidez em g% (m/v)

Amostra A – 0,01

Amostra B – 0,03

Amostra C – 0,05

Com esses valores, verifica-se que está dentro o produto possui PIQ de leite fermentado/acidófilo e está dentro da legislação vigente.

Da análise sensorial

Dos dados iniciais dos participantes

Faixa etária		%
18 - 25 anos	30	100
26 - 35 anos	0	0
36 - 50 anos	0	0
mais de 50 anos		

Sexo		%
M	11	36,6667
F	19	63,3333

Tabela 2 e 3: Faixa Etária dos participantes e Sexo dos participantes

O estudo logo concentrou-se numa população juvenil e que conseqüentemente é a que mais consome produtos do tipo fora a população infantil. A população feminina teve uma participação maior nesse estudo que a população masculina.

Escolaridade		%
Sup. Completo	2	6,66667
Sup. Incompleto	28	93,3333
Ensino médio Completo	0	0

Tabela 4: Escolaridade dos participantes

Quase em sua totalidade, os julgadores eram formados por estudantes de ensino superior.

Das perguntas iniciais

O quanto você gosta ou desgosta de LF ?	%	
Gosto muito	9	30
Gosto moderadamente	8	26,6667
Gosto ligeiramente	5	16,6667
Nem gosto nem desgosto	8	26,6667
Desgosto ligeiramente		
Desgosto moderadamente		
Desgosto muito		

Tabela 5: Pergunta inicial 1

Percebe-se que os julgadores em sua maioria conhecem o produto e sabem das características como o flavor do produto.

Consumo de LF	%	
Diariamente	2	6,666667
Mensalmente	7	23,333333
2 a 3 vezes/semana	4	13,333333
Quinzenalmente	5	16,66667
Semestralmente	6	20
Nunca	6	20

Tabela 6: Pergunta inicial 2

Em relação a frequência de consumo de leite fermentado, tem-se uma distribuição entre essas frequências, e essa distribuição deve ser atribuída à rotina dos julgadores e a preferência por consumo de outros produtos mais frequentemente.

O quanto você gosta ou desgosta de bacuri ?	%	
Gosto muito	5	16,6667
Gosto moderadamente	6	20
Gosto ligeiramente	4	13,3333
Nem gosto nem desgosto	11	36,6667
Desgosto ligeiramente	2	6,66667

Desgosto moderadamente		0
Desgosto muito	2	7

Tabela 7: Pergunta inicial 3

O bacuri é um fruto bastante apreciado nessa região, e como a maioria das frutas, há também pessoas que são exceções nessa apreciação, o que é visto na distribuição da tabela acima.

Consumo de Bacuri		%
Diariamente	1	3,333333
Mensalmente	3	10
2 a 3 vezes/semana	0	0
Quinzenalmente	4	13,33333
Semestralmente	11	36,66667
Nunca	11	

Tabela 8: Pergunta inicial 4

O bacuri é uma fruta sazonal, então seu consumo tem intervalos significativos quando se trata da própria fruta, quando se trata da polpa, há oferta o ano inteiro.

Os resultados da análise sensorial foram:

Para COR

Aceitação

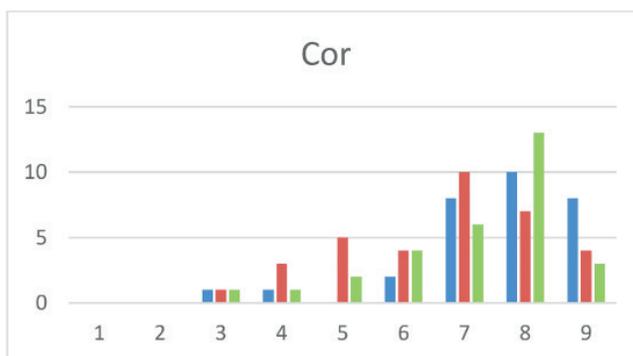


Gráfico 1: Distribuição Hedônica para cor

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C

Análise de variância

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	198,8889	29	6,858238	46,01542	2,41E-30	1,662901
Colunas	9,355556	2	4,677778	31,3856	5,79E-10	3,155932
Erro	8,644444	58	0,149042			
Total	216,8889	89				

Quadro 1: ANOVA para Cor

A coloração da amostra A era mais clara, próxima de branco e a amostra C era a mais escura, perto de uma coloração bege, essas variações vem de acordo com o aumento do Brix (%) ao adicionar a calda ao produto, as 3 amostras tiveram uma aceitação significativa

Para Aparência

A aceitação do atributo está disposta no gráfico 2



Gráfico 2: Distribuição Hedônica para aparência

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C

A aparência do produto reconstituído revela uma preferência para as amostras A e C, que são as amostras com menor percentual de Brix e maior percentual.

Análise de variância

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	129,7333	29	4,473563	36,03704	1,78E-27	1,662901
Colunas	3,466667	2	1,733333	13,96296	1,12E-05	3,155932
Erro	7,2	58	0,124138			
Total	140,4	89				

Quadro 2: ANOVA para Aparência

Para aroma
Aceitação

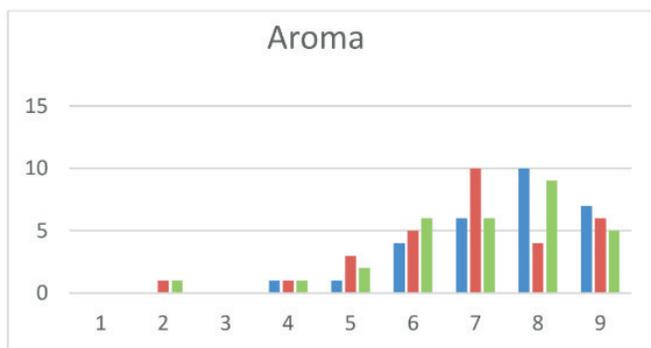


Gráfico 3: Distribuição Hedônica para aroma

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C
Análise de variância

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	195,1556	29	6,729502	48,92479	4,52E-31	1,662901
Colunas	6,688889	2	3,344444	24,31476	2,14E-08	3,155932
Erro	7,977778	58	0,137548			
Total	209,8222	89				

Quadro 3: ANOVA para Aroma

O aroma do produto é um aroma proveniente da fermentação, do crescimento das culturas de *Lactobacillus*, que quebram o substrato e esse consumo gera o flavor de produto probiótico fermentado devido a geração de outros componentes.

Para Sabor
Aceitação

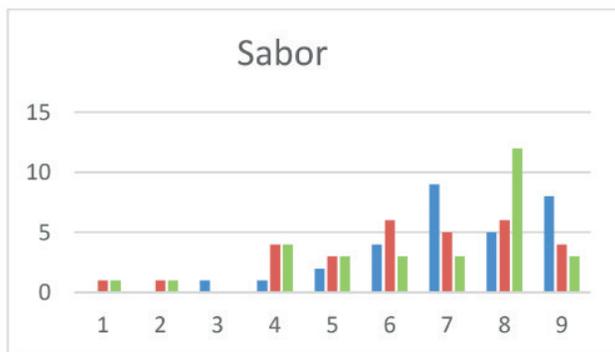


Gráfico 4: Distribuição Hedônica para sabor

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	293,5667	29	10,12299	42,96098	1,56E-29	1,662901
Colunas	11,66667	2	5,833333	24,7561	1,69E-08	3,155932
Erro	13,66667	58	0,235632			
Total	318,9	89				

Quadro 4: ANOVA para Sabor

O sabor do produto também é gerado pelo consumo das culturas microbianas do substrato e geração de compostos ácidos

Viscosidade



Gráfico 5: Distribuição Hedônica para viscosidade

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C

Análise de variância

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	173,7333	29	5,990805	37,76812	5,06E-28	1,662901
Colunas	3,466667	2	1,733333	10,92754	9,39E-05	3,155932
Erro	9,2	58	0,158621			
Total	186,4	89				

Quadro 5: ANOVA para Viscosidade

A viscosidade também é influenciada pelo Brix que varia de acordo com a quantidade de calda adicionada no processo do produto já fermentado

Para a idealidade da acidez

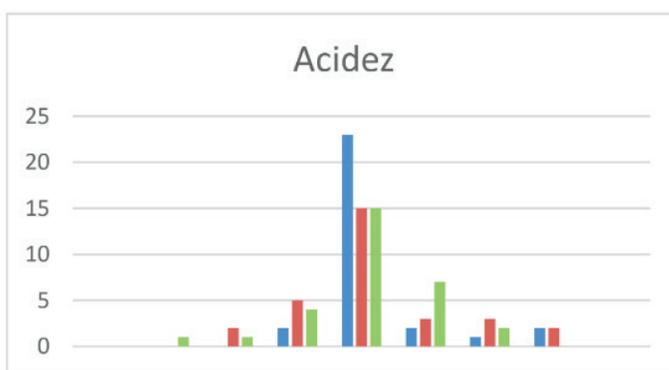


Gráfico 6: Distribuição do Ideal - Acidez

Em azul – Amostra A ; Em vermelho – Amostra B; Em verde – Amostra C

A acidez se mostrou ideal em todas as amostras, principalmente na amostra A, que era menos “doce” pois tinha menos adição de calda e tinha percentual de Brix menor

Em todas as análises de variância $F_{calculado}$ é maior que $F_{critico}$, ou seja, há diferença significativa entre as amostras, essa diferença pode se dar pelo crescimento heterogêneo dos *Lactobacillus* entre as amostras

Sobre a aceitação e consumo do liofilizado tem-se os seguintes dados

63% dos julgadores não sabiam do que se tratavam produtos liofilizados ou o que é o processo de liofilização. Percebe-se então que apesar da tecnologia não ser tão nova assim, poucas pessoas sabem dela e dos seus benefícios na conservação de componentes da matéria prima e de microrganismos quando se trata de alimentos funcionais

83,3% consumiriam o produto liofilizado pronto para reconstituição e ingestão. Percebe-se que a proposta seria viável analisando os dados para essa análise, o pó de leite fermentado seria reconstituído e consumido.

CONCLUSÃO

O produto formulado foi bem aceito sensorialmente bem como sua forma liofilizada pronta para reconstituição, seria consumido, mas seria de grande importância fazer a análise com o público infantil, a forma liofilizada dele aumenta o tempo de prateleira e a instabilidade dos *Lactobacillus*.

REFERÊNCIAS

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. L.: Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa agropecuária. brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.511-516, mar. 2006;

YAMAGUCHI, S. K. F.; KREBS, C. S.; BERTOLLI, S. L.; CARVALHO, L. F.; Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão. Revista: **ESPACIOS**. Vol. 38 (Nº 22) Ano 2017. Pág. 2;

BALLARDIN, Alana Chinellato et al. Análise de microrganismos presentes em amostras de leite fermentado durante a vida de prateleira do produto. II Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha, Caxias do Sul – RS, de 27 a 29 de maio de 2014. Disponível em: <<http://fsg.br/index.php/pesquisaextensao/article/view/388-399/935>>.

