

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)

AGENDA
GLOBAL

DE PESQUISA

EM CIÊNCIAS

BIOLÓGICAS

Atena
Editora
Ano 2021

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)

AGENDA
GLOBAL

DE PESQUISA

EM CIÊNCIAS

BIOLÓGICAS

Atena
Editora
Ano 2021

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

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 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 Federacão 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

Agenda global de pesquisa em ciências biológicas

Diagramação: Maria Alice Pinheiro
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Gabriel Motomu Teshima
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A265 Agenda global de pesquisa em ciências biológicas /
Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta
Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-614-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.147210311>

1. Ciências biológicas. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim
de (Organizadora). 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

A pesquisa não pode parar. Isto é um fato. E o livro “Agenda global de Pesquisa em Ciências Biológicas” é a prova de que o Brasil é profícuo quando se trata de pesquisa. Esta obra é composta por trabalhos científicos produzidos em diversas partes do país na forma de artigos originais e de revisão, que abordam desde o cultivo, triagem e citocompatibilidade de células-tronco mesenquimais expostas à nanotubos funcionalizados de carbono multicamadas até o controle de qualidade microbiológica do sururu (*Mytella falcata*) produzido no Rio de Janeiro, ou a análise temporal da disseminação de vegetação exótica em dunas do litoral do Rio Grande do Sul, ou o desenvolvimento do turismo e as mulheres erveiras da Amazônia. Todas estas pesquisas possuem campo dentro das Ciências Biológicas, mas fazem interface com meio Ambiente, Engenharia, Ciências da Saúde, Antropologia, Tecnologia de alimentos, entre outras áreas.

Ao longo de 13 capítulos serão discutidas diferentes temáticas, com embasamento teórico-científico adequado, atualizado e serão revistos conceitos importantes. Este livro é principalmente voltado para os estudantes e profissionais que desejam se aprofundar mais na pesquisa na grande área das Ciências Biológicas, com uma leitura rápida, dinâmica e cheia de possibilidades de aprendizado.

Assim como todas as publicações da Atena Editora, esta obra passou pela revisão de um Comitê de pesquisadores com mestrado e doutorado em programas de pós-graduação renomados no Brasil. Portanto, apresentamos ao leitor um trabalho de qualidade, atualizado e devidamente revisado por pares.

Boa leitura.

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

A TRAJETÓRIA DE JOAQUIM MONTEIRO CAMINHOÁ: UM BOTÂNICO NO IMPÉRIO DO BRASIL (1858-1896)

Alex Gonçalves Varela

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103111>

CAPÍTULO 2..... 20

ANÁLISE DE DESGASTE UTILIZANDO NANOLUBRIFICANTE ADITIVADO COM NANOPARTÍCULAS DE CELULOSE

Pollyana Grazielle Luz da Rocha

Matheus Gonçalves Leão de Oliveira

Paulo Vitor França Lemos

Larissa Alves de Sousa Costa

Adelson Ribeiro de Almeida Júnior

Jania Betania Alves da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103112>

CAPÍTULO 3..... 33

ANÁLISE TEMPORAL DA DISSEMINAÇÃO DE VEGETAÇÃO EXÓTICA EM DUNAS DO LITORAL MÉDIO DO RIO GRANDE DO SUL

Kátia Helena Lipp Nissinen

Jonas Marmitt Dias

Gustavo Machado Cauduro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103113>

CAPÍTULO 4..... 43

CITOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EXPOSTAS À NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS FUNCIONALIZADOS

Eduarda Rocha de Oliveira

Rafaella de Souza Salomão Zanette

Leonara Fayer

Elyabe Monteiro de Matos

Luiz Orlando Ladeira

Humberto de Mello Brandão

Michele Munk

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103114>

CAPÍTULO 5..... 51

QUALITY CONTROL OF ANTIVIRAL VACCINES WITH THE LITESIZER

Nathalie Etchart

Eduardo C. Araújo

Talita Cardeal

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103115>

CAPÍTULO 6..... 62

CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE GLUTARIMIDE ALKALOID JULOCROTINE

Regianne Maciel dos Santos Correa
Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso
Lorena Araújo da Cunha
Tatiane Cristina Mota
Diego Di Felipe Ávila Alcantara
Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon
Rosana de Nazaré Silva Peixoto
Rommel Rodriguez Burbano
Marcelo de Oliveira Bahia

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103116>

CAPÍTULO 7..... 74

ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA DO REMANESCENTE FLORESTAL DO CAMPUS DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (ARARAS, SP)

Steve de Oliveira Costa
Priscila Orlandini
Letícia Ribes de Lima

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103117>

CAPÍTULO 8..... 95

COMPARATIVE STUDY OF DRYING AND POST-FIXATION TECHNIQUES OF NIH 3T3 FIBROBLAST FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS

Susane Lopes
Giulia Galani Martha
Ana Paula Lorenzen Voytena
Deise Rebelo Consoni
Marcelo Maraschin

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103118>

CAPÍTULO 9..... 106

MULHERES ERVEIRAS DA AMAZÔNIA E O TURISMO DE BASE COMUNITÁRIA NA PERSPECTIVA DO DESENVOLVIMENTO LOCAL

Márcia Sueli Castelo Branco Bastos
Wagner Luiz Ramos Barbosa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.1472103119>

CAPÍTULO 10..... 123

PRÁCTICA DE RECOLECCIÓN DE LIANA “CIPÓ-TITICA” EN EL ESTADO DE AMAPÁ, BRASIL

Luciano Araujo Pereira
Patrick de Castro Cantuária

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.14721031110>

CAPÍTULO 11	130
PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU/PPG PARA ENCAPSULAÇÃO DE DICLOFENACO DE SÓDIO	
Cassio Nazareno Silva da Silva	
Karla de Aleluia Batista	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.14721031111	
CAPÍTULO 12	141
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SURURU (<i>MYTELLA FALCATA</i>) APERTIZADO EM SALMOURA ORIUNDO DA BAÍA DE SEPETIBA, RIO DE JANEIRO, BRASIL	
Karoline Ribeiro Palmeira Schmalz	
Flávia Aline Andrade Calixto	
Ronaldo Hertel	
Luiz Antonio Moura Keller	
Renata Torrezan	
Maria Carmela Kasnowski	
Eliana de Fátima Marques de Mesquita	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.14721031112	
CAPÍTULO 13	151
QUESTÕES DE BIOLOGIA NO ENEM (2009-2019) E SUAS ABORDAGENS EM LIVROS DIDÁTICOS	
Vagner Dias Raimundo	
Orcione Aparecida Vieira Pereira	
Filipe Brum Machado	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.14721031113	
SOBRE O ORGANIZADORA	163
ÍNDICE REMISSIVO	164

CAPÍTULO 1

A TRAJETÓRIA DE JOAQUIM MONTEIRO CAMINHOÁ: UM BOTÂNICO NO IMPÉRIO DO BRASIL (1858-1896)

Data de aceite: 25/10/2021

Alex Gonçalves Varela

Professor Adjunto do Departamento de História da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, Brasil
orcid.org/0000-0002-6853-0062

RESUMO: Temos como objetivo analisar a trajetória do cientista Joaquim Monteiro Caminhoá, dando ênfase a análise das suas produções científicas, em específico a obra *Das Plantas Tóxicas do Brasil* (1871), e a sua contribuição para o processo de emergência e consolidação da Botânica no Brasil do século XIX. Personagem bastante citado nos manuais de história da medicina, porém sua trajetória de vida ainda não foi devidamente estudada, e suas produções científicas não foram analisadas criticamente. Portanto, há lacunas que estimulam a continuidade dos estudos sobre o referido personagem.

PALAVRAS - CHAVE: História das Ciências; Joaquim Monteiro Caminhoá; Botânica; Império do Brasil.

THE TRAJECTORY OF JOAQUIM MONTEIRO CAMINHOÁ: A BOTANIST IN THE EMPIRE OF BRAZIL (1858-1896)

ABSTRACT: Our objective is to analyze the trajectory of the scientist Joaquim Monteiro Caminhoá, emphasizing the analysis of their

scientific productions, specifically the work *Das Plantas Tóxicas do Brasil* (1871), and his contribution to the process of emergence and consolidation of Botany in Brazil in the nineteenth century. Character often cited in medical history manuals, but his life trajectory has not been properly studied, and his scientific productions have not been critically analyzed. Therefore, there are gaps that encourage further studies on this character.

KEYWORDS: History of Sciences; Joaquim Monteiro Caminhoá; Botany; Empire of Brazil.

1 | INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Temos como objetivo analisar a trajetória do cientista Joaquim Monteiro Caminhoá, dando ênfase a análise das suas produções científicas, as produções científicas do médico-botânico Joaquim Monteiro Caminhoá, em específico a tese de concurso para a cadeira de Botânica Médica da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro (FMRJ), publicada no ano de 1871, que tem como título *Das Plantas Tóxicas do Brasil*, e a sua contribuição para o processo de emergência e consolidação da Botânica no Brasil do século XIX. Caminhoá ocupava a função de professor da FMRJ na qualidade de Opositor da Secção de Ciências Acessórias. E, tentava o concurso para se tornar Lente Catedrático da Cadeira de Botânica, que compunha o conjunto de disciplinas curriculares do segundo ano.

Joaquim Monteiro Caminhoá (1836-1896) foi um dos mais atuantes cientistas do

Império do Brasil. Ele graduou-se em medicina pela Faculdade de Medicina da Bahia no ano de 1858, e realizou o seu doutorado na mesma instituição. A seguir, ingressou no Corpo de Saúde da Armada, prestando serviços como segundo cirurgião atuando em hospitais e navios. Foi professor da Cadeira de Botânica e Zoologia da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, e da cátedra de história natural no Internato do Imperial Colégio de Pedro II. Foi sócio de inúmeras sociedades científicas nacionais e estrangeiras, como a Academia Imperial de Medicina, a Associação Brasileira de Aclimação, a Academia Brasileira de Medicina Militar, a Sociedade de Botânica da França, e a Sociedade de Ciências Naturais de Edimburgo. Foi membro adjunto da comissão brasileira na Exposição Universal de Viena, realizada de maio a novembro de 1873. Publicou inúmeros artigos e livros, dentre os quais salienta-se a obra *Elementos de Botânica Geral e Médica*, cuja primeiro volume foi publicado em 1877 seguido por mais dois números.

21 O CONTEXTO HISTÓRICO

O ingresso de Caminhoá na FMRJ se dá no contexto da década de setenta do século XIX, momento em que as elites médicas da Corte passaram a perseguir e discutir o movimento de reforma institucional. Tais reformas foram operadas com o Decreto de 19 de abril de 1879, a chamada reforma Leôncio de Carvalho, resultando na introdução da liberdade de ensino e do ensino prático das disciplinas médicas, alterando profundamente a FMRJ, e acabando por possibilitar o aparecimento de outros centros de produção e reprodução dos conhecimentos baseados no mesmo modelo de medicina. Figurino alemão. (EDLER, 2014, pp. 61-62).

As disposições da reforma Leôncio de Carvalho, que ainda não tinham sido executadas, foram ampliadas pelos decretos nº 8.024 de 12 de março de 1881 e nº 3.141 de 30 de outubro de 1882, e colocadas em execução por ordem dos Ministros do Império, Rodolpho Epiphano de Souza Dantas, e Pedro Leão Velloso. Conforme o decreto nº 3.141 o número de disciplinas do curso médico foi aumentado para 26 com a incorporação das seguintes cátedras em seu currículo: anatomia e fisiologia; clínica oftalmológica; clínica médica de adultos; clínica cirúrgica de adultos; clínica de moléstias médicas e cirúrgicas de crianças; moléstias cutâneas e sífilíticas; moléstias mentais. O curso odontológico foi instituído. Alteraram-se as normas que regiam os exames e o ensino prático recebeu novo impulso com a criação de 14 laboratórios e a nomeação de preparadores, assistentes e conservadores, categorias de funcionários até então inexistentes. (CASA DE OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ, 17/06/2021).

Os Estatutos implantados pelo Decreto 9311 de 25 de outubro de 1884, na gestão do Conselheiro Vicente Cândido Figueira de Sabóia (1881-1889), diretor da Faculdade, consolidam as reformas encetadas pelos lentes, dando-lhes respaldo jurídico. Tais estatutos mantinham em linhas gerais o plano de Leôncio de Carvalho, com pequenas

modificações. De acordo com Edler (2014, p. 10), os Estatutos de 1884 expressavam uma nova representação do saber médico, baseados no figurino germânico, que marcou a introdução dos estudos práticos das disciplinas clínicas e experimentais, e a quebra do monopólio da formação profissional pelas faculdades do Rio de Janeiro e de Salvador.

Por sua vez, salientamos que Caminhoá respira os ares da geração de 1870, cujos membros partilhavam a necessidade de uma intervenção política para formular uma crítica ao *status quo* imperial e apresentar um programa de reformas. Foi o que Alonso (2002) denominou de vez, convém reformismo. A conjuntura política do Império em suas últimas décadas foi marcada por uma crescente insatisfação em relação a características sociais e políticas do sistema, como a escravidão, a centralização, a união da Igreja e do Estado, e a própria forma monárquica de governo. Os indivíduos dessa geração partilhavam a experiência comum de exclusão social e política, marginalização em relação aos postos políticos, aos empregos, aos negócios. Por partilhar dessa situação negativa formularam críticas às instituições, valores e práticas fundamentais do regime político dominante saquarema. E, para tal, foram buscar onde as pudessem encontrar os argumentos e justificativas para expressar seu dissenso e imaginar projetos de reformas.

Caminhoá está inserido nessa geração de 1870, respirando os ares desse momento de reformas. Ele era um letrado, que integrava as elites médicas da Corte, e estava inserido nas instituições científicas do Império, como a FMRJ, e, num segundo momento, o Imperial Colégio Pedro II. Nestes espaços ingressou por meio de concurso público. Cabe salientar que a conquista do emprego por meio do concurso era uma possibilidade de inclusão nessa sociedade, contudo a patronagem e as fraudes nos concursos dificultavam muitas vezes a inclusão. (Idem. *Ibidem*, p. 138).

Caminhoá está integrado ao conjunto dos professores da FMRJ. Eles não foram decisivos na mobilização da geração de 1870, mas também não foram irrelevantes. Foram sobretudo os professores igualmente insatisfeitos com o padrão de carreira e com o gênero de formação recebido, que se aventuraram por buscar criar novas cátedras de clínicas especializadas e a construção de diversos laboratórios compreendendo todo um amplo leque de novas disciplinas clínicas e experimentais, na Faculdade de Medicina. As palavras de ordem ensino prático e ensino livre defendidas pelas elites médicas, como salientou Edler (2014, p. 189), “atingiram os pilares do modelo centralizador francês que inspirara a criação de todas as instituições médicas na fase de consolidação do Império Brasileiro. Tais inovações no cenário do ensino médico (...) ganharam aqui um novo significado”.

Inserido nesse contexto histórico, Joaquim Monteiro Caminhoá foi um cientista que teve uma carreira consolidada e reconhecida nacional e internacionalmente. O estudioso se dedicou a produzir conhecimento científico sobre questões médicas e botânicas. Estamos nos dedicando a estudar a sua trajetória acadêmica, que ainda não foi devidamente estudada, bem como as suas produções científicas ainda não foram analisadas profundamente. Dessa forma, há lacunas que precisam ser preenchidas pelos

estudiosos que se dedicam a pesquisar as relações ciências e trajetórias, e caminhos amplos e profícuos que merecem ser explorados e estimulam novas reflexões. (VARELA, 2019; 2021) Conforme já informarmos, a produção científica de Caminhoá que iremos analisar é *Das Plantas Tóxicas do Brasil*.

3 I ANÁLISE DAS PLANTAS TÓXICAS DO BRASIL (1871)

Antes de iniciar a primeira parte do texto, Caminhoá aborda três tópicos. Primeiro escreveu uma dedicatória destinada à Sociedade Velosiana. Em seguida, elaborou uma justificativa para o texto. E, por último, o autor redigiu um breve histórico sobre o uso pelo homem de substâncias venenosas proveniente de plantas tóxicas.

Caminhoá dedica essa obra à Sociedade Velosiana. Esta, reunida pela primeira vez em 27 de julho de 1850, foi um dos principais fóruns de discussão e divulgação de atividades e contribuições científicas no Brasil Império. A Sociedade tinha como fim “indagar, coligir e estudar todos os objetos pertencentes à história natural do Brasil; e juntamente averiguar e interpretar as palavras indígenas, com que forem designados”. (Casa de Oswaldo Cruz/ Fiocruz, 05/06/2020) Em sua dedicatória, Caminhoá diz que a Sociedade Velosiana é a única sociedade de naturalistas do Brasil, “sendo um foco do qual pode o país esperar muita luz para a resolução de problemas de máxima importância”. (Caminhoá, 1871, VII).

Ao justificar seu texto, Caminhoá exclamou que “Não há um só trabalho nacional, ou estrangeiro sobre – Plantas Tóxicas do Brasil!”. (Idem. Ibidem, X) E, argumentou que o trabalho que ora apresentava era a primeira monografia sobre o assunto. Assim afirmou:

Não ha um só trabalho nacional, ou estrangeiro sobre – Plantas tóxicas do Brasil ! O nosso, de pena tão humilde, vai ser a 1ª Monografia sobre o assunto ! E isso em um país que, na brilhante frase de St. Hillaire, é o Éden do reino vegetal! Em um país essencialmente agrícola e pastoril! Felizmente o fogo sagrado no Brasil ainda não se extinguiu completamente no templo da ciência. Alguns, muito poucos é verdade, dos sacerdotes que o veneram, conservam ou pelo menos ensinam a conservar a chama, embora pálida e lampejante. (Idem. Ibidem, X).

O autor fez questão de salientar o esforço exercido por ele de compilar a bibliografia sobre o assunto, sendo necessário pesquisá-la em bibliotecas públicas ou na de particulares. Nestas últimas, Caminhoá sublinhou a importância de “alguns cavalheiros” que lhe franquearam o acesso aos materiais ou deixaram consultá-la em suas própria residência. Muitos foram seus colaboradores, “conspícuos homens da ciência”, dentre os quais podemos mencionar o Conselheiro Francisco Freire Alemão (1797-1874), Custodio Alves Serrão (1799-1873), Conselheiro Henrique Pedro Carlos de Beaurepaire Rohan (1812-1894), Guilherme Capanema (1824-1908), Nicolau Joaquim Moreira (1824-1894), Ladislau de Souza Mello Netto (1838-1894), Auguste François Marie Glaziou (1828- 1906), entre outros, homens que têm como característica em comum o estudo das ciências naturais.

Em especial mencionou Capanema e Beurepaire Rohan, que “perderam largas horas a instruírem-me sobre as propriedades das diversas plantas que eles estudaram em suas peregrinações científicas pela diferentes províncias do Império”, bem como a “amabilidade” de Nicolau Moreira, e Ladislau Neto, que “foram do maior proveito para o resultado do meu trabalho, como vereis das transcrições e citações que faço em relação a cada planta”. (Idem. Ibidem, IX-X) Fez questão de sublinhar também a “bondade” de Custódio Alves Serrão, o qual chamou de “Belisário da Ciência”, e que colocou a disposição de caminhoá “seu tesouro de saber, e sua memória”. (Idem. Ibidem, X).

E, um agradecimento especial conferiu a Freire Alemão, o “Decano da Botânica Brasileira”, este sábio cuja

bondade de coração se traduzem facilmente em sua fisionomia alegre e bondosa e em sua fronte nobre, aí está, para mostrar, como em uma idade avançada, depois de inúmeros serviços prestados ao Brasil, ou melhor ao mundo, porque a Ciência não tem pátria, evita os gozos da vida banal, e da sociedade indiferente, e emprega todas as tépidas horas do inverno de sua vida no estudos dos seres naturais, dos vegetais da pátria!

Oxalá não tenham o Brasil e a Ciência de perder os inúmeros e perfeítissimos trabalhos produzidos com tanta consciência e dedicação no seio de seu agradável retiro! Preza a Deus que tantos centenares de plantas novas do Brasil, não descritas ainda antes dele, não tenham de servir para glórias de outros!

Deus inspire nossos homens de governo, e faça que eles, dominados de patriotismo, como os cremos, mandem imprimir aqueles trabalhos; lembrados de que “um povo é tanto mais admirado, quanto maior número de sábios conta em seu seio”.

Rendido esse tributo de homenagem ao meu, e ao Vosso Mestre, digo cheio de orgulho: que o meu trabalho, pelas razões expostas, e mais porque contém esclarecimentos fornecidos por eles, e também por outros homens beneméritos da ciência, não pode deixar de ser acolhido por vós. (Idem. Ibidem, XI).

Ao redigir um breve histórico sobre o uso das substâncias tóxicas fornecidas pelas plantas, Caminhoá citou os egípcios e romanos, que não somente as usavam como arma do suicida, mas como instrumento da lei.

Citou também o haxixe, utilizado bastante pelos árabes para se “embriagarem, e experimentarem os prazeres da visão que lhes aparecem durante o sono provocado por esta substância”. (Idem. Ibidem, p. 1) No meio científico, argumentou Caminhoá, o haxixe é conhecido como o “Cânhamo da Índia (Cannabis indica), de cujas sumidades floridas preparam um decoto, e um eleituário, a que eles denominam *Dawamesc!*” (Idem. Ibidem, p. 2) .

Informou também na Grécia e na Roma antigas, o suco da cicuta, e do *Hyoscyamus* era “levado na taça mortífera em nome da lei e da justiça”. (Idem. Ibidem, p. 2)

Na primeira parte do texto, Caminhoá expôs que o objetivo a ser trabalhado é a botânica aplicada à toxicologia. Antes, porém, trata de elucidar algumas definições, como o

que seria considerada uma planta tóxica ou venenosa. Em suas palavras:

De acordo com a maior parte dos toxicologistas (...) consideramos venenosa, ou tóxica — toda planta, que, sendo absorvidos pela economia animal seus sucos, ou melhor seus princípios ativos, produz alterações graves da saúde, ou a morte. (Idem. Ibidem, p. 3).

Ou seja, as plantas ditas tóxicas não se tratam apenas de venenos, como também medicamentos aplicados de forma ordinária, sempre sendo necessário se atentar para a dosagem, vacuidade do estômago, idade, entre outros aspectos. Contudo, informou que o estudo tem um foco primário nas substâncias venenosas. (Idem. Ibidem, p. 4).

De acordo com o autor, para classificarmos uma planta de tóxica se faz necessária a apreciação de várias circunstâncias.

A primeira delas são as propriedades inerentes às diversas famílias. Caminhoá informa que há plantas, que, pelo simples fato de pertencerem a certas Famílias, se tornam suspeitas quanto à sua ação. Citou algumas das Famílias mais comuns de serem interpretadas como tóxicas, tais como as *Loganiaceas*, *Apocynaceas*, *Solanaceas*, *Euphorbiaceas*, *Ranunculaceas*, *Cogumellos ou Fungos*, *Umbellíferas*, *Colchicaceas*, *Papaveraceas*, *Asclepiaceas*.

Caminhoá argumentou que em outras Famílias, em que há uma grande quantidade de plantas familiares, merecem ser consideradas com atenção aquelas que não forem muito conhecidas. Dentre os exemplos que o botânico apresentou encontram-se: as *Cucurbitaceas*, que a par do melão, melancia, pepino, abóbora, também se encontram a *bryonia*, a *coloquintida*, o *elaterio*, e outras venenosas; as *Araceas*, oferecem o *Arum vulgare*, e alguns outros alimentares. Entretanto, o *Arum maculatum*, *Arum italicum*, *Arum dracuncululus*, entre outros, podem ocasionar acidentes graves; as *Caparidaceas*, que embora tenham algumas comestíveis, como o *Mussambê* (gênero cleome), possui também algumas venenosas.

Segundo Caminhoá, muitos toxicologistas classificam os envenenamentos pelos vegetais, segundo suas famílias. Exemplos podem ser vistos nos casos das *Solaneasvirosas*, *Strychnaceas* (hoje *Loganiaceas*) e *Ranunculaceas*. Isso se dá devido plantas semelhantes em suas organografias, morfologias, habitação, entre outros fatores, comumente compartilhar algumas propriedades.

O autor argumentou que a cada grupo de plantas, naturalmente semelhantes, quanto à sua organografia, morfologia, habitação, facies, entre outros, compete um determinado número de propriedades igualmente comuns. Tal consideração vale tanto para as plantas venenosas, como para as que não são.

Apesar disso, o autor aponta que existem exceções, como o *Abutilon venenosum*, planta nimiamente tóxica, que pertence a família das *Malvaceas*.

Sobre as doses necessárias para o envenenamento humano, Caminhoá argumentou que poderiam variar de acordo com a planta de origem do veneno. Algumas com uma

dose muito pequena já seriam suficientes para levar um ser humano à morte em questão de minutos, como algumas *Loganiaceas* e *Apocynaceas*. Caminhoá exemplificou com as muitas tribos existentes, tanto no Brasil, como na Ásia, África e Oceania, que envenenavam suas flechas nos sucos daquelas duas Famílias supracitadas. Um desses venenos que é relativamente famoso é o Curare. Por sua vez, ha algumas substâncias que precisam de uma quantidade bem maior de doses para poder gerar efeito semelhante, como o *Manacá*, *Brunsfelsia uniflora* (de Plum.), *Franciscea uniflora* (de Mart.), a *Erva de rato*, entre outras. (Idem. Ibidem, p. 6).

Caminhoá argumentou, levando em consideração premissas toxicológicas, que as plantas venenosas atuam de forma distinta nos órgãos dos animais, podendo ser classificadas e nomeadas de formas diferentes de acordo com aquela atuação. A manifestação dos sintomas tóxicos depende de circunstâncias mais ou menos variáveis. O local do animal onde acontece o contato com o veneno também é um fator que influência seu efeito. O estômago seria um local onde a absorção do veneno ocorreria de forma mais fácil, porém fatores como o suco gástrico poderia modificar ou decompor esse veneno. Em função desta constatação, Caminhoá chegou ao seguinte corolário: “O corolário que daí se tira é, que tanto mais seguro será o efeito da substância tóxica, quanto mais vazio estiver o estômago”. (Idem. Ibidem, p. 7) Para contornar tal situação, argumentou o cientista, a inoculação hipodérmica seria uma opção mais segura de aplicação daqueles princípios. (Idem. Ibidem, p. 7).

Segundo Caminhoá, algumas experiências já feitas pela ciência comprovariam aquela possível alteração dependendo da forma em que o veneno tenha contato com o corpo do animal. Essas experiências foram feitas com o Curare e outros tipos de substâncias, como o veneno de serpentes, ou cobras venenosas, aplicado diretamente no estômago de coelhos e outros animais, sem ter resultados fatais. Sublinhou Caminhoá que as mesmas experiências “teriam dado resultados terríveis se aqueles líquidos fossem inoculados.” (Idem. Ibidem, p. 7).

Para os vegetais, o cientista argumentou que aquela consideração supracitada também tinha validade. Na maioria dos venenos vegetais, observou o estudioso, eles têm certa uma predileção pelos centros nervosos. O envenenamento por meio dos sucos brasileiros acaba gerando sintomas como convulsões, paralisias e delírios.

De acordo com Caminhoá, o tempo necessário para qualquer planta venenosa produzir efeitos varia. Há envenenamentos lentos, mas há também plantas cujas propriedades tóxicas “excedem a tudo quanto se pode julgar!”. (Idem. Ibidem, p. 8) Por exemplo, com relação ao primeiro tipo de envenenamento, ocorre por meio de substâncias como o mercúrio, o iodo, e a digitalina. (Idem. Ibidem, p. 9).

Caminhoá mencionou os estudos de João Teodoro Descourtiz (1796-1855) sobre os homicídios ocorridos pela propinação de venenos vegetais que os escravos cometiam em São Domingos e outras regiões das Antilhas. Contudo, discordava Caminhoá, ao exclamar

que “e quantas vezes por insignificantes ofensas! Maldita escravidão! Foi ela, a meu ver, e não esses supostos frívolos motivos, que deu lugar a todos aqueles crimes execrands.” (Idem. Ibidem, p. 9).