BARBOZA, J. C. A.; BELO, R. F. C. Análise de leites fermentados comercializados como alimentos funcionais probióticos. Revista Brasileira de Ciências da Vida, v. 5, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://jornal.faculdadecienciasdavida.com.br/index.php/RBCV/article/view/511>>.

Bacuri: (*Platonia insignis* Mart.-Clusiaceae). Agrobiodiversidade / Maria da Cruz Lima (organizadora). – São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2007. 210 p

BOLLA, P. A., SERRADELL, M. A., URRAZA, P.J., ANTONI, G.L. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 78, p. 15-22, 2010.

RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA DE RECOMPENSA E A DEPENDÊNCIA QUÍMICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 06/04/2021

Sara Maria Xavier da Cruz

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/1950646203947099>

Maria Eduarda dos Santos Pereira de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/5198662114368750>

Rauana Gomes Barbosa da Silva

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/4621262551905523>

José André Camelo de Alcântara

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/9997431242374107>

Matheus Italo da Conceição

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6088757284594458>

Jessica Marcela Barbosa da Silva Ribeiro Rocha

Universidade de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/2576370860591799>

Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/3634248808954077>

Vanessa dos Santos Nunes

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6585695867855955>

Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6917379011521068>

RESUMO – Introdução: O cérebro humano ao receber estímulos prazerosos ativa o sistema de recompensa e promove a sensação de satisfação desencadeada pela ação estímulos ambientais. Substâncias químicas ampliam em centenas de vezes essa atividade provocando sensações de contentamento e euforia muito intensas que estimulam a repetição exacerbada do seu consumo. Objetivo: Compreender a relação entre as possíveis alterações no sistema de recompensa causadas pelo abuso de drogas e a dependência química. Metodologia: Foram usados os descritores “dopamina” e “dependência química” nas bases de dados, sendo encontrados 540 artigos na PubMed; dos quais 91 deles foram selecionados pelo título e, após avaliação do abstract, 12 foram incluídos na amostra. Desenvolvimento: Administração aguda de drogas de abuso causam um curto circuito que ativa neurônios dopaminérgicos e aumenta a liberação da dopamina provocando uma ilusão química de prazer que induz o indivíduo a repetir este comportamento compulsivamente. Quando crônica pode levar a mudanças fisiológicas resultantes na desregulação da via e

consequente disfunção cerebral, pois o sistema de motivação é reorientado para os picos de dopamina provocados pela droga e seus gatilhos antecipatórios. Conclusão: Apesar de agirem de formas diferentes no corpo humano, substâncias psicoativas podem causar modificações estruturais e fisiológicas que organizam o funcionamento do sistema nervoso e pervertem o sistema de recompensa, ocasionalmente causando a dependência química.

PALAVRAS - CHAVE: Dopamina; drogas; sistema de recompensa; substâncias psicoativas.

RELATIONSHIP BETWEEN THE REWARD SYSTEM AND DRUG ADDICTION: A LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: Introduction: The human brain when receiving pleasant incentives activates the reward system and promotes satisfaction feelings triggered by an environmental stimulus. Chemical substances amplify this activity hundreds of times, causing very intense sensations of contentment and euphoria that stimulate the exacerbated repetition of its consumption. Objectives: understand the relationship between possible changes in the reward system caused by drug abuse and chemical dependency. Methodology: The descriptors used were Dopamine and drug addiction. In the PubMed database, 540 articles were found, 91 of them were selected by title and after evaluation of abstract 12 was included in the synthesis. Development: Acute administration of abuse drugs causes shorts circuits in the ventral striatum that activates dopaminergic neurons and increases dopamine release, causing a chemical delusion of pleasure that induces behavior repetition compulsively. Chronic use can result in physiological changes and deregulation of the pathway, reflecting brain dysfunction. The reward and motivation systems are redirected to the dopamine peaks caused by the drug and its anticipatory triggers. Conclusion: Psychoactive substances act in different ways in the human body, causing structural and physiological changes that reorganize the nervous system's functioning and pervert the reward system, occasionally causing chemical dependence.

KEYWORDS: Dopamine; drugs; psychoactive substances.

1 | INTRODUÇÃO

O cérebro humano ao receber estímulos prazerosos, emite sinais que ativam o sistema de recompensa, circuito composto pelas principais regiões sintetizadoras da dopamina (DA) (VOLKOW *et al.*, 1999). Esta excitação promove uma cascata de reações que resulta na liberação deste neurotransmissor no núcleo *accumbens*, área central do sistema de recompensa, e tem como consequência a sensação de plena satisfação, onde o indivíduo sente-se recompensado e motivado a reforçar o comportamento que induziu a estimulação dopaminérgica (VALLONE *et al.*, 2000). Além disso os receptores de dopamina D2 estão envolvidos em inúmeras outras funções como a mediação de diferenças individuais na impulsividade e influência na locomoção, aprendizagem baseada em recompensas e processamento motivacional (WISE, 2004; JOHNSON; KENNY, 2010).

Os estímulos desencadeadores desta reação podem ser alimentos saborosos, ambientes agradáveis ou mesmo relações sexuais, sendo considerados naturais, pois a

liberação da dopamina é interrompida pela saciedade (MELIS *et al.*, 2005). As substâncias psicoativas também são capazes de excitar o sistema de recompensa, entretanto, diferentemente dos estímulos naturais, elas desenvolvem curtos circuitos que bloqueiam a saciedade e promovem o aumento dos níveis de dopamina sináptica no estriado ventral. Dessa forma, as drogas ampliam em centenas de vezes a atividade da via mesolímbica e a partir dos seus picos de efeitos recompensadores, formam associações relacionadas ao ressarcimento (WISE, 2004; HYMAN *et al.*, 2006).

A sensação de contentamento e euforia provocada pela ação das substâncias psicoativas são muito intensas e estimulam a repetição exacerbada do seu consumo, que quando crônico, torna os neurônios do sistema de recompensa cada vez mais insensíveis à ação farmacológica da droga em questão, causando assim tolerância a dose utilizada de forma regular e redução do grau de entusiasmo experimentado no passado (JOHNSON; KENNY, 2010).

Esta ação resulta no aumento progressivo das doses, e conseqüentemente suscetibilidade do indivíduo tornar-se dependente pois os sistemas de recompensa e motivação são reorientados para os picos de dopamina provocados pela droga em questão e seus gatilhos antecipatórios de forma que as sensações de contentamento e euforia muito intensas resultantes estimulam a repetição exacerbada do seu consumo (MELIS *et al.*, 2005).

Logo, a presente revisão sistemática da literatura teve como objetivo compreender a relação entre as possíveis alterações no sistema de recompensa causadas pelo abuso de drogas e como elas podem causar a dependência química nos indivíduos, visto que esta condição é muito prejudicial aos indivíduos acometidos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da revisão de literatura do tipo sistemática, foram utilizados os descritores “dopamina” e “dependência química”, aplicados na base de dados PubMed por meio do operador booleano AND. Para efetuar a busca, foi considerado como critérios de inclusão apenas ensaios clínicos com pacientes humanos sem distinção na data de publicação.

A partir desses mecanismos de busca, foram encontrados inicialmente 540 artigos relacionados aos descritores, dos quais 91 deles foram selecionados pelo título e, após avaliação do abstract e a leitura dos artigos, 12 artigos foram incluídos na síntese.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de recompensa inicia na área tegumentar ventral dopaminérgica e projeta-se para o estriado ventral que compreende predominantemente o núcleo accumbens. As principais responsáveis pela neurotransmissão da dopamina (DA) são

as proteínas neuroreceptoras específicas conhecidas como transportadoras de dopamina (DAT) que estão localizadas principalmente nas membranas pré-sinápticas de neurônios dopaminérgicos e modulam a recaptção da dopamina na fenda sináptica, ação intimamente e consistentemente ligada a comportamentos impulsivos pela busca de recompensa (PESSIGLIONE *et al.*, 2006; BUCKHOLTZ *et al.*, 2010). A característica fundamental de todas as drogas que causam dependência é a capacidade de aumentar em centenas de vezes os níveis de dopamina sináptica no estriado ventral, um mecanismo especificamente envolvido em efeitos motivadores e associados à saciedade (WISE, 2004; HYMAN *et al.*, 2006).

Dados pré-clínicos fornecem evidências de que administração de substâncias psicoativas causa uma espécie de curto-circuito que induz a ativação do sistema de recompensa envolvendo o aumento exacerbado tanto do disparo de neurônios dopaminérgicos na área tegumentar ventral do mesencéfalo (GESSA *et al.*, 1985) quanto o aumento subsequente de dopamina liberada no estriado, especificamente no núcleo accumbens (CHIARA *et al.*, 1988) que provoca uma ilusão química de prazer (CHIARA *et al.*, 1988; WISE *et al.*, 1995). Acredita-se que uso crônico de drogas de abuso leva a uma série de anormalidades biológicas documentadas através de métodos comportamentais, eletrofisiológicos, bioquímicos e morfológicos, que apontam para uma fisiologia cerebral alterada (KISH *et al.*, 2001). A principal delas é a downregulation de transportadores e receptores de dopamina que resulta na desregulação das funções dessas proteínas (SHI *et al.*, 2008), diminuição da atividade espontânea (RASMUSSEN; CZACHURA, 1995; DIANA *et al.*, 1992a) e sensibilização dos neurônios (BRODIE, 2002).

A maioria das substâncias psicoativas como etanol morfina e canabinóides aumenta a atividade neurológica (DIANA *et al.*, 1998a; GESSA *et al.*, 1985; GYSLING; WANG, 1983; MATTHEWS; GERMAN, 1984; MELIS *et al.*, 2000; MEREU *et al.*, 1987). Psicoestimulantes, como a cocaína e as anfetaminas através da inibição dos receptores de DA, diminuem a atividade neuronal, e bloqueiam a recaptção da dopamina, aumentando assim sua liberação e ativando mecanismos de feedback que atuam como um sinal prazeroso ao cérebro (EINHORN *et al.*, 1988; SHI *et al.*, 2000). As anfetaminas são preferencialmente liberadores de dopamina, entretanto podem bloquear e reverter as proteínas transportadoras como a cocaína, o que leva a um aumento da dopamina extracelular que por sua vez, ativam os receptores D2 (LACEY *et al.*, 1990b; MERCURI *et al.*, 1992; Sonders *et al.*, 1997), diferentemente das anteriores a nicotina ativa e dessensibiliza rapidamente os neurônios dopaminérgicos (PICCIOTTO *et al.*, 1998).

Esses resultados sugerem que, em humanos, a desregulação na transmissão da dopamina é semelhante em diferentes vícios, mas a correlação entre neuroquímica e comportamento de procura as drogas parece variar de acordo com a substância de abuso. A redução dos terminais dopaminérgicos do estriado envolvidos nos processos de liberação e inibição (PICCIOTTO *et al.*, 1998), e conseqüente diminuição significativa da disponibilidade dos transportadores de dopamina causada por o uso crônico de

estimulantes, como a heroína, metanfetamina e cocaína refletem as mudanças adaptativas e a disfunção grave dos neurônios dopaminérgicos (FLECKENSTEIN et al. 2000; VOLKOW et al. 2001; WILSON et al. 1996; MCCANN et al. 2008).

A lesão do sistema de transmissão da DA pode ter implicações para a experiência de prazer e recompensa, levando a um estado de depressão ou ansiedade, que pode ser um fator de vulnerabilidade para o desenvolvimento da dependência e recaída (GERRA et al. 2000; VOLKOW et al. 2006; ZIJLSTRA et al. 2008). Uma hipótese alternativa pressupõe que a estimulação dopaminérgica não promove o prazer em si ou o gosto de uma recompensa, mas sim media a falta dela sugerindo que a disfunção dopaminérgica está associada à incapacidade de ser motivada por estímulos considerados naturais que indicam recompensa (KISH et al. 2001).

Em relação às ações produzidas pelos psicoestimulantes, muita atenção tem focado no fato de que suas propriedades recompensadoras e reforçadoras ocorrem principalmente através da modulação da transmissão da dopamina através de uma interferência nos seus transportadores (RITZ et al, 1987; SEIDEN et al. 1993; WISE, 1996a; WISE, 1996b). Ao alterar a quantidade de entradas excitatórias e inibitórias do neurônio dopaminérgico, a substância psicoativa influencia a excitabilidade neuronal e, portanto, as ações comportamentais do próprio neurônio (MELIS et al. 2005).

A retirada aguda de substâncias psicoativas após a administração prolongada provoca um profundo declínio na taxa de atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral conhecido como estado hipodopaminérgico (DIANA et al., 1995a). Esta diminuição reflete alterações tanto na inibição quanto nas entradas excitatórias dos receptores dessas células (DIANA et al., 1999) modificações que resultam na desregulação da liberação de moléculas fundamentais ao funcionamento do sistema de recompensa (MANZONI e WILLIAMS,1999). Este estado hipodopaminérgico acompanhando de fases agudas de abstinência refletem alterações de propriedades intrínsecas de mecanismos regulatórios modificados por um regime crônico de drogas e divulgados pela retirada delas (BONCI; WILLIAMS, 1997; MANZONI; WILLIAMS,1999; DIANA TEPPER, 2002; PULVIRENTI; DIANA, 2001).

A hipoatividade apresentada pelas células dopaminérgicas, observadas após interrupção abrupta de substâncias psicoativas administrada de forma crônica, correlaciona-se bem com uma redução dos níveis de dopamina extracelular no núcleo accumbens e pode representar a base neural da disforia, caracterizada pela ansiedade, depressão e inquietude (FADDA e ROSSETTI,1998; Rossetti et al., 1992a). Curiosamente, o estado hipodopaminérgico supera os sinais físicos de abstinência (BAILEY et al., 2001; DIANA et al., 1996) e pode ser terminado pela administração da própria droga (DIANA et al., 1993b) caracterizando-se assim como parte de um ciclo de dependência onde a administração crônica de determinada substância psicoativa causa uma espécie de curto-circuito que ativa os neurônios dopaminérgicos e aumenta a liberação da dopamina estriatal provocando

uma ilusão química e induz o indivíduo a repetir o consumo da droga compulsivamente. O sistema de recompensa reduz sua atividade sob circunstâncias que imitam a ânsia ou desejo pela substância psicoativa que o proporciona prazer e direciona o comportamento para a busca e obtenção da molécula desejada, perpetuando assim o ciclo da dependência (MELIS et al. 2005).

4 | CONCLUSÃO

A dependência de drogas é uma desordem cerebral causada pelo uso repetitivo de substâncias químicas que alteram o funcionamento do sistema nervoso central. Os efeitos recompensadores proporcionados pelas drogas de abuso estão associados a ativação do sistema mesolímbico e a liberação da dopamina no núcleo *accumbens*, entretanto, a estimulação dopaminérgica não promove o prazer ou o gosto de recompensa, mas sim media a falta dela e sugere que a disfunção da via mesolímbica está associada à incapacidade de motivação através estímulos considerados naturais.

Esta situação reflete uma disfunção no cérebro, pois os sistemas de recompensa e motivação apresentam reorientação à picos de dopamina provocados pela droga e seus gatilhos antecipatórios onde a atenção do indivíduo se volta apenas para o prazer imediato. A insipidez afetiva pode resultar da falta de resposta emocional em relação aos estímulos indicadores de recompensa, ou seja, pacientes com disfunção dopaminérgica não são incapazes de sentir prazer, mas podem falhar ao serem motivados por estímulos ambientais.

Apesar de agirem de formas diferentes no corpo humano, as drogas diretamente ou não, causam modificações no funcionamento do sistema nervoso. Portanto, a dependência de drogas está associada a alterações na neurotransmissão cerebral e o abuso delas sejam lícitas ou não, pode causar alterações no sistema de liberação da dopamina e consequentemente perversão do sistema de recompensa, ocasionalmente causando a dependência química.

REFERÊNCIAS

BAILEY, C. P.; O'CALLAGHAN, M. J.; CROFT, A. P.; MANLEY, S. J.; LITTLE, H. J. **Alterations in mesolimbic dopamine function during the abstinence period following chronic ethanol consumption.** *Neuropharmacology*, v. 41, p. 989–999, 2001

BONCI, A., AND WILLIAMS, J. T. **Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine.** *J. Neurosci.* 15, 796–803, 1997.

BRODIE, M. S **Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment.** *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26, 1024–1030, 2002.

BUCKHOLTZ JW, TREADWAY MT, COWAN RL, WOODWARD ND, LI R, ANSARI MS, BALDWIN RM, SCHWARTZMAN AN, SHELBY ES, SMITH CE ET AL. **Dopaminergic network differences in human impulsivity.** *Science.* 329:532, 2010.

DIANA, M., GESSA, G. L., AND ROSSETTI, Z. L. **Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system.** *Alcohol Alcohol* 27, 329–333, 1992a.

DIANA, M., PISTIS, M., MUNTONI, A., AND GESSA, G. **Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: Evidence of protracted abstinence.** *Neuroscience* 71, 411–415, 1996.

DIANA, M., MELIS, M., AND GESSA, G. L. **Increase in meso-prefrontal dopaminergic activity after stimulation of CB1 receptors by cannabinoids.** *Eur. J. Neurosci.* 10, 2825–2830, 1988^a.

DIANA, M., PISTIS, M., CARBONI, S., GESSA, G. L., AND ROSSETTI, Z. L. **Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: Electrophysiological and biochemical evidence.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1, 7966–7969, 1993b.

DIANA, M., PISTIS, M., MUNTONI, A. L., AND GESSA, G. L. **Ethanol withdrawal does not induce a reduction in the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the mesolimbic system.** *Brain Res.* 5(1–2), 29–34, 1995a.

DIANA, M., MUNTONI, A. L., PISTIS, M., MELIS, M., AND GESSA, G. L. **Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal.** *Eur. J. Neurosci.* 11, 1037–1041, 1999.

DIANA, M., AND TEPPER, J. M. **Electrophysiological pharmacology of mesencephalic dopaminergic neurons.** In “Handbook of Experimental Pharmacology” (G. Di Chiara, Ed.), 154=II. Springer-Verlag, Berlin, 2002.

CHIARA G, IMPERATO A. **Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.** *Proc Natl Acad SciUSA* 85:5274–5278,1998

EINHORN ET AL., EINHORN, L. C., JOHANSEN, P. A., AND WHITE, F. J. **Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: Studies in the ventral tegmental area.** *J. Neurosci.* 8, 100–112, 1988.

FLECKENSTEIN AE, GIBB JW, HANSON GR. **Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity.** *Eur J Pharmacol* 406:1–13, 2000.

FADDA E ROSSETTI,1998; FADDA, F., AND ROSSETTI, Z. L. **Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration.** *Prog. Neurobiol.* 56(4), 385–431,1998.

GESSA GL, MUNTONI F, COLLU M, VARGIU L, MEREU G. **Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area.** *Brain Res* 348:201–203,1985.

GESSA, G. L., MUNTONI, F., COLLU, M., VARGIU, L., AND MEREU, G. **Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area.** *Brain Res.* 25, 201–203, 1985.

GESSA, G. L., MELIS, M., MUNTONI, A. L., AND DIANA, M. **Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors.** *Eur. J. Pharmacol.* 2, 39–44, 1998.

GYSLING, K., AND WANG, R. Y. **Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat.** *Brain Res.* 24, 119–127, 1983.

GERRA G, ZAIMOVIC A, ZAMBELLI U, DELSIGNORE R, BARONI MC, LAVIOLA G, MACCHIA T, BRAMBILLA F. **Neuroendocrine correlates of depression in abstinent heroin-dependent subjects.** *Psychiatry Res* 96:221–234, 2000.

HYMAN SE, MALENKA RC, NESTLER EJ. **Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory.** *Annu Rev Neurosci* 29: 565–598, 2006.

JOHNSON PM, KENNY PJ. 2010. Dopamine D2 receptors in addiction like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci.* 13:635–641, 2010.

LACEY, M. G., MERCURI, N. B., AND NORTH, R. A. **Actions of cocaine on rat dopaminergic neurones in vitro.** *Br. J. Pharmacol.* 99, 731–735, 1990b.

KISH SJ, KALASINSKY KS, DERKACH P, SCHMUNK GA, GUTTMAN M, ANG L, ADAMS V, FURUKAWA Y, HAYCOCK JW. **Striatal dopaminergic and serotonergic markers in human heroin users.** *Neuropsychopharmacol* 24:561–567, 2001.

MANZONI, O. J., AND WILLIAMS, J. T. **Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal.** *J. Neurosci.* 1, 6629–6636, 1999.

MATTHEWS, R. T., AND GERMAN, D. C. **Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine.** *Neuroscience* 11, 617–625, 1984.

MCCANN UD, KUWABARA H, KUMAR A, PALERMO M, ABBEY R, BRASIC J, YE W, ALEXANDER M, DANNALS RF, WONG DF, RICAURTE GA. **Persistent cognitive and dopamine transporter deficits in abstinent methamphetamine users.** *Synapse* 62:91–100, 2008.