Convém salientar na passagem supra a argumentação do autor contrária àqueles que afirmavam que os homicídios ocorridos em regiões das Antilhas eram produtos diretamente relacionados à ingestão dos venenos vegetais pelos escravos. Para Caminhoá, era produto da nefasta instituição da escravidão, com sua brutal violência sobre os negros, que os levava a cometer tais crimes. Lembremos que Caminhoá integrava sociedades abolicionistas, como a Sociedade Abolicionista da Escravatura, e vivia num momento do Império em que inúmeras propostas de reforma daquela sociedade estavam sendo apresentadas, inclusive a crítica e abolição da escravidão.

O autor considerou também que o uso do veneno é uma prática “reprovaííssima”, e que é “duplamente detestável”, pois não apenas ceifa a vida do envenenado, e “porque é traiçoeira, tem sido averiguados, que demonstram ser possível com dozes fracionadas, e insensivelmente, ao cabo de um tempo mais ou menos longo, sacrificar uma ou mais vítimas”. (Idem. Ibidem, p. 9).

Num parágrafo, Caminhoá resumiu as suas considerações sobre a ação das plantas venenosas sobre o organismo dos seres vivos:

Quando a dose é elevada, e a absorção pronta, a morte de ordinário tem lugar mais ou menos rapidamente; quando a absorção é lenta por qualquer circunstância, ou quando as doses são fracionadas, apenas se manifestam os sintomas primordiais da intoxicação, ou esta segue lenta ou quase insensivelmente a sua marcha, até que em um dia há uma enérgica manifestação (químico-dinâmica), e a vítima sucumbe. (Idem. Ibidem, p. 9).

Em casos de dúvida sobre o efeito tóxico ou não de determinada planta, Caminhoá descreve um pequeno guia de experimentos que podem ser feitos no que ele chama de “animais inferiores”. Nesses experimentos é necessário usar o suco de diversas partes da planta, pois cada parte pode ter um efeito, tomando cuidado para não aquecer esse suco a uma temperatura superior a 100°C, pois altas temperaturas mudam muitos dos princípios do reino orgânico.

Outro fator que poderia alterar as propriedades da planta é o contato com substâncias ácidas ou alcalinas. Caminhoá sublinhou o cuidado que se deveria ter para evitar o contato das matérias cujas qualidades tóxicas se desejava saber, com os ácidos e álcalis, para se obter um juízo exato. Porque entre as primeiras e as últimas poderiam ocorrer algumas reações que poderiam mudar completamente suas propriedades não só tóxicas, mas também físico-químicas. (Idem. Ibidem, p. 10).

Caminhoá diz que quando uma substância testada em animais inferiores ocasiona o seu óbito, a mesma deve ser classificada como tóxica. Apesar disso, essa mesma substância venenosa, que é mortal para esses animais, pode não ser para animais de

classes superiores, e vice-versa.

Caminhoá apresentou, em primeiro lugar, experimentos realizados pelo francês Jean-Louis Alibert (1768-1837). Ele aplicou doses de sublimado ao Ouriço, e outros animais de sua classe, sem que os mesmos fossem sacrificados. Por sua vez, num segundo momento, nutriu um roedor com raiz do *Hyosciamus* ou Meimendro, sem que houvesse o indício de substância tóxica. Porém, ao empregar a Cicutu, logo vieram a óbito. (Idem. Ibidem, p. 11).

O autor descreve um experimento feito por ele com animais inferiores:

Eu experimentei asfixiar ou intoxicar vários animais inferiores, com os vapores do álcool quase anídrico :—para isso empreguei um grande balão de vidro bitubulado, e por uma das aberturas fiz penetrarem vapores do liquido que, depois de ter estado em contacto com o clorureto de cálcio bem seco durante dois dias, destilei em uma retorta. — Estabeleci uma corrente de vapores alcoolicos nessas condições. Previamente coloquei uma aranha dos jardins, um cloporte, um iullus—,uma borboleta diurna, e um gorgulho grande no interior do balão. (Idem. Ibidem, p. 11).

Caminhoá informou que o resultado desse experimento foi que a borboleta foi a primeira a morrer, em seguida a aranha, depois a do iullus, seguido pelo gorgulho, o último a morrer, depois de alguns minutos, foi o cloporte. (Idem. Ibidem, p. 11).

O estudioso argumentou que as suas experiências apresentadas, bem como as do francês Alibert, nada tinham de extraordinário. E, a seguir teceu a seguinte consideração:

Se os organismos variam nos seres diversos da escala zoológica, que vivem nos meios os mais diferentes, se nutrem de substâncias as mais heterogêneas, e oferecem até uma composição químico-física muito diversa, claro é que o modo de atuar dos ingesta não pode ser neles sempre idêntico. (Idem. Ibidem, pp. 11-12).

Segundo as pesquisas de Caminhoá, o clima tem o potencial de exercer mudanças nas propriedades das plantas, podendo assim torná-las venenosas ou não. Assim argumentou:

Uma planta pode ser venenosa em um país sob a ação de um certo clima, e modificar, ou perder aquela propriedade sob a ação de novos elementos modificadores, isto é, de climas opostos, ou pelo menos não idênticos. (Idem. Ibidem, p. 12).

Para exemplificar ele citou o pêssego, que na Pérsia seria venenoso e em outros países um “agradável alimento”. Outro exemplo é a berinjela, venenosa nas Antilhas e um alimento comum no Brasil e na Europa. Isso se daria pela alteração química causada pela temperatura a qual a planta está submetida. (Idem. Ibidem, pp. 12-13).

Caminhoá argumentou que esta possibilidade de adquirir novas propriedades tóxicas ou perdê-las pode ser explicado pelas reações químicas ocorridas no interior da economia vegetal, as quais variam, quer com a temperatura total de cada ambiente ou somadas temperaturas parciais. Temperaturas mais elevadas facilitariam a exalação e a

rapidez da circulação, além de diminuir o tempo em que a planta percorre as suas fases de vegetação. Caminhoá sublinhou ainda que o trabalho das secreções glandulares deve igualmente variar, conforme a intensidade térmica ou calorífica do meio ambiente. (Idem. Ibidem, p. 13).

Para finalizar a discussão, Caminhoá assim comentou: “ (...) a temperatura influi sobre o trabalho da vegetação e das secreções; ergo sobre o dos princípios tóxicos. Lembraremos que os venenos mais ativos talvez, e em maior número, acham-se na zona intertropical dos diferentes continentes, salvas poucas exceções.” (Idem. Ibidem, p. 13).

Quanto à influência do terreno sobre as plantas venenosas, segundo Caminhoá, é difícil distinguir se a influência é exercida por questões químicas do solo ou pela mecânica simples. Nessa questão, autores como Augustin Pyrame de Candolle (1778-1841) e Hugo Von Mohl (1805-1872), compartilham a ideia de que o que influencia as características da vegetação é o estado físico, ou seja, a agregação maior ou menor das moléculas do solo. O professor Aylmer Bourke Lambert (1761-1842) ressalta a importância das qualidades químicas do solo, porém também considera a importância do estado de agregação do solo. Autores como Jules Thurmann (1804-1855) dão importância equivalente para esses dois fatores, químicos e físicos. (Idem. Ibidem, p. 14).

Em estudos feitos a partir da análise química de um grande número de plantas, notou-se que alguns princípios e compostos poderiam variar muito. Em contrapartida alguns são constantes, como a celulose, o lenhoso, a clorofila, o amido, etc. Algo observado nos estudos é que foram encontrados determinados constituintes inorgânicos em todas as plantas, quase de forma invariável, sendo eles, potassa, soda combinadas aos ácidos orgânicos ou inorgânicos, ácido carbônico, silícico, sulfúrico, clorídrico, entre outros, combinados com bases orgânicas e inorgânicas, a água, entre outros. (Idem. Ibidem, p. 15).

Caminhoá argumentou que se a nutrição se faz no seio da terra, ou melhor no meio em que se acham imersas as raízes, claro fica que nos vegetais devem predominar os princípios e compostos químicos, que existirem naqueles meios, ou que forem suscetíveis de formarem-se, graças as decomposições e recomposições dos agentes ali contidos.

Caminhoá prosseguiu argumentando que no seio da economia vegetal se dão inúmeras reações e formações de corpos novos, graças aos elementos que se encontram na substância propriamente da seiva, no líquido intercelular, no proto-plasma das células, e nas fibras das plantas.

Um processo químico importante que ocorre nas plantas é a desoxidação, por meio do qual o oxigênio é despreendido, dando origem a novos produtos. Por meio desse processo de separação do oxigênio são formadas várias substâncias, como ácido tartárico, na uva e no tamarindo; ácido málico, na maçã e na uva; ácido cítrico na laranja, limão, lima e parreira; ácido gálico nas sementes do mangue; ácido mecônico nas Papoulas. Caminhoá argumentou que quando essa perda de oxigênio é maior, passamos dos ácidos

às substâncias neutras como a celulose, o amido, a goma e o açúcar, produtos bastante abundantes nas plantas. (Idem. Ibidem, p. 16).

Para Caminhoá, a formação dos princípios tóxicos se pode explicar no “grande laboratório bio-químico”. (Idem. Ibidem, p. 17) As substâncias tóxicas, segundo o autor, são em sua maior parte compostas de carbono, hidrogênio, oxigênio e azoto. (Idem. Ibidem, p. 17).

Em primeiro lugar, Caminhoá informou sobre as várias fontes do azoto, que no interior dos vegetais, fornecem o contingente para a formação dos princípios tóxicos. A seguir, comentou que quanto os corpos azotados, tóxicos ou não, que se encontram nas plantas, eles existiam desde a semente, ou se formaram à proporção que as “substâncias nitradas e amoniacaís” trazidas pela seiva se puseram em contato com alguns agentes já formados em sua economia. (Idem. Ibidem, p. 18) Lembrou o autor que há, porém, substâncias azotadas tanto nas sementes, como nas células.

Caminhoá prosseguiu informando que é um princípio básico da Fisiologia Vegetal que um vegetal para germinar precisa de calor, ar, e humidade. Segundo o autor, esta última atua sobre o amido, ou a fécula existente nos cotilédones, ou no albúmen, dando lugar a uma modificação de suas moléculas, sem contudo alterar o a quantidade dos diversos elementos que a compõe. De acordo com o botânico, a diástase “é o corpo a que me refiro, cujos elementos existem na semente, e graças ao calor e humidade manifesta-se com todos os caracteres de um fermento, converte o amido em Dextrina, isto é, graças a sua ação de catalise um novo arranjo das moléculas do primeiro tem lugar”. (Idem. Ibidem, pp. 18-19).

Sobre o processo que tornou o amido solúvel, assim comentou Caminhoá:

Não careço dizer que a natureza sempre sábia em suas obras produziu aquela transformação a fim de tornar solúvel o amido que tem de ser absorvido e levado para o interior das células da semente, e produzir a seiva primitiva, que limita seu curso provavelmente à simples giração, ou circulação intra-celular.

A diastase pois é a matéria azotada da semente; como tal ela se acha classificada pelo professor Gerhardt e outros. (Idem. Ibidem, p. 19).

Caminhoá sublinhou também que experiências como as de Jan Ingenhouze (1730-1799), Nicolas Théodore de Saussure (1767-1845) e Johann Heinrich Robert Göppert (1800-1884), mostraram que durante a germinação das sementes diminuiu o azoto do ar atmosférico. (Idem. Ibidem, p. 19).

De acordo com Caminhoá, é indispensável que as substâncias nutritivas que têm de ser absorvidas pelas raízes sejam solúveis na água, pois que, conforme argumentou o autor, “como se acha demonstrado em trabalhos de Química Fisiológica, os corpos insolúveis, ainda quando reduzidos a pó subtilíssimo em suspensão nos líquidos, não são absorvidos.” (Idem. Ibidem, p. 20) E, alertou:

experiências que pareciam inatacáveis, que por serem feitas por sábios

e honestos Naturalistas, quer pelos seus resultados (...) não merecem a aceitação que mereceram até há pouco. (Idem. Ibidem, p. 19).

Caminhoá sublinhou que experiências recentes demonstram que a tinta de escrever não é absorvida com a sua cor negra, “se as extremidades radiculares estiverem sem solução alguma de continuidade”. (Idem. Ibidem, p. 20) E, prosseguiu:

No caso contrário vê-se a substância negra muito tênue percorrer não os vasos sevosos, porém todos os capilares que estiverem em comunicação com a solução de continuidade embebida, e, segundo os fisiologistas de então, isto servia para indicar o modo e lugar por onde ascendia a seiva. (Idem. Ibidem, p. 21).

Seguindo os argumentos do cientista, é princípio irrefragável que a nutrição se faz nas plantas com os princípios terrosos ou minerais solúveis na água. E, em função dessa consideração, dois corolários podem ser estabelecidos. O primeiro estabelece que a planta que fosse transplantada para um terreno que possuísse arsênico ou mercúrio, poderia se tornar prejudicial ou não para a saúde de quem a consumisse conforme o *minereo* daqueles metais for solúvel, ou insolúvel na água. Essa absorção poderia transformar uma planta comum em venenosa. Porém, Caminhoá acredita que é uma possibilidade remota, pois “os *minereos* daqueles como dos outros metais venenosos são insolúveis”. (Idem. Ibidem, p. 21).

O segundo corolário apresentado por Caminhoá é aquele que considera que, se suceder que uma planta, cujo princípio tóxico seja decomposto, pelos carbonatos alcalinos, sulfatos, entre outros, acha-se transplantada, ou tenha nascido em terrenos sódicos, ou de potassa carbonatados, ou sulfatados, sem sombra de dúvida podem suas propriedade venenosas ser modificadas ou completamente abolidas. E, finalizou argumentando que: “Inúmeras hipóteses realizáveis facilmente podem ser apresentadas, e aceitas sem escrúpulo, que provem essa verdade”. (Idem. Ibidem, p. 21).