MELIS, M., GESSA, G. L., AND DIANA, M. **Divergent mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 24, 993–1006, 2000.

MELIS, M., SPIGA, S., & DIANA, M. **The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State.** *International Review of Neurobiology*, 101–154, 2005.

MERCURI, N. B., CALABRESI, P., AND BERNARDI, G. **The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area.** *Life Sci.* 51, 711–718, 1992.

MEREU, G., YOON, K. W., BOI, V., GESSA, G. L., NAES, L., AND WESTFALL, T. C. **Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine.** *Eur. J. Pharmacol.* 23, 395–399, 1987.

PESSIGLIONE M, SEYMOUR B, FLANDIN G, DOLAN RJ, FRITH CD. **Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans.** *Nature.* 442:1042–1045, 2006.

PICCIOTTO, M. R., ZOLI, M., RIMONDINI, R., LENA, C., MARUBIO, L. M., PICH, E. M., FUXE, K., AND CHANGEUX, J. P. **Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine.** *Nature* 8(6663), 173–177, 1998.

PULVIRENTI E DIANA, 2001 PULVIRENTI, L., AND DIANA, M. **Drug dependence as a disorder of neural plasticity: Focus on dopamine and glutamate.** *Rev. Neurosci.* 12, 141–158, 2001.

RASMUSSEN, K., AND CZACHURA, J. F. **Nicotine withdrawal leads to increased firing rates of midbrain dopamine neurons.** *Neuroreport* 29, 329–332, 1995.

RITZ ET AL., 1987 - RITZ, M. C., LAMB, R. J., GOLDBERG, S. R., AND KUCHAR, M. J. **Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine.** *Science* 4(4819), 1219–1223, 1987.

ROSSETTI, Z. L., MELIS, F., CARBONI, S., DIANA, M., AND GESSA, G. L. **Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine.** *Alcohol Clin. Exp. Res.* 16, 529–532, 1992a.

SEIDEN ET AL. 1993; WISE, R. A., AND MUNN, E. **Withdrawal from chronic amphetamine elevates baseline intracranial self-stimulation thresholds.** *Psychopharmacology (Berlin)* 117, 130–136, 1995.

SEIDEN E SABOL, 1996 - SEIDEN LS, SABOL KE **Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction.** *NIDA Res Monogr* 163:251–276, 1996.

SHI ET AL., 2000 - SHI, W. X., PUN, C. L., ZHANG, X. X., JONES, M. D., AND BUNNEY, B. S. **Dual effects of amphetamine on dopamine neurons mediated by dopamine and nondopamine receptors.** *J. Neurosci.* 1, 3504–3511, 2000.

SHI ET AL. 2008 - SHI J, ZHAO LY, COPERSINO ML, FANG YX, CHEN Y, TIAN A, DENG Y, SHUAI Y, JIN J, LU L. **PET imaging of dopamine transporter and drug craving during methadone maintenance treatment and after prolonged abstinence in heroin users.** *Eur J Pharmacol* 579:160–166, 2008.

SONDERS, M. S., ZHU, S. J., ZAHNISER, N. R., KAVANAUGH, M. P., AND AMARA, S. G. **Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: The actions of dopamine and psychostimulants.** *J. Neurosci.* 1, 960–974, 1997.

VALLONE D, PICETTI R, BORRELLI E. **Structure and function of dopamine receptors.** *Neurosci Biobehav Rev.* 24:125–132, 2000.

VOLKOW ND, WANG GJ, FOWLER JS, LOGAN J, GATLEY SJ, GIFFORD A, ET AL.: **Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels.** *Am J Psychiatry* 156:1440 – 1443, 1999.

VOLKOW ND, WANG G, FOWLER JS, LOGAN J, GERASIMOV M, MAYNARD L, ET AL.: **Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain.** *J Neurosci* 21:RC121, 2001.

VOLKOW ND, WANG GJ, TELANG F, FOWLER JS, LOGAN J, CHILDRESS AR, JAYNE M, MA YM, WONG C. **Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction.** J Neurosci 26:6583–6588, 2006.

WILSON JM, KALASINSKY KS, LEVEY AI, BERGERON C, REIBER G, ANTHONY RM, SCHMUNK GA, SHANNAK K, HAYCOCK JW, KISH SJ **Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users.** Nat Med 2:699–703, 1996.

WISE, R. A., AND MUNN, E. **Withdrawal from chronic amphetamine elevates baseline intracranial self-stimulation thresholds.** Psychopharmacology (Berlin) 117, 130–136, 1995.

WISE, R. A. **Addictive drugs and brain stimulation reward.** Annu. Rev. Neurosci. 19, 319–340, 1996a.

WISE, R. A. **Neurobiology of addiction.** Curr. Opin. Neurobiol. 6, 243–251, 1996b.

WISE RA **Dopamine, learning and motivation.** Nat Rev Neurosci 5: 483–494, 2004.

ZIJLSTRA, F.; BOOIJ, J.; VAN DEN BRINK, W.; FRANKEN, I. H. **Striatal dopamine D2 receptor binding and dopamine release during cue-elicited craving in recently abstinent opiate-dependent males.** Eur Neuropsychopharmacol 18:262–270, 2008.

CAPÍTULO 14

ATIVIDADE ANTIBIOFILME BACTERIANO DE DESINFETANTES

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 05/04/2021

Lucas Marcelino dos Santos Souza

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3986473483498367>

Carolina Cella Geron

Universidade Estadual de Londrina, Mestrado
Profissional em Clínicas Veterinárias
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/1270178337609655>

Miriam Dibo

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/593785301393311>

Leonardo Pinto Medeiros

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/1623802596414818>

Lucas Pinto Medeiros

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/2194069050139599>

Bruna Carolina Gonçalves

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/2485206170589500>

Bianca Cerqueira Dias Rodrigues

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4906544787715199>

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3188392520162374>

Gerson Nakazato

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná

RESUMO: A frequência de infecções causadas por bactérias multirresistentes é cada vez mais preocupante trazendo problemas para área da Saúde e economia. Além da resistência ao antimicrobiano, as bactérias também possuem outros mecanismos de defesa como, por exemplo, o biofilme que aumenta a permanência da bactéria em um ambiente, e impede a ação de alguns antibacterianos. Nesse contexto, a busca por novos antimicrobianos tornou-se extremamente importante para solucionar esse problema, e alguns compostos como nanopartículas e óleos essenciais se mostram efetivos para esse fim. Portanto, o objetivo do trabalho foi desenvolver desinfetantes contendo óleo essencial de orégano e nanopartículas de prata (AgNP) para atuarem contra bactérias em biofilmes maduros. No estudo foram utilizadas cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram

realizados ensaios de curva de tempo-morte e viabilidade bacteriana em biofilme maduro, ambos para avaliar a atividade antibacteriana dos desinfetantes produzidos. A curva de sobrevivência mostrou que ambos os desinfetantes tiveram ação bactericida, sendo que o óleo essencial de orégano precisou de poucos segundos, e as AgNPs apenas minutos para eliminar as bactérias testadas. O ensaio de viabilidade celular em biofilme formado mostrou uma grande eficiência contra *E. coli*, com 97 a 99% de eficácia em inviabilizar as células bacterianas nos tempos de 15 e 30 minutos, e para *S. aureus* a eficácia variou de 85 a 92%, sendo menor em comparação com *E. coli*. Esses resultados mostram que os desinfetantes testados possuem potencial para eliminação de bactérias em biofilme maduro.

PALAVRAS - CHAVE: Desinfecção, bactérias, resistência, nanoprata, orégano.

BACTERIAL ANTIBIOFILM ACTIVITY DISINFECTANTS

ABSTRACT: The frequency of infections caused by multidrug-resistant bacteria is of increasing concern, causing problems for many areas. In addition to antimicrobial resistance, bacteria also have other defense mechanisms, such as biofilm, which increases the bacteria stay at a environment and prevents the action of some antibacterial. In this context, the search for new antimicrobials has become extremely important to solve this problem, and some compounds such as nanoparticles and essential oils are effective for this purpose. Therefore, the objective of the this work was to develop disinfectants containing oregano essential oil and silver nanoparticles (AgNP) to act against bacteria in mature biofilms. In the study, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains were used. Time-kill curve assay and bacterial viability assays were performed on mature biofilm, both to evaluate the antibacterial activity of the disinfectants. The results of the time-kill assay showed that both disinfectants had bactericidal action, being that the oregano essential oil needed few seconds, and the AgNP just minutes to eliminate the tested bacteria. The cell viability assay in formed biofilm showed great efficiency against *E. coli*, with 97 to 99% of effectiveness in making bacterial cells unfeasible between 15 and 30 minutes, and for *S. aureus* the efficacy varied from 85 to 92%, being lower in comparison to *E. coli*. These results show that the tested disinfectants have the potential to eliminate bacteria in the mature biofilm.

KEYWORDS: Disinfection, bacteria, resistance, nanosilver, oreganum.

1 | INTRODUÇÃO

O ambiente hospitalar está relacionado diretamente com as infecções hospitalares, o ar e as superfícies estão suscetíveis a microrganismos potencialmente infecciosos, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), que podem se tornar reservatórios desses microrganismos (ANDRADE et al., 2000). Também, há bactérias formadoras de biofilme que aumentam a preocupação de infecções no ambiente hospitalar, principalmente em pacientes com próteses e cateteres. Já que o biofilme é um fator de virulência que confere ao microrganismo proteção contra agente nocivos para ele, e pode se formar em superfícies abióticas como as já descritas (DEL POZO, 2018).

Relacionando isso a utilização aumentada de antimicrobianos, e a não prática de

higienização correta do local ou dos profissionais de saúde, há uma emergência de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar (ANVISA, 2007).

A resistência aos antimicrobianos (AMR) é a habilidade de um microrganismo em resistir à ação de um ou mais agentes antimicrobianos. Os níveis crescentes de resistência a grupos de antimicrobianos são relatadas em muitas partes do mundo, isso é uma séria ameaça para pacientes e para o público como um todo. (ECDC, 2017).

Segundo Cassini et al (2019), estima-se que infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos são responsáveis por aproximadamente 33.000 mortes anuais.

Dentre essas bactérias multirresistentes se destacam entre as Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp*; e entre as Gram-negativas: Enterobactérias (exceto *Salmonella* e *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp*. (CASSINI et al., 2019).

Como grande destaque temos *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa encontrada normalmente na microbiota intestinal de animais de sangue quente, no entanto, algumas cepas podem ser patógenas, sendo a maior causa de doenças infecciosas em humanos, além de ser a maior responsável por infecções no trato urinário.