As estações do ano também influenciam as plantas. De acordo com Caminhoá, “a seiva e suas propriedades variam conforme as estações”. (Idem. Ibidem, p. 22) Na primavera, a seiva chamada bruta “quando chega às sumidades da planta, contém muito mais princípios orgânicos do que aquela que se recolhesse nas proximidades da raiz”. (Idem. Ibidem, p. 22) Por sua vez, no outono, “o tronco e a casca se enchem de fecula e outros nutrientes e o *cambium* se enche de uma substância granulosa que o iodo colore em amarelo. A fecula se converte em dextrina e açúcar”. (Idem. Ibidem, p. 22).

Caminhoá diz que as características tóxicas de uma planta podem variar de acordo com sua idade. Algumas são alimentícias quando novas e se tornam tóxicas quando florescem, como no caso da alface e algumas chicórias. Além disso, o princípio tóxico das plantas pode estar em partes diferentes dela, nas sementes, flores ou nas raízes, podendo em cada uma delas oferecer uma propriedade. Esse é o caso da Mandioca, citado por Caminhoá. (Idem. Ibidem, p. 23).

O autor salienta que em climas quentes, quando há constantemente o calor, existe uma aceleração nas fases das plantas, possibilitando mais de um ciclo completo por ano, ou duas gerações de brotos ou três. Então, Caminhoá coloca a questão: “Quem ignora entre nós, que no Norte do Brasil há duas colheitas de laranjas e de outros frutos?” (Idem. Ibidem, p. 23).

Por sua vez, na primavera, argumenta Caminhoá, quando a ascensão da seiva bruta tem lugar, e se o laboratório químico-vital propriamente dito só pode funcionar, depois que a seiva tem sido elaborada, salienta o autor que “as propriedades tóxicas devem tornar-se saliente depois da primavera. Esta é regra geral.” (idem. Ibidem, p. 23).

Salienta ainda Caminhoá que não tendo “a seiva a mesma composição química nas diferentes estações do ano, não pode a planta ser igualmente venenosa em todas elas”. (Idem. Ibidem, p. 23).

A proximidade ou afastamento com os oceanos, segundo o autor, confere um certo *fácies* à vegetação, fato que a torna característica.

De acordo com Caminhoá, as plantas que estiverem mais próximas do mar são quase sempre rijas e possuem uma organização especial, uma vez que precisam ser resistentes aos ventos, e para não ter os seus tecidos e sucos alterados pelo clorureto de sódio e outros sais. (Idem. Ibidem, p. 24).

Caminhoá considerou que as águas dos mares são mortais para algumas plantas. Contudo, para outras, aquelas ocasionam reações ou decomposições de qualquer natureza, não contêm os princípios necessários para a nutrição, e numerosos *raphides* que se formam no interior das células impedem a *giração*. Daí, segundo argumento de Caminhoá, alguns naturalistas afirmarem que o clorureto de sódio altera a composição dos agentes químico-vegetais nas plantas. O autor argumenta, por sua vez, que o clorureto de sódio também altera os “*princípios tóxicos, ipso facto*; e essa conclusão já tem de há muito sido aceita na prática de alguns observadores”. (Idem. Ibidem, p. 24).

Caminhoá mencionou uma afirmativa que diz que “não existem plantas venenosas nas praias”. Entretanto, o autor questionou a consideração supracitada:

a proposição que nega propriedades tóxicas à toda e qualquer planta marítima peca por absoluta; ela pode muitas vezes perder total, ou parcialmente aquela propriedade; porém uma Loganiacea, uma Apocynacea, uma Solanacea (virosa), etc., embora marítimas, são quase sempre venenosas. A mais venenosa de todas as plantas talvez, a Mancenilha, dá nas praias salgadas das Antilhas. (Idem. Ibidem, pp. 24-25).

Segundo o autor, alguns “fito-fisiologistas” têm tentado demonstrar que os sais contidos nos terrenos próximos ao mar influem sobre os venenos. Caminhoá concorda em alguns casos, em outros discorda. No caso dos cogumelos, por exemplo, ele concorda:

Está demonstrado que o clorureto de sódio, se não decompõem completamente a fungina, princípio ativo daqueles vegetais, pelo menos a torna inócua, o que quer dizer, modifica-lhe a composição; pelo que é de regra na Europa e outros

lugares, onde se usa em grande quantidade dos cogumelos como alimento, nos casos de dúvida se os põem contato com o sal, depois do que podem ser impunemente comidos, segundo afirmam alguns botânicos. (Idem. Ibidem, p. 25).

Ao comentar sobre as partes tóxicas das plantas, Caminhoá iniciou citando Humboldt¹, quando este afirma que: “Mas a ação vital, esse jogo de afinidades químicas, de que só conhecemos o efeito, dá origem na mesma planta às produções mais heterogêneas.” (Idem. Ibidem, p. 25) E, Caminhoá considerou tal afirmação verdadeira.

Caminhoá considerou válido que em uma mesma planta, conforme o órgão ou planta que se estuda, bem como experimentando sobre os animais, os resultados tóxicos podem variar, ou mesmo variam muito às vezes. O autor citou então diversos exemplos como o *Eseré* ou *Fava de Calabar* (*Phytostygya venenosum*), que se “experimentar as sumidades florais, ou as folhas, casca, entre outros, apenas pequenos sintomas de envenamento pela *Eserina*, seu princípio ativo, ocorrerão” (Idem. Ibidem, p. 26); o exemplo da laranja (*Citrus aurantium*): “tem as raízes amargas e tônicas, e bem assim o cortical, as folhas completamente desenvolvidas são estomáquicas e ligeiramente excitantes, os brotos, ou renovos e as flores anti-espasmódicos, o pericarpo excitante e fortemente aromático, o líquido contido no endocarpo, ou o suco do fruto é ácido e temperante, as sementes tônicas e amargas” (Idem. Ibidem, p. 26); outro exemplo fornecido é o da mandioca (*Jatropha manihot* de Linn): “oferece as folhas alimentícias, e sem ação tóxica sensível (...) o fruto da planta é venenosíssimo, segundo tenho aprendido; suas raízes contêm duas partes muito distintas, e mesmo diametralmente opostas sob o ponto de vista alimentar: uma fuculenta, de que se prepara a farinha, que serve de alimento à máxima parte da população, e outra eminentemente tóxica, a manipuera” (Idem. Ibidem, p. 26); a *urtiga* foi outro exemplo fornecido: “em suas folhas tem um princípio urente, produto de glândulas pediculadas, que as cobrem; o mesmo se dá no caule: suas raízes são diuréticas, seus frutos e sementes nenhuma particularidade notável apresentam, além de serem mucilaginosos, e ligeiramente adstringentes” (Idem. Ibidem, p. 26).

Caminhoá argumentou que não se pode absolutamente e sempre afirmar que, pelo fato de uma planta conter princípios tóxicos, qualquer uma de suas partes possa vir a produzir a morte, ou graves perturbações da saúde. O autor considerou que no geral o princípio predominante em um vegetal pode ser encontrado em todas as partes da planta, de onde se deduz que de uma parte considerada inócua de uma planta se pode extrair doses mínimas de substâncias tóxicas, e que somadas com outras iguais, podem resultar uma quantidade, cuja ação seja muito enérgica. Exemplo disso pode ser visto no cajueiro, onde se encontra a substância caustica e acre também nas suas folhas, porém em dozes muito pequenas se comparadas às do pericarpo. (Idem. Ibidem, p. 27).

¹ Caminhoá citou Alexander Von Humboldt (1769-1859). No caso a obra *Voyage de Humboldt et Bonpland. Plantes Équinoxiales*, 1808.

Como já dito, quando se há dúvidas sobre as propriedades tóxicas de uma planta, é necessário, segundo Caminhoá, fazer experimentações em “animais inferiores”. Segundo o autor,

Pondo de parte as Associações Zoófilas inglesas etc., que procuram opor certas barreiras aos estudos de Fisiologia experimental, Toxicologia, etc., só para que não sofram os pobres animaizinhos(!), em toda parte do mundo civilizado, onde se cultiva as ciências com afã – é este o meio comumente empregado, afim de com segurança e conhecimento de causa poder decidir: 1º se uma planta, ou substância é, em geral, tóxica; 2º quais os sintomas que oferecem os envenenamentos por elas ocasionados; 3º quais os antídotos de que pode com segurança lançar mão o prático?

Assim, creio eu, é melhor ser filântropo do que zoófilo. (Idem. Ibidem, pp. 27-28).

Caminhoá considerou conveniente e indispensável a realização de experimentos com os animais e plantas. Para um resultado satisfatório dos experimentos, algumas precauções deveriam ser tomadas. Primeiramente, com as plantas, deve-se atentar para a amostra não ser exposta a um calor intenso, pois a temperatura pode mudar alguns de seus princípios, o mesmo vale para a exposição a ácidos alcalinos e sais, que pelas mesmas razões podem dar lugar à formação de novos corpos, ou a combinações tais que façam perder as propriedades tóxicas, ou as adquiriam, quando não tivessem.

Caminhoá argumentou que o Oxalato de cal pode ser encontrado em uma planta, e ser impunemente ingerido pelos animais. Caso, porém, a ação de um ácido for tal que se apodere daquela base, pode ocorrer o envenenamento.

Sublinhou que para o ácido oxálico há inúmeras objeções, que tem importante valor nos laboratórios de química, porém não podem ser aceitas no grande laboratório da química dinâmica.

Argumentou também que quimicamente falando seria inadmissível a presença de sílica pura no interior das células. Contudo, graças a ação de uma força poderosa, isto sucede não poucas vezes.

Caminhoá argumentou que dizem que não convinha, para que o botânico toxicologista emitisse um parecer consciencioso sobre uma planta suspeita, misturá-la com os alimentos adubados, ou ácidos, entre outros.

Alertou para o fato de que o veículo em que se faz a solução dos princípios das plantas a analisar é uma circunstância de máxima importância, e que não convinha ser esquecida. Ademais, também deveríamos estar atentos para a escolha da parte a empregar, uma vez que um mesmo vegetal pode oferecer uma de suas partes tóxica, outra medicamentosa, e assim por diante.

Considerou que os sucos expressos e recentemente extraídos das plantas são os verdadeiros meios de incutirem a convicção sobre as conclusões a que se quer alcançar, uma vez que as substâncias tóxicas, se existirem já formadas, aí estarão na condição de

serem os sucos recentemente extraídos. E, ainda alertou sobre a emulsão de amêndoas doces:

Bem sabeis que a emulsão de amêndoas doces, que é inocente pode tornar-se venenosíssima, desde que em um fermento especial (a sinaptase, se bem me lembro) lhe for ajuntado. Sabe-se a prontidão com que os sucos vegetais, principalmente em nosso clima entram em fermentação. E quem nos pode assegurar que no caso de que nos ocuparmos não se possa dar a formação de um desses fermentos capazes de determinarem a formação de um corpo tóxico?

Essa cautela eu a apresento apenas, sem poder assegurar sua indeclinável necessidade. (Idem. Ibidem, p. 29).

A seguir, Caminhoá passou a comentar sobre as cautelas relativas aos animais. Em primeiro lugar, ele tratou da escolha do animal, e, a seguir, das condições especiais para a experiência.

O tipo de animal empregado à pesquisa depende do seu fim. Se for apenas para testar se a planta é tóxica ou não, qualquer um serviria. Nos Estados Unidos e Europa, coelhos e porcos da Índia são utilizados, muito por conta de seu baixo preço e grande taxa de reprodução. Para experimentos mais complexos, em caso de decidir de sua inocuidade relativamente ao homem, poderiam ser utilizados animais como orangotangos. Segundo Caminhoá, o cão seria o animal mais próprio para os experimentos, por seus hábitos alimentares e por compartilhar o meio com o ser humano. (Idem. Ibidem, p. 31).

Seguindo a ideia do Sr. Dr. Francisco Ferreira de Abreu (1823-1885), seria aconselhado a escolha de um cão de rua, pois assim além do benefício do resultado do experimento, haveria o benefício de tirar um cão da rua que poderia morder alguém. A dose empregada em cães podia variar de 1/3 até 2/3 da dose humana, dependendo do tamanho do animal. (Idem. Ibidem, p. 31).

Para o experimento, é preferível que o estômago do cão se encontre vazio antes da ingestão do veneno. Um problema que pode acontecer é o cão vomitar. Para contornar a situação, Caminhoá indica laquear o esôfago do animal durante algumas horas, podendo mais tarde ser retirado o laço, ou o fio. E, a seguir afirma: “Se a substância sobre que versar a experiência for tóxica realmente, e o animal sucumbir, não há inconveniente na ligadura; se pelo contrário escapar, se curará facilmente mais tarde.” (Idem. Ibidem, p. 31).

Caminhoá também alega que tal processo da laqueadura acaba por ter pontos negativos, como dificultar a visualização de certos sintomas do envenenamento como a sede e a constrição da garganta, assim como os sintomas de inflamação da laqueadura podem gerar dúvidas no experimentador. É indicado, quando possível, a substância ser aplicada pelo método hipodérmico, pois contorna tais problemas. (Idem. Ibidem, p. 32).

Ao fim do texto Caminhoá enfatiza a importância da probidade científica, “norte único dos verdadeiros cultores da ciência”, não permitindo que um cientista seja leviano e afirme que uma planta é tóxica para os humanos por ser tóxica para outros animais, tais

como aves e peixes. Ou seja, alguns venenos podem ser fatais para determinados tipos animais e inofensivos para os humanos e vice-versa. São citados exemplos pelo autor, como o caso do *arrebenta cavalo* e a sua congênere no norte, a *melancia da praia*, fatais para solípedes e ruminantes, e praticamente seus furtos são inofensivos para as crianças. Outro exemplo fornecido foi o da *mancenilha*, que é comida por peixes e caranguejos, porém mata outros tipos de animais. E, por fim, o exemplo da *erva-moura*, venenosa para animais superiores, e ingerida sem problemas por algumas aves e peixes. (Idem. Ibidem, p. 32) E, para finalizar, citou como referência o médico holandês Pison, em sua *História Natural e Médica do Brasil*, para demonstrar essa verdade.

Na segunda parte do texto, intitulada *Das Plantas Tóxicas do Brasil em Particular*, Caminhoá explicou sobre o método a ser utilizado para comentar sobre as referidas plantas. O autor escolheu por começar falando das plantas que tem uma ação venenosa mais enérgica, sem deixar de seguir o roteiro científico, assim trabalhando sua classe, família e gênero. (Idem. Ibidem, p. 35).