Outra espécie importante é *S. aureus*, bactéria Gram-positiva pode ser encontrada como microbiota residente na pele e fossas nasais, no entanto, também existem cepas patogênicas que podem causar diversos tipos de infecções, sendo um patógeno frequentemente hospitalar causando infecções na pele, pneumonia, osteomielite, endocardite e meningite (CASTRO et al., 2016).

Além dos microrganismos citados há uma variedade de outros que possuem resistência e/ou estão adquirindo resistências devido ao uso acentuado de antimicrobianos.

Devido a esses fatores medidas para controlar a disseminação dessas bactérias são de grande relevância. Uma importante ação para reduzir essa disseminação é por meio de uma desinfecção efetiva do ambiente, superfícies e materiais utilizados nos hospitais. O desinfetante é bastante utilizado nas áreas alimentícia e médica, devido a seu grande efeito antimicrobiano contra bactérias, fungos e vírus em suas formas vegetativas, sendo útil na eliminação de microrganismos que sintetizam biofilme como forma de resistência (DOS REIS et al., 2011).

Os principais agentes desinfetantes são: álcool, cloro e quaternário de amônia. O álcool é um reagente acessível e barato, no entanto possui alta volatilidade e não protege as superfícies em que é aplicado além de ser extremamente inflamável e, portanto, perigoso (BOYCE, 2018).

Os desinfetantes com cloro são muito utilizados, principalmente o hipoclorito por ser barato e ter um espectro de ação grande, porém requer cuidados em sua manipulação podendo causar irritações na pele e mucosas (SONG; VOSSEBEIN; ZILLE, 2019).

Compostos de quaternário de amônia são comumente utilizados como desinfetantes por possuírem boa ação biocida e desodorizante, além de possuir ação contra biofilmes.

Assim como os compostos de cloro, o quaternário de amônia pode ser tóxico para quem o manipula causando irritações e até queimaduras (SONG; VOSSEBEIN; ZILLE, 2019).

Alguns compostos de origem natural possuem potencial desinfetante, entre as alternativas se destacam o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) e nanopartículas de prata (AgNP). O óleo essencial de orégano apresenta uma grande ação antimicrobiana devido ao seu alto teor de compostos fenólicos (VASCONCELOS et al., 2019). Apesar de sua ação antimicrobiana ser muito reportada ainda não se sabe o real mecanismo de ação contra os microrganismos (BOTRE et al., 2010).

Já as AgNPs mostram CIM (concentração inibitória mínima) menor e atividade antimicrobiana mais duradoura quando comparada a desinfetantes comuns como hipoclorito de sódio e fenol (CHAMAKURA, 2011).

A limpeza e a desinfecção são consideradas como principais métodos de prevenção de doenças e infecções, e como muitos microrganismos já apresentam resistência contra desinfetantes e antissépticos utilizados atualmente, é necessário a produção de novos produtos com novos agentes antimicrobianos. Isso faz com que a pesquisa com óleo de orégano juntamente com nanopartículas para criação de desinfetantes seja uma alternativa para tal problema, portanto o objetivo do trabalho foi verificar a ação de desinfetantes com tais compostos contra biofilmes formados.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Desinfetante

Os desinfetantes foram formulados no departamento de ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde na UEL.

Foram produzidos desinfetantes líquidos com as seguintes composições: óleo de orégano a 1% com a base do desinfetante, nanopartículas de prata a 1mM com a base do desinfetante e associação do óleo de orégano com nanopartículas de prata e a base. Todos com concentrações fixas.

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL. As amostras foram estocadas em Brain Heart Infusion (BHI - Difco®) contendo 20% de glicerol, à - 80°C.

Avaliação da atividade antibacteriana dos desinfetantes

Curva de sobrevivência

Foi realizada a construção de uma curva de acordo com a taxa de morte de *Escherichia coli* em função do tempo de cultivo, através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), na presença e ausência dos compostos. A cultura bacteriana foi crescida

em meio Müller-Hinton (MH) ágar (Difco®) a 37°C, durante 18-24 horas. A cultura foi diluída em salina esterilizada (NaCl a 0,85%) até atingir a escala 0,5 de McFarland, o que equivale aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Em seguida, as culturas foram diluídas em salina para se obter 5×10^5 UFC/ml. Após este procedimento, os compostos foram adicionados à cultura bacteriana. A nova cultura foi então cultivada a 37°C na presença dos compostos. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos de cultivo (0, 10, 30 e 120 minutos), plaqueadas em ágar MH, para a determinação da UFC. Uma curva de sobrevivência foi construída com número de UFC em função do tempo de incubação.

Avaliação da atividade antibiofilme

Para a formação do biofilme de *E. coli* foi feito o cultivo da bactéria em meio Luria-Bertani (LB - Difco®) e incubado a 37°C. No dia seguinte foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi). Nos poços foram adicionados 200 µl de meio DMEM com 0,46% de glicose, após isso foram adicionados aos poços 5 µl do meio LB cultivado. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após a incubação, todos os poços foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,4 e foram adicionados os desinfetantes (WAKIMOTO et al., 2004). A microplaca foi incubada novamente a 37°C por 15 e 30 minutos. Após a incubação, a microplaca foi lavada novamente com PBS (3 vezes).

Para a formação de biofilme de *S. aureus* foi utilizada o protocolo Stepanovic et al. (2007).

A quantificação da viabilidade bacteriana foi realizada pelo método de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, no qual foram adicionados nos poços 200 µl de MTT a 0,5 mg/ml (FREIMOSER et al., 1999), a placa foi incubada por 2 horas, após esse período o MTT foi descartado e então foi adicionado solvente deixado por 15 minutos e realizado a leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de sobrevivência podem ser vistas nas figuras 1 e 2 para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. No gráfico da figura 1, é possível observar que o desinfetante com óleo de orégano e com AgNP apresentaram ação contra *E. coli* levando a concentração de UFC/ml a 0 nos tempos de 30 segundos e 10 minutos respectivamente, evidenciando ação bactericida em ambos desinfetantes.

No gráfico da figura 2, o desinfetante com óleo de orégano teve seu efeito instantaneamente, enquanto o desinfetante com AgNP teve ação no tempo de 30 minutos, ambos contra *S. aureus*. Esses dados sugerem que o desinfetante com óleo essencial de orégano elimina ambas as bactérias testadas em questão de segundos. Em relação ao desinfetante com AgNP, ele possui ação mais tardia precisando de cerca de 10 a 30 minutos para exercer seu efeito bactericida. As curvas de sobrevivência de ambas as

bactérias mostram que os desinfetantes exerceram atividade antibacteriana em questão de segundos a minutos, o que é preferível, já que o papel do desinfetante é promover a desinfecção do ambiente em menor tempo possível.

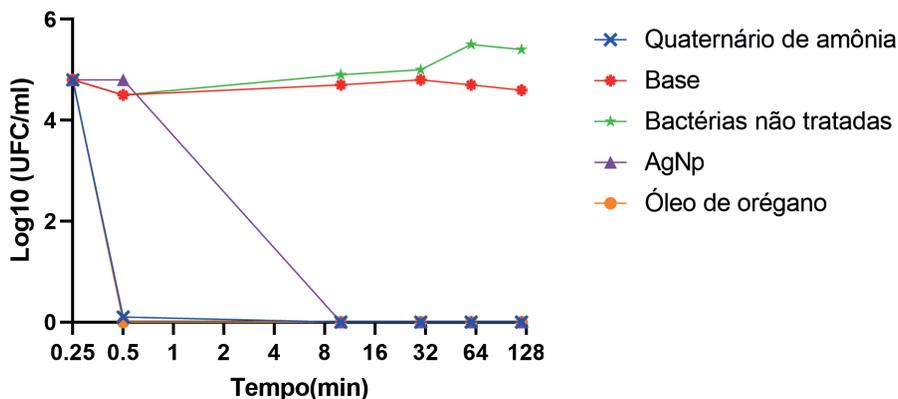


Figura 1: Curva de sobrevivência de *E. coli*.

Fonte: Próprio autor

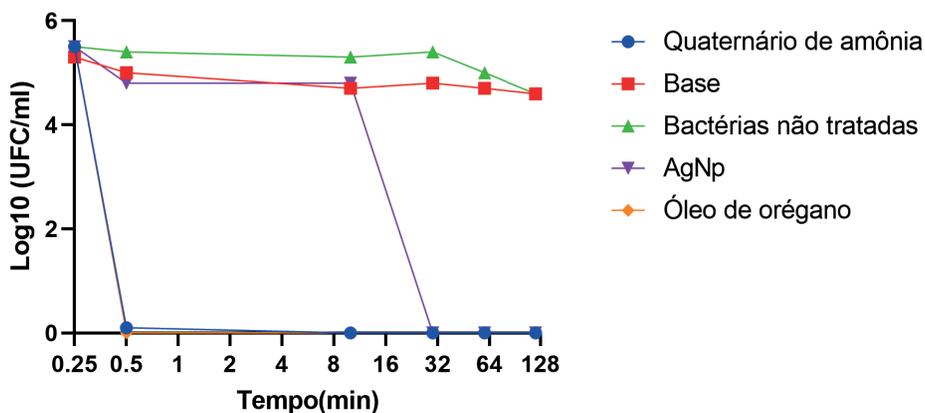


Figura 2: Curva de sobrevivência *S. aureus*.

Fonte: Próprio autor

Os resultados obtidos no teste do biofilme para viabilidade celular estão nas figuras 3 e 4, a eficiência dos desinfetantes estão nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Biofilmes podem ser definidos como formas organizadas e complexas de comunidade microbiana embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e são aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (FLEMMING et al., 2016).

No gráfico da figura 5 pode-se analisar que a viabilidade celular de *E. coli* em biofilme

maduro contra os compostos nos tempos de 15 e 60 minutos variaram de 97 a 99 % de eficácia, sendo que a melhor ação foi do desinfetante com AgNp no tempo de 15 minutos com eficácia de 99,3 %. Eficácia é a porcentagem de células bacterianas eliminadas pelo desinfetante em relação às bactérias não tratadas.

Em relação a viabilidade de *S. aureus*, ela foi maior do que a de *E. coli*, ou seja, as eficácias dos compostos foram menores para *S. aureus* sendo que a maior eficiência para essa bactéria foi a do composto com óleo de orégano tendo 92% de eficácia.