Em seguida, Caminhoá enfatiza a importância nos estudos das ciências naturais da necessidade de ser fiel na exposição de uma planta, quer seja dos caracteres botânicos conforme aqueles que a classificaram, quer segundo suas condições de existência, sua pátria, bem como referir os nomes de quem a classificou ou suas abreviaturas. E, justificou: “porque isto serve, para, em presença de uma amostra, poder-se fazer o estudo, conforme o que disser quem a estudou minuciosamente; e bem assim para poder-se decidir no caso de erro, ou dúvida, recorrendo à fonte pura”. (Idem. Ibidem, p. 35) Ao proceder dessa forma, Caminhoá argumentou que “será sempre mais vantajoso, pelo menos o mais aproximadamente possível da exposição dos que estudaram as plantas em primeiro lugar, e nos pontos onde espontaneamente elas se desenvolvem”. (Idem. Ibidem, p. 35).

Caminhoá informou que certas famílias predominam em espécies tóxicas, dentre as quais os exemplos que serão trabalhadas, e que naturalmente se desenvolvem no Brasil, são os das *Asclepiaceas*, *Apocinaceas*, *Loganiaceas*, *Euphorbiaceas*. (Idem. Ibidem, pp. 35-36).

Caminhoá diz ter se preocupado em utilizar as fontes mais modernas para as classificações, porém deixou claro a dificuldade para se manter atualizado nos progressos da Organografia, Anatomia e Fisiologia vegetais. Segundo o autor, isso ocorre devido às descobertas diárias na área, gerando denominações e classificações novas, ao ponto de catálogos científicos “chegarem a passar de quinze ou dezesseis anos de atraso!” (Idem. Ibidem, p. 36) As dificuldades para o estudo foram tamanhas que o autor admite a possibilidade de faltas em seu trabalho, em suas palavras, “Grandes foram as dificuldades com que lutamos; restando nos o desprazer de não podermos considerar depurado de faltas, principalmente deste gênero, o nosso trabalho”. (Idem. Ibidem, p. 36).

Caminhoá informou que a seguir ao reconhecimento das plantas tóxicas e classificá-las, seriam apresentados os nomes científicos e vulgares das mesmas, o local de ocorrência,

observações peculiares, fato que facilitaria o estudo da sua classificação e descrição.²

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da obra *Das Plantas Tóxicas do Brasil* deixa transparecer a produção do conhecimento científico no Império do Brasil. Caminhoá nos apresenta um estudo denso, aprofundado, detalhado, bastante rico em informações, exigindo conhecimentos especializados, no caso a Botânica. A obra apresenta a definição de plantas tóxicas; as doses necessárias para o envenenamento humano; a ação das plantas venenosas sobre o organismo dos seres vivos; as propriedades das referidas plantas; a influência sobre as plantas venenosas do clima, do terreno, das estações do ano, dos oceanos; a defesa da utilização de plantas e vegetais para a realização de experimentos, entre outros temas que se fazem presentes. Observam-se também citações de importantes nomes da ciência oitocentista, bem como um conjunto variado de sistemas de classificação utilizados para nomear e classificar as plantas tóxicas do Brasil. Caminhoá era um letrado da sociedade imperial, especialista no conhecimento botânico, inserido nas instituições científicas, e atualizado com as questões científicas que eram discutidas no momento de produção do seu texto. *Das Plantas Tóxicas...* constitui-se como uma importante contribuição do autor para o processo de emergência e consolidação das ciências naturais no Brasil oitocentista.

REFERÊNCIAS

CAMINHOÁ, Joaquim Monteiro. *Das Plantas Tóxicas Do Brasil*. Tese De Concurso Para a Cadeira De Botânica Médica Da Faculdade De Medicina Do Rio De Janeiro. Rio de Janeiro: Tipográfica Perseverança, 1871.

ALONSO, Angela. *Idéias em Movimento. A Geração 1870 na Crise do Brasil-Imperio*. São Paulo: Paz e Terra, 2002.

Casa de Oswaldo Cruz / Fiocruz. *Dicionário Histórico-Biográfico das Ciências da Saúde no Brasil (1832-1930)*. Verbete Sociedade Velosiana de Ciências Naturais. In: <http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br> (Acessado no dia 05/06/2020).

Casa de Oswaldo Cruz / Fiocruz. *Dicionário Histórico-Biográfico das Ciências da Saúde no Brasil (1832-1930)*. Verbete Escola Anatômica, Cirúrgica e Médica do Rio de Janeiro. In: <http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br> (Acessado no dia 17/06/2021).

EDLER, Flavio Coelho. *Ensino e Profissão Médica na Corte de Pedro II*. São Paulo: Editora UFABC, 2014.

VARELA, Alex Gonçalves. Joaquim Monteiro Caminhoá: um médico ilustrado do Império do Brasil, 1858-1896. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*. Rio de Janeiro, v.26, n.1, jan.-mar. 2019, pp.335-345.

² Torna-se impossível apresentar nas páginas deste artigo o conjunto das plantas tóxicas levantadas e classificadas mencionadas por Caminhoá. Tal tarefa ficará para uma próxima oportunidade.

VARELA, Alex Gonçalves; VIEIRA, Gabriel; PEREIRA, João Marcos Rocha (Orgs.). *Um Botânico no Império do Brasil: a Trajetória de Joaquim Monteiro Caminhoá (1858-1896)*. Rio de Janeiro: Quártica, 2021.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE DESGASTE UTILIZANDO NANOLUBRIFICANTE ADITIVADO COM NANOPARTÍCULAS DE CELULOSE

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 06/08/2021

Pollyana Grazielle Luz da Rocha

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia –
UFRB/CETEC
Cruz das Almas – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/3996127082434031>

Matheus Gonçalves Leão de Oliveira

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia –
UFRB/CETEC
Cruz das Almas – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/1815044778561081>

Paulo Vitor França Lemos

Universidade Federal da Bahia – UFBA
Salvador – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/4388682631324552>

Larissa Alves de Sousa Costa

Faculdade Ruy Barbosa
Salvador – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/7827106114824773>

Adelson Ribeiro de Almeida Júnior

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia –
UFRB/CETEC
Cruz das Almas – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/6522996398201398>

Jania Betania Alves da Silva

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia –
UFRB/CETEC
Cruz das Almas – Bahia
<http://lattes.cnpq.br/8274283822651950>

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas de celulose (NPCs), e utilizá-las na preparação de nanolubrificantes. As nanopartículas de celulose (NPCs) foram preparadas por hidrólise ácida (H_2SO_4), e adicionadas a um lubrificante industrial em diferentes concentrações (0,50%, 0,75%, 1,0% e 1,25%) para obtenção de nanolubrificantes, os quais foram avaliados em teste tribológico (pino-disco -velocidade de rotação - 500 e 63 rpm e carga externa 8,47 N), quanto ao parâmetro da taxa de desgaste. As NPCs apresentaram boa estabilidade térmica (230°C), razão de aspecto (L/D) entre 23 – 35, e alto rendimento (74%). Os nanolubrificantes mostraram desempenho diferente de acordo com a concentração das NPCs e condição de teste. A taxa de desgaste reduziu significativamente com o aumento da concentração das NPCs no lubrificante, mostrando redução de até 99% (condição mais severa de teste) em relação ao fluido sem NPCs. Adição de nanopartículas de celulose na preparação de nanolubrificantes apresenta-se como um campo vasto ainda a ser explorado.

PALAVRAS - CHAVE: Nanolubrificantes; nanopartículas de celulose; taxa de desgaste.

WEAR ANALYSIS USING NANOLUBRICANT ADDED WITH CELLULOSE NANOPARTICLES

ABSTRACT: The present study aimed to prepare and characterize cellulose nanoparticles to prepare nanolubricants. The cellulose nanoparticles were prepared by acid hydrolysis (H_2SO_4) and added to an industrial lubricant

in different concentrations (0.50%, 0.75%, 56 1.0%, and 1.25%). The nanolubricants were evaluated in a tribological test (pin-disc) under rotation speed (500 and 63 rpm) and external load (8.47 N) regarding the wear rate. The cellulose nanoparticles showed good thermal stability (219.0 ° C), aspect ratio (L D-1) between 23-35, and high yield 74%). The nanolubricants showed different performances according to the concentration of cellulose nanoparticles and test conditions. The wear rate expressively reduced with the increase of cellulose nanoparticles concentration in the lubricant, showing a reduction of up to 99% (more severe test condition) compared to the fluid without nanoparticles. Cellulose nanoparticles' addition for the preparation of nanolubricants presents itself as a vast field yet to be explored.

KEYWORDS: Nanolubricants, cellulose nanoparticles, friction coefficient, wear rate.

1 | INTRODUÇÃO

A crescente procura por aprimoramentos dos métodos de fabricação e manutenção de elementos de máquina tem colaborado para o aumento de novas pesquisas na área da tribologia. Falhas em peças mecânicas podem ocorrer devido ao atrito e o desgaste, para reduzir esses efeitos vem sendo desenvolvidos novos materiais (lubrificantes), que ganham cada vez mais utilização na indústria, visando reduzir estas falhas e aumentar a vida útil de peças e equipamentos mecânicos (MALDONADO-CORTÉS, et al., 2020).

Uma forma mais efetiva de controle dos parâmetros tribológicos (erosão, elevadas temperaturas, atrito e desgaste) em sistemas mecânicos é através da lubrificação (WIECHOWSKI, ADAMUS, DYNER, 2020). Os lubrificantes mais usados em aplicações industriais são óleos minerais, porém existem algumas desvantagens em relação a seu uso. Com o intuito de reduzir essas desvantagens, surgiram os lubrificantes a base d'água, porém o uso da água gera baixa viscosidade e reduz a tensão superficial. Para diminuir essas deficiências são utilizados aditivos para melhorar essas limitações (WANG et al., 2019).

Existem vários tipos de nanofluidos a base d'água com diferentes tipos de nanopartículas, algumas delas são: cobre (Cu), magnésio (Mg), zinco (Zn), titânio (Ti) e alumínio (Al), no entanto o uso dessas trazem desvantagens quanto ao meio ambiente e reciclagem (HUO et al., 2020). Com a crescente preocupação com os danos ambientais, o uso de nanopartículas de celulose vem sendo proposto como um novo aditivo ambientalmente "amigável", graças a propriedades como: biodegradação, baixa densidade, alta resistência mecânica, alta área superficial e morfologia (AWANG et al., 2020, SILVA et al, 2020), estas aparecem como uma alternativa com grande potencial para ser explorado.

Na procura por melhorias em relação ao desgaste e redução de impactos ambientais, como também contribuir com o aperfeiçoamento dos fluidos lubrificantes, o presente estudo tem por finalidade produzir e caracterizar nanopartículas de celulose, provenientes de fontes renováveis, e incorporá-las a um fluido lubrificante industrial a base d'água, resultando na produção de nanolubrificantes, submetendo-os ao teste de pino-disco para determinação de desgastes lineares.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 Material

Polpa de celulose (Eucalyptus kraft), com alto teor de alfa-celulose (96 - 98%), foi cedida pela Bahia *pulp Company* (Brasil), utilizada na preparação das nanopartículas de celulose (NPCs). Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (NEON Química, São Paulo, Brasil), Lubrificante comercial Rocol® Ultracut 250 (ITW Fluids & Hygiene Solutions, Inglaterra), e para os testes tribológicos foram utilizados discos de aço SAE 1010/1020 galvanizado com diâmetros interno (26,40 mm) e externo (50,00 mm), espessura (3mm), e dureza 75 HR (BSHSTORE dy Diprotec, Brasil), e esferas de aço cromo 52100 (dureza 800 HV e 5mm de diâmetro) (ROSSI Airguns. Airsoft, Brasil), todos adquiridos comercialmente.

2.2 Preparação das nanopartículas de celulose (NPC)

Na preparação das nanopartículas de celulose (NPCs) utilizou-se a metodologia proposta por Silva (2012, 2019), com adaptações. Hidrólise ácida - Para cada 5g de polpa de celulose (Eucalyptus kraft) foi adicionado 75 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 55%), em seguida a solução foi submetida a agitação mecânica constante a 50 °C por 45min. Após o tempo decorrido, adicionou-se, para cada 5g de celulose, 300 ml de água destilada em baixa temperatura (10°C), para neutralizar a reação. A solução foi submetida a centrifugação (4000 rpm por 10min), repetiu-se essa etapa oito (08) vezes para obtenção da dispersão de NPCs. As dispersões das nanopartículas com o pH menor 6 (seis), foram submetidas a diálise para neutralização (pH 6 -7).

2.3 Análises termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA das nanopartículas de celulose foi realizada em um analisador térmico (*Perk Elmer; Pyris 1 TGA*, Shelton, Connecticut, USA), sob atmosfera inerte (N_2), fluxo de 20 mL/min, taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 – 900°C.

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As micrografias das nanopartículas de celulose (NPCs) foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL, modelo EM 12130), seguindo metodologia proposta por Silva et al. (2012), Silva et al (2020). Uma gota da dispersão aquosa (0,3%) das nanopartículas de celulose foi depositada em grade de níquel (300 mesh). Após secar, a grade foi corada com solução de acetato de uranila (2%), seca à temperatura ambiente, em seguida submetida a análise. O comprimento e largura das NPCs foram extraídos de várias imagens TEM (cerca de 30 imagens).

2.5 Rendimento da produção de nanopartículas (NPCs)

Para o cálculo do rendimento das nanopartículas de celulose (NPC) utilizou-se o método da estufa, proposto por Celestino (2010), com modificações. Foram preparadas três amostras, onde 10 ml da dispersão (NPCs) foi colocada em um béquer, em seguida submetido a secagem em estufa e mantida em temperatura constante (100°C), por aproximadamente 4 horas. Na sequência, as amostras foram retiradas para verificação do peso final, repetindo cinco vezes a pesagem de cada béquer (com um intervalo de 5min entre cada pesagem), procedimento foi repetido até que três medidas consecutivas idênticas/próximas do conjunto fossem obtidas. Ao final da secagem, observou-se um filme translúcido no fundo do béquer, indicando a conclusão do processo. Foi calculada a média aritmética das massas obtidas. O rendimento foi calculado de acordo com a Equação (1):

$$RE = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde *RE* é o rendimento das nanopartículas de celulose, m_i é a massa inicial e m_f é a massa final.

2.6 Incorporação das nanopartículas ao lubrificante (nanolubrificante)

A dispersão das nanopartículas de celulose (NPCs) foi adicionada ao lubrificante (diluído em água - 35:1/água:óleo), nas concentrações (0,50% m/m); (0,75% m/m); (1,0% m/m) e (1,25% m/m) e submetida agitação manual. Foram preparados 2 litros de cada nanolubrificante para realização dos testes de pino-disco.

2.7 Teste tribológico (pino-disco)

Para execução do teste tribológico (pino-disco), de acordo Oliveira et al, 2020, um disco foi conectado ao eixo de um torno mecânico (na placa de quatro castanhas) (Nardini Mascote MS-205 com potência de 6,3/4Hp) junto a um dispositivo contendo duas hastes, uma fixa acoplada ao suporte de ferramentas, e outra móvel que comporta a esfera e o suporte para o peso (carga externa). Um dinamômetro (para medir a carga inicial e final) foi inserido entre hastes móvel e fixa, e um tubo contendo nanolubrificante foi colocado no ponto de contato esfera-disco, permitindo a lubrificação durante o movimento (os dados obtidos foram utilizados para cálculo da taxa de desgaste – Equação 2). Os teste foram realizados em duas velocidades de rotação (63 e 500rpm) e carga externa (8,47N) (Tabela 1). Todos os testes foram realizados em triplicata.

A taxa de desgaste foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$w = \frac{V}{F \cdot x} \frac{\text{mm}^3}{\text{Nm}} \quad (2)$$

Onde w é a taxa de desgaste, V é a perda de volume da amostra, F carga aplicada e x distância percorrida pelo pino.

2.8 Caracterização dos discos

Os discos foram limpos e pesados em balança analítica (precisão de 10^{-3}) antes e após cada teste, com o objetivo de medir a quantidade de material removido do disco, como também avaliar a possível formação de filme de óxido gerados pelo contato esfera-disco. Para análise das marcas de desgaste, utilizou-se um microscópio estereoscópio binocular (magnitude 50x) com câmera digital acoplada (ZEISS STEMI - 2000).

3 | RESULTADOS E DISCURSÃO

3.1 Análise termogravimétrica (TGA) das NPCs

O resultado da análise termogravimétrica das NPCs pode ser observado nas curvas (TGA e DTG) Figura 1. A curva TGA (Figura 1) mostra um padrão característico para este tipo de material (nanocelulose), com eventos sucessivos de perda de massa.

A curva de DTG (Figura 1), mostra que as nanopartículas de celulose (NPCs) apresentaram quatro eventos seguidos de perdas de massa. Comportamento similar aos relatados na literatura (SILVA, 2012, SILVA 2019, SILVA 2020). O primeiro evento ocorreu entre 25 – 132 °C (perda de massa, $m = \sim 2\%$), atribuído à perda de umidade da amostra. Os eventos térmicos de degradação distintos estão associados aos cristais mais e menos acessíveis para temperaturas baixas e altas, respectivamente. Ao aumentar a temperatura, a decomposição ocorre como um processo caracterizado pela despolimerização da cadeia, desidratação e decomposição das ligações glicosídicas em duas faixas de temperatura diferentes (MIRANDA 2015, SILVA 2019). Para os cristais mais acessíveis, a decomposição ocorre entre 152 - 218 °C ($m = \sim 20\%$) e para os menos acessíveis entre 219 - 335 °C ($m = \sim 30\%$). O quarto evento entre 336 - 233 °C ($m = \sim 47\%$) foi atribuído à pirólise e decomposição de resíduos carbonizados para formar produtos gasosos de baixo peso molecular. As nanopartículas mostraram estabilidade térmica de aproximadamente $T_{\text{onset}} = 219$ °C.

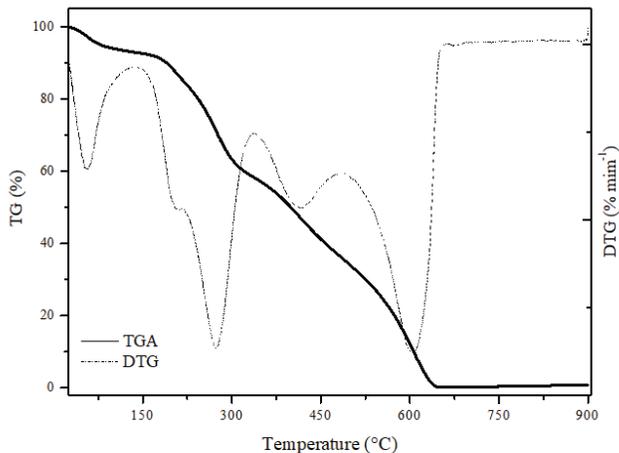


Figura 1: Curvas TGA e DTG das nanopartículas de celulose (NPCs).

Comportamento similar foi relatado por Miranda et al. (2015), para nanocristais de celulose (extraído de fibra de piaçava - *Attalea funifera*), com três eventos térmicos, o primeiro relacionado a perda de umidade ($T_{\text{onset}} = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$), segundo atribuído à degradação dos cristais mais acessíveis ($T_{\text{onset}} = 197\text{ }^{\circ}\text{C}$), e o terceiro dos cristais menos acessíveis ($T_{\text{onset}} = 294\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pinheiro et al. (2021) relatou para nanopartículas de celulose (extraídas de fibra de algodão), estabilidade térmica de $T_{\text{onset}} = 262\text{ }^{\circ}\text{C}$, e degradação relacionada a despolimerização entre $308 - 410\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na produção de nanopartículas a partir da medula do caule de milho, Gu et al. (2020) relatou estabilidade térmica de $T_{\text{onset}} = 260\text{ }^{\circ}\text{C}$, e degradação em único processo de pirólise entre $260 - 380\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O uso de lubrificantes é imprescindível para na vida útil de um sistema mecânico, a capacidade térmica desses lubrificantes tem um papel extremamente importante, absorvendo o calor de peças em contato e reduzindo desgastes nas superfícies de contato (KOITA et al., 2018). Ao comparar o comportamento térmico das NPCs relatado neste estudo com nanopartículas mais utilizadas (metálicas e cerâmicas) como aditivo a lubrificantes, observa-se uma menor estabilidade térmica, comportamento esperado por se tratar de um material de origem polimérica (celulose), sem modificação superficial.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para avaliar qualitativamente a organização das nanopartículas de celulose (NPCs), morfologia, estimar a distribuição de tamanho (comprimento e diâmetro), e calcular a razão de aspecto (L/D). A micrografia das nanopartículas de celulose (NPCs), pode ser visualizada na Figura 2.

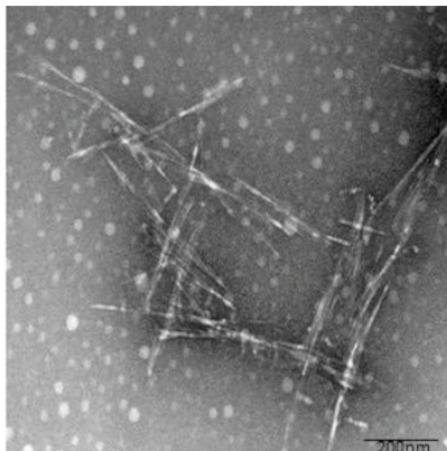


Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de celulose (NPCs).

A imagem mostra nanopartículas com estrutura tridimensional e formato de agulhas, padrão mais encontrado para esse tipo de material, com pouca aglomeração. O comprimento (L) variou entre 161 – 420 nm e diâmetro (D) entre 7 – 12 nm, resultando em razão de aspecto (L/D) de 23 – 35, respectivamente. Em estudo com casca de milho (H_2SO_4 -65%), Silva et al. (2015) relatou nanopartículas com comprimento entre 168-610 nm e diâmetro 4 - 10 nm. Segundo Silva et al. (2012) e (2019) NPCs de polpa de celulose de eucalipto (mesma fonte deste estudo) mostraram comprimento (L) 145.2 ± 2.5 nm, diâmetro 6.0 ± 1.5 e $L/D = 24$.

3.3 Rendimento das nanopartículas de celulose (NPCs)

Para um total de 35 g de polpa de celulose de eucalipto, obteve-se 9,725 ml de dispersão, correspondendo a 26,387 g de NPCs, resultando num rendimento de aproximadamente 74%, um valor considerado alto, indicando eficiência do processo de hidrólise ácida da polpa de celulose comercial.

A quantidade dos componentes presente na celulose e as condições de reação como tempo, temperatura, tipo e concentração do ácido, pode interferir diretamente nas propriedades e no rendimento das nanopartículas produzidas (Pirich et al, 2020). Silva et al. (2015) relatou rendimento de 39,20% para nanocelulose produzidas a partir de polpa de eucalipto (H_2SO_4 -65%*m/m*) (mesma fonte desse estudo). Katiyar & Dhar, (2020) em estudo com ácido clorídrico (HCl - 3M) para extração de nanopartículas de celulose a partir da casca de pistache, apresentou rendimento de 77%. Em outro estudo com HCl (forma de gás) e palha de linho, foram encontrados rendimentos de 89 - 92%, com tempo de hidrólise (30min - 8h) (LEBOUCHER et al., 2020). Brant et al. (2020) relatou rendimento de 12,2% a 14,5% usando diferentes tipos de celulose extraídas do bagaço de cana, utilizando de ácido sulfúrico (H_2SO_4 -77%, *m/m*), e tempo de reação de 60 min. O alto rendimento

encontrado neste estudo pode ser associado a combinação da fonte de celulose e das condições de reação.

3.4 Teste Tribológico de pino-disco

Na Tabela 1 estão expressos os valores obtidos no teste tribológico de pino-disco, referentes a massa removida e taxa de desgaste.

Condição de teste (8,47N)	Velocidade de rotação (rpm)	Perda de peso (mg)	Taxa de desgaste (mm ³ /N.m)
Teste a seco	500	93,6 ± 12,4	292 ± 0,38
Controle	500	0,43 ± 1,03	265 ± 0,00
FNPC0,50%	500	1,80 ± 5,90	56,9 ± 5,62
FNPC0,75%	500	1,15 ± 2,50	17,1 ± 8,43
FNPC1,0%	500	-5,50 ± 0,96	17,3 ± 3,19
FNPC1,25%	500	0,65 ± 0,21	2,15 ± 0,70
Teste a seco	63	0,53 ± 0,49	6,57 ± 1,85
Controle	63	0,25 ± 0,40	7,88 ± 3,71
FNPC0,50%	63	-0,10 ± 1,40	-2,63 ± 37,2
FNPC0,75%	63	-5,35 ± 0,21	-141,0 ± 5,73
FNPC1,0%	63	-4,20 ± 0,42	-110,0 ± 1,11
FNPC1,25%	63	1,07 ± 0,60	38,10 ± 5,73

Tabela 1 - Valores de massa removida e taxa de desgaste.

3.4.1 Análise de desgaste

O sistema utilizado para os testes tribológicos (pino-disco), tem por característica principal o desgaste abrasivo, o qual pode ocorrer pelo destacamento (remoção) de material em função do movimento relativo sobre a superfície, podendo ser separado como um deslizamento entre dois ou três corpos.

A Figura 3 mostra a taxa de desgaste em função da concentração de NPCs no lubrificante (carga 8,47N; velocidades de rotação de 500 e 63rpm). O aumento da concentração das nanopartículas de celulose (NPCs) ao lubrificante influenciou significativamente na taxa de desgaste (w), reduzindo drasticamente os valores para o sistema com alta velocidade de rotação (500rpm) (Figura 3) (Tabela 1). A taxa de desgaste teve maior redução com FNPC_{1,25%} (2,15), correspondendo a aproximadamente 99%, em relação ao Controle (265). Utilizando óleo SAE40 aditivado com 0,1% de nanopartículas de celulose (CNC), Awang et al. (2019) mostrou redução no desgaste de 69% (200 rpm e carga de 98,1 N).

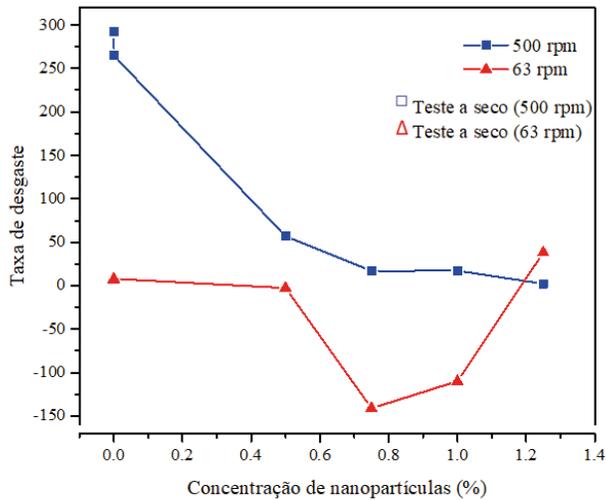


Figura 3: Taxa de desgaste (w) em função da concentração das nanopartículas de celulose (NPCs) no lubrificante, carga 8,47 N, nas velocidades de 500 rpm e 63 rpm.

Para melhor visualização da ação do desgaste abrasivo, ocasionado pelo sistema esfera-disco, utilizou-se imagens de microscópio estereoscópio binocular (magnitude 50x, Figura 4). As imagens mostram a topografia da superfície com marcas a direção do deslizamento, com coloração escura (filme de óxido), a qual diminuiu com aumento da concentração de NPCs no lubrificante. Nos testes utilizando os nanolubrificantes FNPC_{0,50%} (Figura 4-a), FNPC_{0,75%} (Figura 4-b) e FNPC_{1,0%} (Figura 4-c), observa-se marcas em forma de escama, geradas possivelmente pela deformação plástica, ocasionada por resistência ao cisalhamento. No entanto com o nanolubrificante FNPC_{1,25%} (Figura 4-d), observa-se marcas mais suaves e ausência de resíduo do filme de óxido no sulcamento formado no disco, esse resultado está de acordo com o menor valor da taxa de desgaste (Figura 3), indicando boa capacidade anti-desgaste dos nanolubrificantes, especialmente o FNPC_{1,25%}. Além disso, nota-se um polimento da superfície com esse nanolubrificante. Segundo Awang et al. (2019) Nanopartículas de celulose (CNC) em lubrificantes podem reagir quimicamente com as superfícies de contato e formar um filme de limite tribo que se deposita acima das superfícies de fricção podendo reduzir o coeficiente de atrito e a taxa de desgaste.