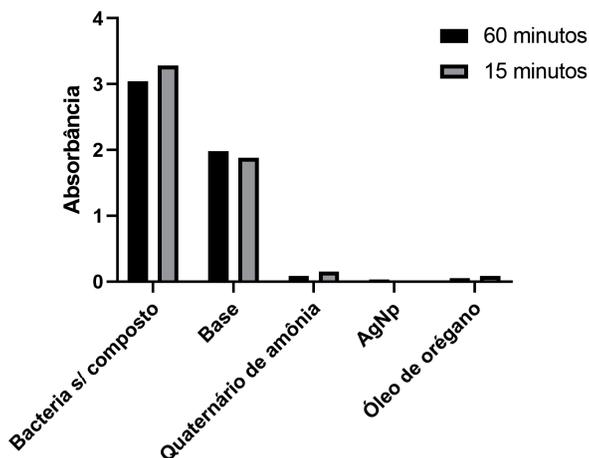


Figura 3: Viabilidade celular de *E. coli* em biofilme para os compostos testados.

Fonte: Próprio autor

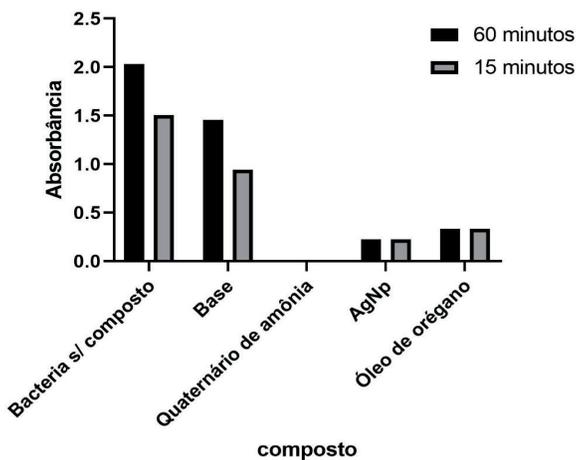


Figura 4: Viabilidade celular de *S. aureus* em biofilme para os compostos testados.

Fonte: Próprio autor

COMPOSTO	ABSORBÂNCIA	EFICIÊNCIA (%)
Controle (sem antimicrobiano)	3,045	0
Desinfetante base	1,981	34,93488016
Desinfetante quaternário de amônia	0,0853	97,1982051
Desinfetante c/ AgNP	0,0356	98,82893729
Desinfetante c/ óleo de orégano	0,0546	98,20510014

Tabela 1: Teste de viabilidade celular para *E. coli* durante 60 minutos de exposição.

Fonte: Próprio autor

COMPOSTO	ABSORBÂNCIA	EFICIÊNCIA (%)
Controle (sem antimicrobiano)	3,281	0
Desinfetante base	1,882	42,62494921
Desinfetante quaternário de amônia	0,151	95,39821211
Desinfetante c/ AgNP	0,021	99,36001625
Desinfetante c/ óleo de orégano	0,085	97,38927265

Tabela 2: Teste de viabilidade celular para *E. coli* durante 15 minutos de exposição.

Fonte: Próprio autor

COMPOSTO	ABSORBÂNCIA	EFICIÊNCIA (%)
Positivo	1,505	0
Desinfetante base	0,944	37,275
Desinfetante quaternário de amônia	0,007	99,534
Desinfetante c/ AgNP	0,224	85,116
Desinfetante c/ óleo de orégano	0,332	77,940

Tabela 3: Teste de viabilidade celular para *S. aureus* durante 15 minutos de exposição.

Fonte: Próprio autor

COMPOSTO	ABSORBÂNCIA	EFICIÊNCIA (%)
Controle (sem antimicrobiano)	2,029	0
Desinfetante base	1,453	28,388
Desinfetante quaternário de amônia	0,009	99,556
Desinfetante c/ AgNP	0,194	90,438
Desinfetante c/ óleo de orégano	0,161	92,065

Tabela 4: Teste de viabilidade celular *S. aureus* durante 60 minutos de exposição

Fonte: Próprio autor

4 | CONCLUSÃO

Os desinfetantes produzidos mostraram potencial para promover a inviabilidade celular em biofilmes maduros, no entanto ainda é necessário que se testem diferentes

concentrações dos produtos para melhor custo benefício.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, et al. **Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza.** Revista de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, v. 34, n. 2, p. 163-169, 2000.

ANVISA, 2007. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Investigação e controle de bactérias multirresistentes,** 2007.

BOTRE, D. A. et al. **Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta.** Revista Ceres, v. 57, n. 3, p. 283-291, 2010.

BOYCE, J. M. **Alcohols as surface disinfectants in healthcare settings.** Infection Control & Hospital Epidemiology, v. 39, n. 3, p. 323-328, 2018.

CASSINI, A. et al. **Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis.** The Lancet Infectious Diseases, v. 19, n. 1, p. 56-66, 2019.

CASTRO, A. et al. **Prevalence of Staphylococcus aureus from nares and hands on health care professionals in a Portuguese Hospital.** Journal of Applied Microbiology, v. 121, n. 3, p. 831-839, 2016.

CHAMAKURA, K et al. **Comparison of bactericidal actives of silver nanoparticles with common chemical disinfectants.** Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, v. 84, n. 1, p. 88-96, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI 2015). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twentieth informational supplement, document M100-S21.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

DEL POZO, J. L. **Biofilm-related disease.** Expert Review of Anti-Infective Therapy, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DOS REIS, L. M. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em um serviço público de saúde.** Revista Brasileira de Enfermagem, v. 64, n. 5, p. 870-875, 2011.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015.** Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2017.

FLEMMING, Hans-Curt et al. **Biofilms: an emergent form of bacterial life.** Nature Reviews Microbiology, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.

FREIMOSER, F.M. et al. **The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities.** Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 8, p. 3727-3729, 1999.

SONG, X.; VOSSEBEIN, L.; ZILLE, A. **Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: a review.** Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2019.

STEPANOVIC, S. et al. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** Apmis, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

VASCONCELOS, N. G. et al. **Origanum vulgare L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant gram-negative bacteria.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 52, 2019.

WAKIMOTO, N. et al. **Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative Escherichia coli.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.

METODOLOGIAS ATIVAS NO ENSINO PRESENCIAL DA DISCIPLINA HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA ORAL: RELATO DE EXPERIÊNCIA

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 30/03/2021

Dara Karen Freire de Oliveira

Acadêmica do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco Recife- PE
<https://orcid.org/0000-0001-6283-2863>

Maria Eduarda Dias Monteiro Bispo

Acadêmica do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0002-5074-0088>

Ana Luiza Farias de Almeida

Acadêmica do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco Recife- PE
<https://orcid.org/0000-0002-8341-4377>

Luciana Maria Silva de Seixas Maia

Professora Associado III Departamento de Histologia e Embriologia; Membro Permanente da Pós-Graduação em Morfortecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0001-5127-7876>

Eliete Cavalcanti da Silva

Professora Associado IV do Departamento de Histologia e Embriologia; Membro Permanente da Pós-graduação em Morfortecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0002-4785-0761>

Marta Gerusa Soares de Lucena

Professora Adjunto I / Coordenadora da Disciplina da Histologia e Embriologia Oral do Departamento deHistologia e Embriologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE
<https://orcid.org/0000-0003-2896-7064>

RESUMO: Diante da transformação atual, hoje, os indivíduos dessa era são conhecidos pelo termo nativos digitais, haja vista que estão inseridos em um mundo onde tudo que se faz é por meio de tecnologia. O ensino-aprendizado também passa por mudanças, e cabem as Instituições de ensino acompanhá-las com aplicações de metodologias ativas. Com essa finalidade, esse artigo traz as aplicações desse ensino multimodal na disciplina de Histologia e Embriologia Oral, com ênfase nos objetivos e resultados dessas atividades. A referida disciplina consta de 45 horas práticas, nas quais os alunos são distribuídos em 2 subturmas. Todos os procedimentos foram realizados com todos os discentes integralmente. Dispomos de laboratórioslocalizados no Centro de Biociências com um númerode microscópios suficientespara todos envolvidos na disciplina. Durante o exercício de monitoria das aulas práticas, destinadas ao curso de Odontologia (diurno), foram utilizadas as seguintes metodologias: elaboração de desenhos histológicos (avaliação processual) com debate individual (monitor/aluno); discussões de casos clínicos (permitindo a interdisciplinaridade dos assuntos abordados), e dinâmicas em grupo, jogos virtuais e interação

coletiva em redes sociais. Observou-se que através da aplicação de metodologias ativas, houve melhor desempenho acadêmico dos discentes, aumento da participação/cooperação durante as aulas, maior interesse nas aplicações clínicas e ótimo relacionamento monitor-aluno. Também se torna claro que algumas técnicas podem ser transpostas para o ensino a distância.

PALAVRA - CHAVE: Metodologia ativa; ensino; histologia; Tecnologia da Informação e Comunicação.

ACTIVE METHODOLOGIES IN THE PRESENTIAL TEACHING OF THE DISCIPLINE HISTOLOGY AND ORAL EMBRYOLOGY: EXPERIENCE REPORT

ABSTRACT: Faced with the current transformation, today, individuals of that era are known by the term digital natives, given that they are inserted in a world where everything that is done is through technology. Teaching and learning also undergoes changes, and it is up to the educational institutions to accompany them with applications of active methodologies. To this end, this article presents the applications of this multimodal teaching in the discipline of Histology and Oral Embryology, with emphasis on the objectives and results of these activities. This discipline consists of 45 practical hours, in which students are divided into 2 sub-classes. All procedures were carried out with all students in full. We have laboratories located in the Biosciences Center with a sufficient number of microscopes for everyone involved in the discipline. During the exercise of monitoring the practical classes, destined to the Dentistry course (daytime), the following methodologies were used: elaboration of histological drawings (procedural evaluation) with individual debate (monitor / student); discussions of clinical cases (allowing the interdisciplinarity of the subjects covered), and group dynamics, virtual games and collective interaction on social networks. It was observed that through the application of active methodologies, there was a better academic performance of the students, an increase in participation / cooperation during classes, greater interest in clinical applications and an excellent student-monitor relationship. It is also clear that some techniques can be transposed to distance learning.

KEYWORDS: Active methodology; teaching; histology; Information and communication technology.

1 | INTRODUÇÃO

A humanidade passa por um momento de intensa transformação tecnológica e informacional denominado Era Digital⁶ de forma que os indivíduos que nasceram a partir de 1990 são conhecidos pelo termo nativos digitais ⁴.

Os nativos digitais estão inseridos no mundo em que as Tecnologias da Informação e Comunicação-TIC são cotidianamente usadas para a navegação da internet. As Tecnologias da Informação e Comunicação (computador, internet, tablet e smartphone) podem ser utilizadas para fins didáticos quando adicionado a ferramentas e softwares educacionais como a utilização de aplicativos e jogos pedagógicos ².

Nesse contexto, infere-se que cabe às Instituições de ensino acompanhar tais

avanços com aplicação de metodologias ativas no processo ensino-aprendizado a fim de melhor atender às novas demandas de vivência em sociedade ⁵.

Para isso, faz-se necessário o uso de elementos multimodais, como a gamificação, estudo de casos clínicos, atividades ilustrativas, pois são ferramentas que motivam o estudante e o leva a bons resultados pessoais e profissionais⁵. Com essa finalidade, o programa de monitoria pode programar essa estratégia, tendo em vista que os monitores-alunos fazem parte da geração Nativa Digital ¹.

Assim, o presente artigo tem por objetivo demonstrar a inserção de metodologias ativas durante as aulas práticas no ensino da disciplina de Histologia e Embriologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco destinada aos alunos do 3º período de Odontologia.

2 | METODOLOGIA

A disciplina Histologia e Embriologia Oral é ofertada na Universidade Federal de Pernambuco para os alunos de Odontologia do 3º período. Possui a dinâmica de aulas teórico-práticas existindo sub-turmas durante as aulas práticas nos laboratórios.

As metodologias aplicadas tiveram como objetivo capacitar os alunos acerca dos tecidos da cavidade oral e do sistema estomatognático relacionados à atividade odontológica, promover a capacidade de identificação através de microscópicos, fotomicrografias e a caracterização histofuncional dos tecidos e elementos celulares apresentados nas aulas teórico-práticas.

As aulas teóricas têm uma carga horária total de 30 horas administradas no Niate do Centro de Ciências de Saúde, enquanto a prática excede chegando ao total de 45 horas aula realizado no laboratório do Centro de Biociência.

Diante dos efeitos positivos retratados sobre a utilização de elementos multimodais nas aulas práticas de disciplinas da área de saúde, houve um grande interesse pelas monitoras de adicionar novos métodos didáticos, utilizando as Tecnologias da Informação e Comunicação e programar uma atividade que os discentes pudessem ter contato maior com o processo de obtenção das preparações histológicas de amostras de dentes.

Com isso, atualmente é realizado seis formas distintas de metodologia ativas nas aulas práticas diurno, sendo cada destinada a estimular cognitivamente o aprendizado: ficha de desenhos histológicos, estudo de casos clínicos, análise de preparações histológicas com uso de microscópicos, elaboração de material dentário para fixação em lâminas (preparações histológicas), gamificação e interação aluno/monitor por meio de redes sociais.

Conteúdo programático da disciplina Histologia e Embriologia Oral	
Desenvolvimento Crânio Facial	Esmalte
Odontogênese	Periodonto de proteção
Rizogênese	Periodonto de inserção
Exfoliação dentária	Mucosa oral
Histogênese	Glândulas salivares maiores
Complexo dentino-polpa	Complexo temporo Mandibular

Tabela 1- Ementa da Disciplina Histologia e Embriologia oral

Fonte: Ementa Histologia e Embriologia Oral da UFPE

Métodos ativos do ensino-aprendizagem	
Ficha de desenhos histológicos	Material para fixação em lâminas
Uso de microscópicos	Gamificação.
Estudo de Casos Clínicos	Interação em redes sociais

Tabela 2- Metodologia ativa aplicada na disciplina Histologia e Embriologia Oral

Fonte: Material coletado da disciplina

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

Metodologias ativas nas aulas práticas de Histologia e Embriologia Oral

3.1 Ficha de desenhos histológicos

Essa metodologia ativa consiste em desenhar os tecidos de estudo visualizados por meio do microscópio. Os discentes com essa atividade reforçam o conteúdo sobre as estruturas mencionadas na aula teórica e estimulam partes cerebrais diferentes.

A correção é feita durante as aulas pelas monitoras corrigindo os desenhos e interagindo a tirar dúvidas com os alunos, como mostrado na imagem seguinte. É considerada uma avaliação processual do aluno.

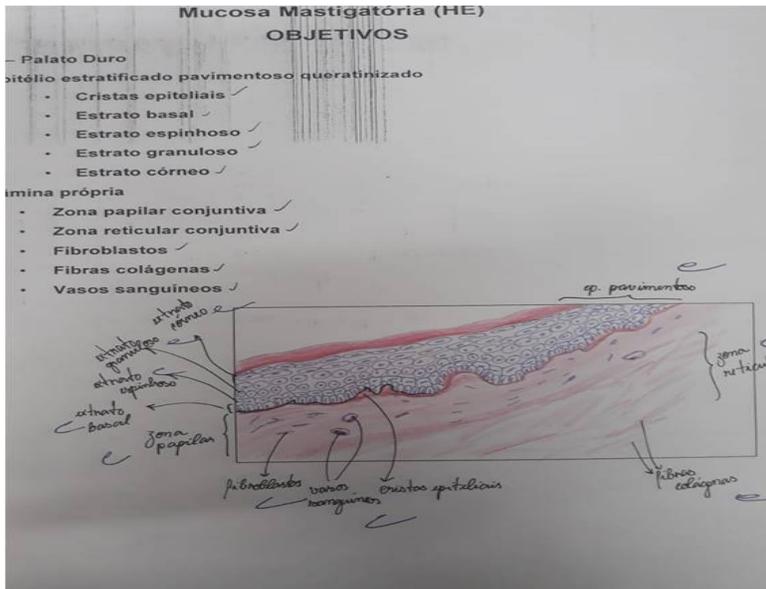


Imagem I- Desenhos histológicos

Fonte: Material coletado na disciplina

3.2 Microscópicos

O uso do microscópio é essencial e pode ser considerada outra metodologia ativa. O discente tem a oportunidade de ter um contato maior com o conteúdo estudado nas aulas teóricas, visualizando em diferentes graus de aumento, as estruturas e células nas preparações histológicas de forma que o aprendizado se torna mais completo e unificado.

3.3 Estudo de casos clínicos

Com a finalidade de contextualizar e tornar interdisciplinar os estudos de histologia e embriologia oral foi discutido casos clínicos de maneira que os discentes visualizassem a importância do conhecimento teórico-prático da disciplina bem como motivá-los.



Imagem II - Estudo de caso clínico durante aula prática

Fonte: Arquivo próprio

3.4 Atividade extra

Com o objetivo de envolver mais os discentes e inseri-los na disciplina, criamos uma atividade extra. Os alunos foram divididos em grupos e cada um desses grupos recebeu um elemento dental para realizar a redução da estrutura (polimento). Assim, realizando a primeira etapa necessária para fixação do material nas lâminas. Posteriormente, os alunos enviaram o material para a fixação no laboratório da UFPE e após essa etapa, na aula prática verificaram os tecidos dentais.



Imagem III - Elemento dental



Imagem IV - Elemento dental



Imagem V- Elemento dental polido



Imagem VI - Elemento dental polido

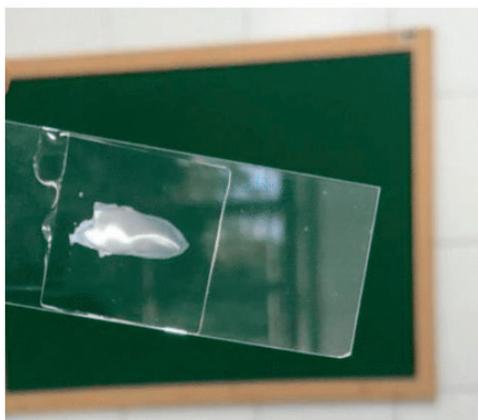


Imagem VII - Tecido dental na lâmina

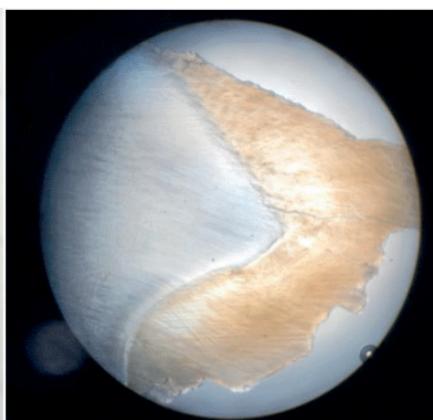


Imagem VIII - esmalte e dentina

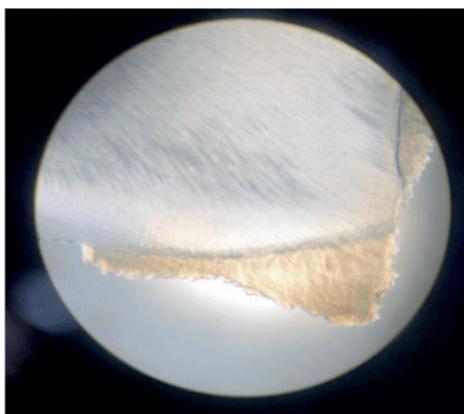


Imagem IX- esmalte e dentina

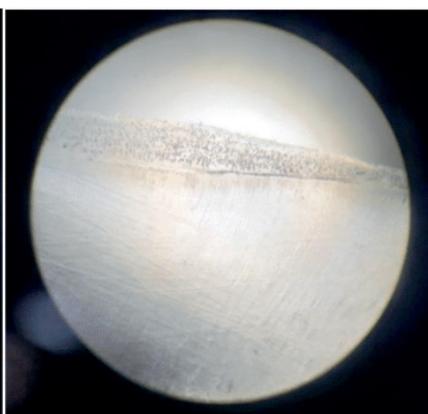


Imagem X - dentina e cimento

Fonte: Material coletado na disciplina

3.5 Gamificação

Durante a aula prática de revisão as monitoras elaboraram uma dinâmica com os alunos, assim optando por uma metodologia ativa usando a ferramenta TIC em sala. Dividiu-se a turma em três grupos e cada grupo acessou com os smartphone o aplicativo Kahoot. Por meio desse aplicativo, os grupos responderam às perguntas transmitidas ao mesmo tempo pelo projeto no quadro. A finalidade dessa atividade foi criar uma revisão alternativa que propiciasse aos discentes um conforto e prazer durante as revisões práticas. Ao final, o grupo que obteve a maior quantidade de respostas certas foi premiado.

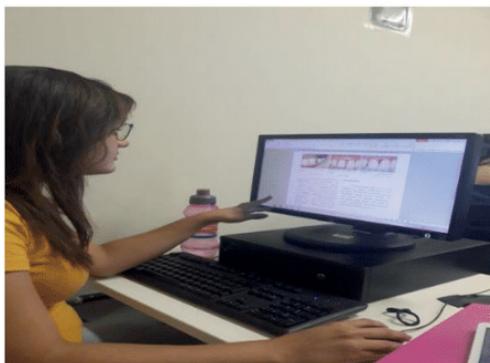


Imagem XI- Elaboração do jogo virtual (Monitora)

Fonte: Arquivo próprio



Imagem XII- Jogo virtual

Fonte: Arquivo próprio

3.6 Interação por meio de redes sociais

Diante da difusão crescente das redes sociais, as monitoras da disciplina visando interagir e tirar dúvidas dos alunos criou-se um meio adicional de comunicação por meio da formação de grupo nas redes sociais.