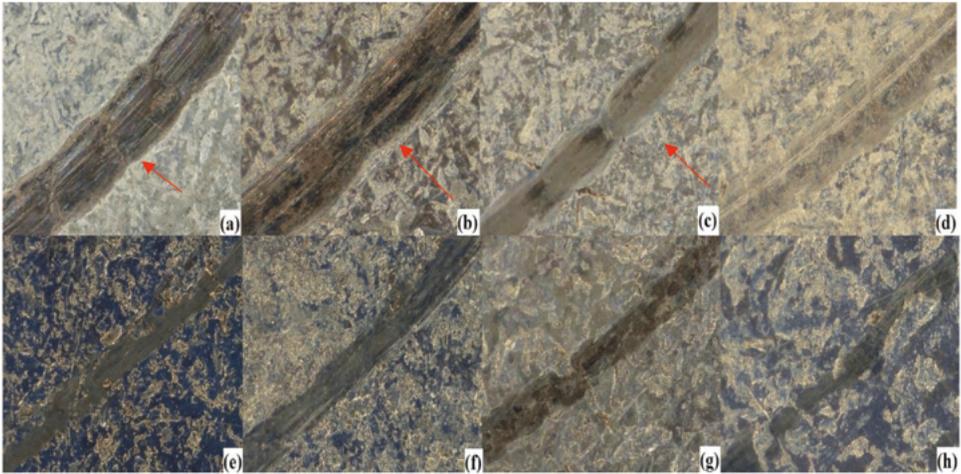


Figura 6: Micrografia dos discos após teste | Carga: 8,47 N (500 rpm) | (a) FNPC_{0,50%}, (b) FNPC_{0,75%}, (c) FNPC_{1,0%}, (d) FNPC_{1,25%} | Carga: 8,47N (63 rpm) | (e) FNPC_{0,50%}, (f) FNPC_{0,75%}, (g) FNPC_{1,0%}, (h) FNPC_{1,25%}.

Para o sistema com menor velocidade de rotação (63 rpm) (Figura 3), a taxa de desgaste apresentou valores negativos nos testes com alguns nanolubrificantes, resultado associado ao chamado desgaste oxidativo, onde há adesão de material removido (aumento da massa do disco), com valores FNPC_{0,50%} (-2,63), FNPC_{0,75%} (-141) e FNPC_{1,0%} (-110) (Tabela1). No entanto para o nanolubrificante FNPC_{1,25%} (38,1) a taxa aumentou significativamente em relação ao Controle (6,57). Os valores negativos obtidos para taxa de desgaste também estão relacionados ao ganho de massa dos discos durante os testes, uma vez que esse parâmetro está diretamente relacionado a remoção de massa, esses resultados estão de acordo com os de massa removida para a mesma condição de teste (Tabela 1). Segundo Zum Gahr (1987) valores negativos de taxa de desgaste podem estar associado a reações químicas entre os metais durante os testes tribológicos, resultando em um desgaste oxidativo causado por adesão e fratura de microasperezas. Dependendo da carga e da velocidade de deslizamento aplicadas, a temperatura na região de contato pode atingir centenas de graus, possibilitando que o material fique depositado na superfície, aumentando a camada de óxido e reduzindo atrito e taxa de desgaste podendo estabiliza-lo para um desgaste brando ou suave (HUTCHINGS, 1992).

Na Figura 4 (e, f, g, h) (8,47N, 63 rpm) observa-se o caminho percorrido pela esfera no disco, mostrando um padrão de desgaste durante os testes com os nanolubrificantes. Visualiza-se, sobre a trincheira, um padrão escuro, indicando a formação de filme de óxido, como também uma mudança na coloração da superfície do disco. Essa mudança na coloração mostra um polimento da superfície, quando em contato com o nanolubrificante, indicando um desgaste erosivo. As imagens indicam que o desgaste reduziu com aumento da concentração NPCs no lubrificante (Figura 4 e, f, g, h).

Awang et al. (2019) ressalta em estudo com tribômetro do forro da saia de pistão, a utilização de óleo SAE40 aditivado com 0,1%(CNC), resultou em uma mancha escura composta por carbono (C), alumínio (Al), silício (S₂O), magnésio (Mg), argônio (Ar), cloro (Cl), e ausência de oxigênio (O), indicando não oxidação do lubrificante e suavização da superfície desgastada. Wang et al. (2020) relatou para nanolubrificantes a base de parafina líquida e nanoserpentina em pó, características marcantes nas superfícies desgastadas denominadas de regiões cinzentas.

Em estudos tribológicos com fluido de corte a base d'água aditivado com líquido iônico (LI), Del Sol et al. (2019) mostrou que adição 1%(LI) (2,94N, 0,6mm/s), reduziu em até 90% a taxa de desgaste, além de causar marcas de desgaste por deformação plástica e abrasão. Zhai et al. (2020) em estudo realizado com nanopartículas de diamante (NPDs), observou que essas nanopartículas atuam como lubrificante sólido rolante entre as interfaces, criando um sistema semelhante ao de desgaste abrasivo de três corpos, onde partículas abrasivas podem funcionar como lubrificantes sólidos, mostrando uma redução no desgaste de 45-75%. Resultados similares aos encontrados nesse estudo.

4 | CONCLUSÃO

As micrografias (TEM) e o alto rendimento indicam que o processo de obtenção das nanopartículas de celulose (NPCs) foi eficiente. A utilização das NPCs como aditivo a lubrificante modificou o desempenho desse fluido, exercendo influencia diferente a depender da concentração e da condição de teste. A taxa de desgaste reduziu drasticamente com o aumento da concentração das NPCs no lubrificante com carga externa de 8,47N (velocidade de rotação - 500 e 63 rpm), com redução mais efetiva (99%) para alta rotação (500rpm). Adição de nanopartículas de celulose no lubrificante mostrou mais eficiente na condição mais severa de teste (carga 8,47 N; 500 rpm) para taxa de desgaste. Nanolubrificantes preparados com nanopartículas de celulose mostraram resultados promissores, indicando ser um campo ainda a ser estudado.

REFERÊNCIAS

AWANG, N. W. et al. **Study on friction and wear of Cellulose Nanocrystal (CNC) nanoparticle as lubricating additive in engine oil.** *Elesier, China*, v. 131, p. 1196-1204, mar. 2019. *International Journal of Heat and Mass Transfer*.

BRANT, A. J. C. et al. **Cellulose Nanoparticles Extracted from Sugarcane Bagasse and Their Use in Biodegradable Recipients for Improving Physical Properties and Water Barrier of the Latter.** *SCIRP, São Paulo*, v. 11, n. 1, p. 81-133, 1 jan. 2019. *Materials Sciences and Applications*

CELESTINO, S. M. C. **Princípios de secagem de alimentos.** 1. ed. Planaltina, Embrapa cerrados-documentos (infoteca-e), 2010.

DEL SOL, I. et al. **Tribological performance of ionic liquids as additives of water-based cutting fluids**. *Elesier, Germany*, v. 426, p. 845-852, 30 apr. 2019. *Wear*.

GU, Huiming et al. **Fabrication and characterization of cellulose nanoparticles from maize stalk pith via ultrasonic-mediated cationic etherification**. *Elesier, Australia*, v. 66, p. 104932, sep. 2020. *Ultrasonics sonochemistry*.

HUO, M. et al. **Understanding the role of water-based nanolubricants in micro flexible rolling of aluminium**. *Elesier, China* v. 151, p. 106378, nov. 2020. *Tribology International*.

Hutchings. I. M. **Tribology: friction and wear of engineering materials**. Edward Arnold, Londres, 1992.

KATIYAR, V.; DHAR, P. **Cellulose Nanocrystals: An Emerging Nanocellulose for Numerous Chemical Processes**. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2020.

KOTIA, Ankit et al. **Thermophysical and tribological properties of nanolubricants: A review**. *Springer, Germany*, v. 54, n. 11, p. 3493-3508, 12 may 2018. *Heat and mass transfer*

LEBOUCHER, J. et al. **High-yield cellulose hydrolysis by HCl vapor: co-crystallization, deuterium accessibility and high-temperature thermal stability**. *Springer, USA*, v. 27, n. 6, p. 3085-3105, 27 jan. 2020. *Cellulose*.

MALDONADO-CORTÉS, D. et al., Demófilo et al. **Synergistic effect on the tribological properties of tool steel through the use of laser surface texturing channels and nanoparticles**, *Elsevier, Canada* v. 426, p. 1354-1361, 30 abr. 2019, *Wear*.

MIRANDA, C. S. **Desenvolvimento de bionanocompósitos poliméricos à partir de nanowhiskers de celulose da fibra de gravatá e lignina em matriz de amido e de blendas de amido/pabt**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica - Universidade Federal da Bahia, 2015.

MIRANDA, C. S. et al. **Starch-based films plasticized with glycerol and lignin from piassava fiber reinforced with nanocrystals from eucalyptus**. *Elesier*, v. 2, n. 1, p. 134-140, jan. 2015. *Materials Today: Proceedings*.

OLIVEIRA, M. G. L. de et al. **Avaliação de nanopartículas de amido como aditivo a lubrificantes**. *Brazilian Applied Science Review, Curitiba, São Paulo*, v. 4, n. 5, p. 3190-3201, out. 2020.

PINHEIRO, J. A. et al. **Polymer-Decorated Cellulose Nanocrystals as Environmentally Friendly Additives for Olefin-Based Drilling Fluids**. *MDPI*, v. 22, n. 1, p. 352, 22 jan. 2021. *International journal of molecular sciences*.

PIRICH, Cleverton L. et al. **Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: A review**. *Springer, USA*, v. 27, n. 10, p. 5457-5475, 2 may 2020. *Cellulose*.

SILVA, J. B. A. da; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. **Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals**. *Wiley*, v. 77, n. 6, p. N14-N19, 12 may 2012. *Journal of Food Science*.

SILVA, J. B. A. et al. **Effect of source and interaction with nanocellulose cassava starch, glycerol and the properties of films bionanocomposites**. *Elesier*, v. 2, n. 1, p. 200-207, jan. 2015. *Materials Today: Proceedings*.

DA SILVA, Jania Betania Alves et al. **PBAT/TPS-nanowhiskers blends preparation and application as food packaging**. Wiley, v. 136, n. 26, p. 47699, 5 mar. 2019. *Journal of Applied Polymer Science*

SILVA, J. B. A. da et al. **Rheological, mechanical, thermal, and morphological properties of blends poly (butylene adipate-co-terephthalate), thermoplastic starch, and cellulose nanoparticles**. Wiley, v. 60, n. 7, p. 1482-1493, 10 apr. 2020. *Polymer Engineering & Science*.

WANG, Yongxia et al. **Friction reduction of water based lubricant with highly dispersed functional MoS₂ nanosheets**. *Elesier, China*, v. 562, p. 321-328, 5 fev. 2019. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

WANG, B. et al. **Nano serpentine powders as lubricant additive: tribological behaviors and self-repairing performance on worn surface**. *MDPI, China* v. 10, n. 5, p. 922, 10 may 2020. *Nanomaterials*.

WIĘCKOWSKI, W.; ADAMUS, J.; DYNER, M. **Sheet metal forming using environmentally benign lubricant**. Springer, Germany v. 20, n. 2, p. 1-12, 30 abr. 2020. *Archives of Civil and Mechanical Engineering*.

ZHAI, W. et al. **Nanodiamond as an effective additive in oil to dramatically reduce friction and wear for fretting steel/copper interfaces**. *Elesier, China* v. 129, p. 75-81, jan. 2019. *Tribology International*.

Zum Gahr, K. H. **Microstructure and wear of materials**. Elsevier, Amsterdam, 1987.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE TEMPORAL DA DISSEMINAÇÃO DE VEGETAÇÃO EXÓTICA EM DUNAS DO LITORAL MÉDIO DO RIO GRANDE DO SUL

Data de aceite: 25/10/2021

Kátia Helena Lipp Nissinen

Divisão de Laboratórios, Fundação Estadual de
Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler –
FEPAM
Porto Alegre – RS

Jonas Marmitt Dias

Divisão de Laboratórios, Fundação Estadual de
Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler –
FEPAM
Porto Alegre – RS

Gustavo Machado Cauduro

Divisão de Laboratórios, Fundação Estadual de
Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler –
FEPAM
Porto Alegre – RS

RESUMO: Com áreas de alta e extremamente alta importância biológica, o Litoral Médio do Rio Grande do Sul é uma região classificada como prioritária para conservação pelo Ministério do Meio Ambiente. Os principais usos do solo na região são o cultivo de arroz, a silvicultura e a pecuária. Em áreas prioritárias à conservação deve-se conhecer e controlar o uso e a cobertura do solo, e as suas mudanças temporais. Nesse sentido, o sensoriamento remoto pode ser bastante útil. No presente trabalho, buscou-se analisar a cobertura do solo e suas mudanças em áreas de preservação permanente do município de Palmares do Sul. Duas imagens de satélites, Landsat 5 TM de 1984 e Landsat 8

OLI de 2015, foram empregadas para calcular os índices NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*), que possibilitam classificar e monitorar os tipos de vegetação ao longo do tempo, através de suas diferenças espectrais. As diferenças de valores de NDVI obtidos entre as duas imagens foram analisadas para se comparar a dinâmica temporal dos corpos vegetais na área de estudo. Os valores de NDVI altos obtidos indicaram que em 31 anos houve um aumento de vegetação arbórea exótica, fisicamente diferente da vegetação herbácea ou arbustiva, nativa das dunas, representada por baixos NDVI. Manejo para erradicação e o monitoramento são recomendados para o controle das plantas invasoras nesse ecossistema.