Sendo assim, as metodologias ativas são ferramentas cada vez mais utilizadas nas aulas práticas porque validam o ensino, motivam os alunos e contribuem a um melhor desempenho.

Em nossa disciplina de Histologia e Embriologia Oral 100% dos discentes realizaram os desenhos histológicos obtendo um excelente feedback, todavia, 15% desses estudantes considera que está ferramenta sozinha não é suficiente para a aprendizagem dos conteúdos.

Também, todos os discentes participaram ativamente das discussões dos casos clínicos pois consideravam uma atividade essencial, semelhantemente aos resultados de Limbergue (2013), pois houve essa mesma afirmação dos estudos sobre a aplicação de casos clínicos.

A revisão no formato de jogo virtual estimou os alunos na competitividade, por conseguinte a proatividade. Sobre a gamificação 96 % dos estudantes da disciplina referem-

se que utilização dos jogos eletrônicos contribui para o bom desempenho acadêmico, assim como elenca as pesquisas de Meireles e Bonifácio (2015).

Além disso, a atividade do material da fixação do elemento dental foi vista positivamente para os alunos e consideram as práticas com os microscópicos e a troca de informações pelas redes sociais ferramentas indispensáveis para um bom resultado na disciplina de Histologia e Embriologia Oral.

CONCLUSÃO

Evidencia-se, portanto, que através da aplicação de metodologias ativas com a utilização de Tecnologias da Informação e Comunicação os discentes da disciplina de Histologia e Embriologia Oral desempenharam um melhor resultado acadêmico concernente aos critérios de participação e cooperação durante as aulas, maior interesse nas aplicações clínicas e ótimo relacionamento monitor-aluno.

Portanto, conclui-se que com a utilização de metodologias ativas nas aulas teórico-práticas há uma maximização do ensino-aprendizagem. São técnicas simples e que se bem conduzidas podem ser traduzidas por outros veículos e transpostas para o ensino a distância também.

REFERÊNCIAS

CARDOSO, Marcelo Marques; ARAÚJO, Rogério Pimentel. **Monitoria acadêmica: relato de experiência em disciplina aplicada da terapia ocupacional.** Cardeno de Terapia Ocupacional da UFSCar, São Carlos, v. 16, n.1, p. 53-57, Jan./Jun. 2008.

COSTA, Sandra Regina Santana; DUQUEVIZ, Barbara Cristina; PEDROZA, Regina Lúcia Sucupira. **Tecnologias digitais como instrumentos mediadores da aprendizagem dos nativos digitais.** Revista Quadrimestral da Associação Brasileira de Psicologia e Educacional, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 603-610, set./dez. 2015.

LIMBERGUE, Jane Beatriz. **Metodologias ativas de ensino-aprendizagem para educação farmacêutica: um relato de experiência.** Revista Interface comunicação, saúde e educação, São Paulo, v.17, n.47, p.969-75, out./dez. 2013. DOI: 10.1590/1807-57622013.3683

MEIRELES, Maria Alcimar Costa; BONIFÁCIO, Bruno Araújo. **Uso de Métodos Ágeis e Aprendizagem Baseada em Problema no Ensino de Engenharia de Software: Um Relato de Experiência.** CBIE-LACLO, p. 180-189, [S.I], 2015.

Orlandi, Tomás Roberto Cotta; Duque, Claudio Gottschalg; Mori, Alexandre Mori. **Gamificação: uma nova abordagem multimodal para a educação.** Revista Biblosonline, Brasília, n. 70, Jan. 2018. ISSN 1562-4730

SOUZA, Flávio Marcelo Gabriel de. **Gamificação na educação: aproximações, estratégias e potencialidades.** Revista Espacios, [S.I.], v.39, n. 40, p.11, 2018. ISSN0798 1015

SOBRE O ORGANIZADOR

EDSON DA SILVA - Possui graduação em Fisioterapia pela Fundação Educacional de Caratinga (2001). Obteve seu título de Mestre (2007) e o de Doutor em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (2013). É especialista em Educação em Diabetes pela Universidade Paulista (2017), em Tecnologias Digitais e Inovação na Educação pelo Instituto Prominas (2020) e Pós-Graduando em Games e Gamificação na Educação (2020). Realizou cursos de aperfeiçoamento em Educação em Diabetes pela ADJ Diabetes Brasil, *International Diabetes Federation* e Sociedade Brasileira de Diabetes (2018). É docente da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), desde 2006, lotado no Departamento de Ciências Básicas (DCB) da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS). Ministra disciplinas de Anatomia Humana para diferentes cursos de graduação. No Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Ambiente atua na linha de pesquisa Educação, Saúde e Cultura. É vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, no qual atua nas áreas de Nutrição e Saúde Coletiva. É líder do Grupo de Estudo do Diabetes credenciado pelo CNPq no Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil. Desde 2006 desenvolve ações interdisciplinares de formação em saúde mediada pela extensão universitária, entre elas várias coordenações de projetos locais, além de projetos desenvolvidos em Operações do Projeto Rondon com atuações nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. É membro da Sociedade Brasileira de Diabetes, membro de corpos editoriais e parecerista *ad hoc* de revistas científicas nacionais e internacionais da área de ciências biológicas, de saúde e de educação. Tem experiência na área da Saúde, atuando principalmente nos seguintes temas: Anatomia Humana; Diabetes *Mellitus*; Processos Tecnológicos Digitais e Inovação na Educação em Saúde; Educação, Saúde e Cultura. É Editor da Revista Brasileira de Extensão Universitária (RBEU) e Diretor Científico da Coleção Tecnologia e Inovação na Educação em Saúde, Editora Appris.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Aceitação Sensorial 133
Albinismo 117, 121
Aprendizagem 26, 27, 30, 148, 174, 175
Avicultura 94, 102

B

Bactérias 11, 27, 30, 31, 43, 44, 48, 53, 54, 60, 83, 84, 85, 86, 93, 94, 95, 100, 101, 133, 134, 135, 157, 158, 159, 161, 162, 163, 165
Bactérias entéricas 43, 44
Bactérias lácticas 133
Bignoniaceae 11, 81, 82, 89, 90, 91, 92
Biossegurança 10, 25, 26, 27, 29, 31, 32

C

Cadeia Ecológica 117
Cefotaxima 94, 95, 96, 97, 99, 100
Coronavírus 27, 32, 124, 125, 126, 128, 130, 131, 132
COVID-19 12, 25, 26, 31, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132
Cuidado Parental 117, 121
Cultivo celular 3D 70

D

Diabetes Mellitus 12, 103, 104, 105, 107, 108, 114, 115, 116, 176
Dopamina 147, 148, 149, 150, 151, 152

E

Enfermagem 103, 116, 124, 125, 127, 128, 129, 130, 131, 165
Ensino 13, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 140, 167, 168, 169, 174, 175
Ensino-Aprendizagem 26, 30, 175
Entomopatogênicos 33, 34, 40, 42
Epidemiologia 10, 11, 12, 13, 15, 21, 115
Escherichia coli 43, 44, 47, 62, 67, 81, 82, 95, 101, 102, 157, 158, 159, 160, 166
Esquistossomose 10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

F

Fatores de risco 16, 19, 104, 106, 111, 112, 113, 114, 115, 116

Felinos 13, 15, 22

Fermentação 133, 137, 143

G

Gestão de riscos 124

H

Hyphomycetes 33

L

Lactobacillus 133, 134, 136, 143, 145, 146

Lentivirus 12, 13, 14

M

Modelagem computacional 70

N

Nanobiotecnologia 70

Nanoprata 158

O

Orégano 157, 158, 160, 161, 163, 165

P

Produção conidial 33, 34, 37, 40

Promoção da saúde 104, 105, 112, 113, 114, 115, 116

R

Recursos Naturais 44

Replica Plating 96, 97, 100, 102

Retossigmóide 1, 4, 5

S

Schistosoma mansoni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 90

Sistema de recompensa 147, 148, 149, 150, 151, 152

Staphylococcus aureus 81, 82, 157, 158, 159, 160, 165

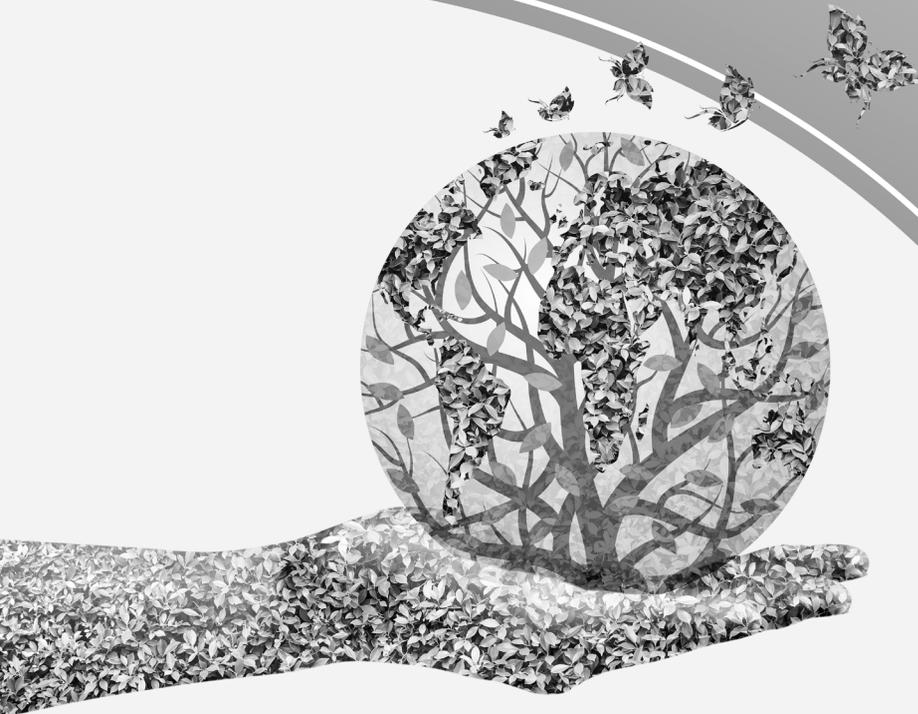
Substâncias Psicoativas 148, 149, 150, 151

V

Vírus entéricos 43, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 54

Ciências biológicas: Realidades e virtualidades 3

 www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br
 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
 www.facebook.com/atenaeditora.com.br



Ciências biológicas: Realidades e virtualidades 3

 www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br
 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