PALAVRAS - CHAVE: Plantas invasoras, NDVI, Pinus, áreas de preservação ambiental, sensoriamento remoto.

TEMPORAL ANALYSIS OF THE DISSEMINATION OF EXOTIC VEGETATION IN DUNES ON THE MIDDLE COAST OF RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT: The areas of high and extremely high biological importance in the Middle Coast of Rio Grande do Sul have led the region to be classified as a priority for conservation by the Ministry of the Environment. Major land uses in the region are rice cultivation, forestry and livestock. In priority areas for conservation, land use and cover and its temporal changes should be well known and controlled. Towards that, remote sensing could be a very useful tool. In the present work, we sought to analyze the land cover and its changes in permanent preservation

areas in the municipality of Palmares do Sul. Satellite images, Landsat 5 TM from 1984 and Landsat 8 OLI from 2015, were used to calculate the NDVI indices (Normalized Difference Vegetation Index), which make it possible to classify and monitor vegetation types over time, through their spectral differences. The differences in NDVI values obtained between the two images were analyzed to compare the temporal dynamics of plant bodies in the study area. The high NDVI values obtained indicated that in 31 years there was a notable increase in the exotic arboreal vegetation, physically different from the herbaceous or shrub vegetation native to the dunes and represented by low NDVI. Eradication management and monitoring are recommended to control invasive plants in this ecosystem.

KEYWORDS: Invasive plants, NDVI, permanent preservation areas, *Pinus*, remote sensing.

INTRODUÇÃO

O Litoral Médio do estado do Rio Grande do Sul (RS) é uma região considerada prioritária para a conservação pelo Ministério do Meio Ambiente, na qual localizam-se áreas classificadas como de Alta a Extremamente Alta Importância Biológica (MMA, 2018). Nessa região e ao longo de todo o litoral do Estado, a Planície Costeira apresenta um colar de lagoas e áreas úmidas, restingas e dunas formadas por um sistema de barreira-laguna, originado no Quaternário, com rica biodiversidade (Schäffer, 2013). Conforme esses autores, as dunas, além de sua função geomorfológica, são habitat para flora e fauna ricas em espécies nativas, abrigando também espécies de aves marinhas e migratórias. Por sua singular complexidade, a preservação desses ecossistemas é, portanto, importante.

Com o fomento do cultivo de árvores de corte iniciado na década de 1970 no RS (Schäffer, 2013), gerou-se um novo panorama ambiental no Estado, com a inserção de espécies exóticas que passaram a caracterizar a silvicultura na região do Litoral Médio. Dentre os usos do solo na região destacam-se o cultivo de arroz por inundação, a silvicultura de *Pinus* e *Eucalyptus* e a pecuária. Especialmente em áreas prioritárias à conservação, como no Litoral Médio, é importante se conhecer e controlar o uso e a cobertura do solo, bem como as suas mudanças ao longo do tempo. É sabido que as invasões por plantas exóticas são uma das causas-chave da perda de biodiversidade que têm motivado muitos programas de restauração ecológica no mundo (Heleno, *et al.*, 2010). Técnicas de sensoriamento remoto apresentam-se como úteis ferramentas para diagnosticar e representar espacialmente tais usos, coberturas e mudanças na paisagem. Por exemplo, utilizando técnicas de NDVI (do inglês, *Normalized Difference Vegetation Index*) - Índice da Diferença Normalizada de Vegetação, desenvolvido a partir da década de 1970 para classificar e monitorar a vegetação e que tem sido empregado em todo o mundo. Com o NDVI é possível se avaliar as diferentes condições da cobertura vegetal, determinar e estimar o índice de área foliar, a biomassa e a radiação fotossinteticamente ativa (Souza *et al.*, 2019).

Segundo Moreira (2001), a assinatura espectral de uma vegetação verde e sadia mostra um evidente contraste entre a região do visível, especificamente no vermelho e

infravermelho próximo. Baseados nesses princípios Shimabukuro *et al.* (1999) classificam os índices de vegetação que combinam a informação espectral naquelas duas bandas do espectro eletromagnético.

De acordo com Alvares *et al.* (2013), as plantações de *Pinus* e *Eucalyptus* no sul do Brasil apresentam um padrão sazonal de respostas aos índices NDVI tendo valores máximos entre os meses de março e abril, e valores mínimos entre os meses de setembro e outubro. Estas variações ocorrem principalmente devido ao regime hídrico, no entanto outras variáveis como a queda de folhas das árvores no outono devem ser consideradas. Este fato é essencial na interpretação dos resultados e deve ser levado em conta na seleção das imagens de satélite que serão utilizadas no trabalho. Le Maire *et al.* (2011) demonstraram que é possível determinar com devida precisão a altura dominante das árvores e o volume de madeira do plantio de *Eucalyptus* a partir do monitoramento destes plantios desde o início. Comparando os trabalhos de Suwannachakul (2007) e Alvares *et al.* (2013), percebe-se que em alguns estágios do crescimento, as culturas de arroz, *Eucalyptus* e *Pinus* podem ser confundidas no índice NDVI.

O índice quantifica a refletância dos corpos vegetais e seu comportamento espectral em relação ao solo, podendo-se, através da análise, verificar as diferenças adequadas e identificar os tipos de vegetação ocorrentes. O adequado cultivo e o manejo das espécies exóticas são pontos relevantes na preservação do ecossistema e da paisagem local, uma vez que dunas, lagoas e áreas úmidas são consideradas áreas de preservação permanente (APP) na legislação brasileira, conforme o Código Florestal (Leis Federais N°12.651/2012 e N°12.727/2012).

O objetivo deste estudo foi analisar a presença, o possível aumento e a disseminação de árvores exóticas para o ambiente natural, a partir dos cultivos de silvicultura, em uma região costeira do município de Palmares do Sul. Para tanto, imagens de satélites em diferentes anos foram empregadas para calcular os índices NDVI. Comparações dos valores obtidos na área de estudo foram realizadas com o intuito de avaliar o comportamento espectral da vegetação exótica disseminada na área de estudo, como indicado pela Figura 1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

Situado no Litoral Médio do Rio Grande do Sul (30°15'28"S, 50°30'35"W), o município de Palmares do Sul faz divisa com os municípios de Balneário Pinhal, Mostardas e Capivari do Sul, é banhado a leste pelo Oceano Atlântico e a oeste pela Laguna dos Patos. Localiza-se a 86 km de distância de Porto Alegre. Estende-se por planícies a nove metros acima do nível do mar. O clima da região é subtropical úmido, com verões quentes e secos e invernos

úmidos e rigorosos, com temperaturas médias de 25°C no verão e de 14°C no inverno.

Nesta região, delimitou-se para o estudo a Área 1, correspondente à porção de dunas delimitadas na Figura 1. As dunas fixas são consideradas APP que têm as restingas como mecanismos fixadores (PINHEIRO, *et al.*, 2013).

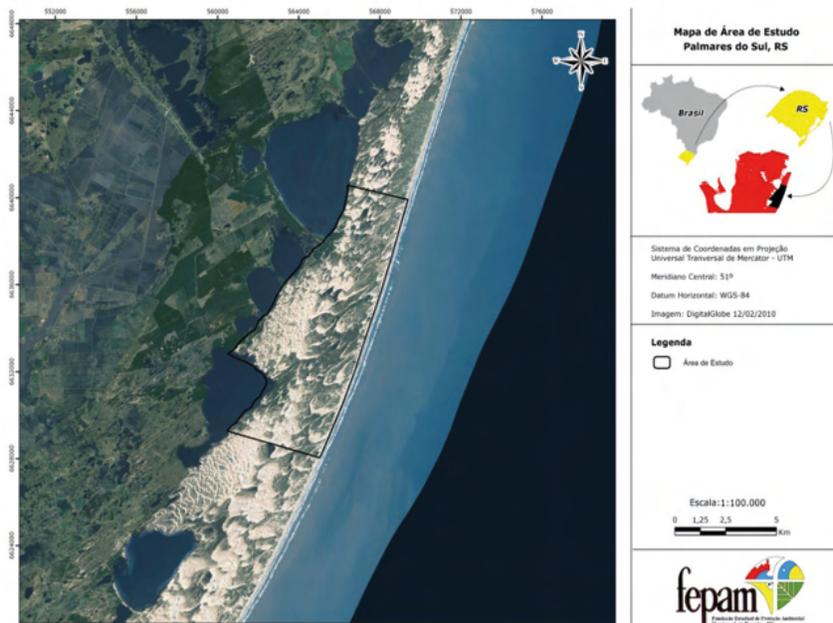


Figura 1, Imagem do satélite LANDSAT-5 focada na área delimitada de estudo, situada no município de Palmares do Sul-RS.

GEOPROCESSAMENTO

A fim de compreender as mudanças na vegetação na área de estudo, foram utilizadas imagens históricas dos satélites LANDSAT 5 TM e LANDSAT 8 TM, fornecidas gratuitamente pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), mediante cadastro no catálogo de imagens no *website* www.inpe.br. Uma imagem mais antiga, datada de 03/05/1984, do satélite LANDSAT 5 e uma imagem mais recente, datada de 08/08/2015, do LANDSAT 8 foram selecionadas. A inexistência, ou baixa presença, de nuvens na área de estudo foi usada como critério para seleção das imagens.

Utilizando os *softwares* ENVI 5.2 e ArcGis 10.3, foram aplicadas técnicas de NDVI, a fim de se compreender a evolução da vegetação na área de estudo, tais técnicas serão descritas a seguir.

As bandas do vermelho e do infravermelho próximo compostas geram um NDVI. O NDVI é baseado na observação de que diferentes tipos de superfícies refletem a luz de

determinada forma, particularmente, vegetação com muita atividade fotossintética absorve a maioria da luz vermelha que a atinge, enquanto reflete a maioria do infravermelho próximo. Por outro lado, se a vegetação está morta ou estressada ela reflete mais a luz vermelha e menos infravermelho próximo. Da mesma forma, superfícies não vegetadas têm muito mais refletância em todo espectro de luz. Assim, conforme Portz *et al.* (2011), o NDVI permite monitorar, em grande escala, o “vigor” da vegetação, ou detectar formas mais densas de vegetação, porque quanto mais exuberante for a vegetação menor será a porcentagem de radiação do vermelho refletida por esta. Por outro lado, quanto maior o vigor da vegetação, maior a porcentagem de radiação do infravermelho refletida.

O NDVI é calculado pixel a pixel a partir da seguinte fórmula: $NDVI = \frac{(NIR - RED)}{(NIR + RED)}$, onde NIR representa os valores dos pixels da banda do infravermelho próximo e RED os valores dos pixels da banda do vermelho.

No entanto, o NDVI não é o melhor método para avaliação e monitoramento de pastagens, mas como a área de estudo consiste em sua maioria de agricultura esse fato será pouco significativo nos resultados.

Muitos fatores afetam os valores de NDVI, como atividade fotossintética das plantas, a cobertura total das plantas, a biomassa, a mistura de planta com o solo e o stress nas plantas. Por isso, o NDVI é correlacionado com muitos atributos do ecossistema que são de interesse dos pesquisadores, por exemplo, a cobertura de solo exposto. Também por ser uma razão entre duas bandas, o NDVI ajuda a compensar diferenças, tanto na iluminação em imagem por conta da declividade e do ponto de vista, quanto nas diferenças entre as imagens devido a fatores como a hora do dia ou estação do ano em que as imagens foram adquiridas. Assim sendo, o NDVI possibilita a comparação de imagens através do tempo para a procura de significativas mudanças ecológicas e de uso e ocupação do solo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diferença entre o resultado do NDVI nas imagens de 1984 (Figura 2) e 2015 (Figura 3) mostra o quanto a agricultura e a silvicultura se desenvolveram no Município neste espaço temporal de 30 anos, além de indicar locais onde árvores exóticas estão se disseminando.

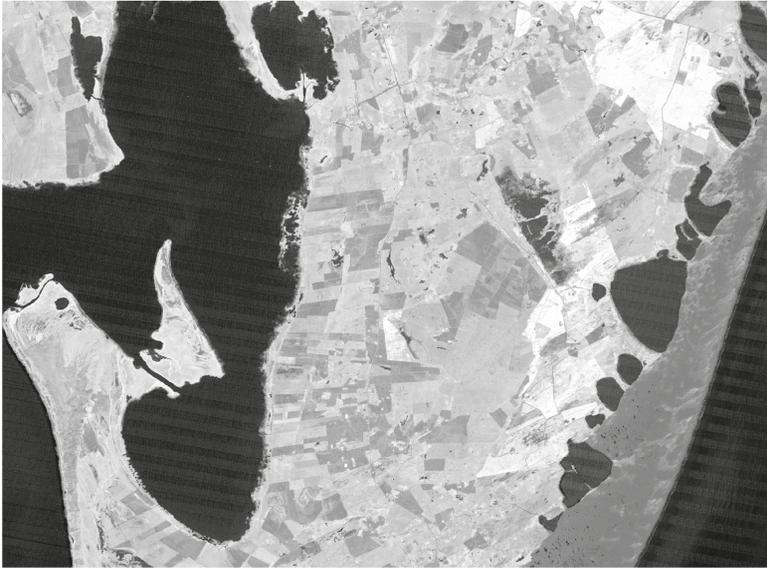


Figura 2 - NDVI do município de Palmares do Sul-RS, 1984.



Figura 3 - NDVI do município Palmares do Sul-RS, 2015.

Na Figura 4, de forma geral, a maioria das áreas verde-claras, isto é, com valores entre $-0,1$ e $-0,3$, representam áreas que foram destinadas a pastagem ou vegetação campestre nativa e que foram transformadas em áreas destinadas à agricultura de arroz, com exceção da região nordeste da imagem na qual as cores verdes são frutos da diferença de biomassa da silvicultura devido à fase de crescimento dos talhões. As áreas de cores amarela e laranja claro, com valores entre $-0,099$ e $0,1$, representam locais em que houve

pouca ou nenhuma mudança no uso do solo, já as áreas com valores entre 0,101 e 0,6 representam locais onde se estabeleceu silvicultura.

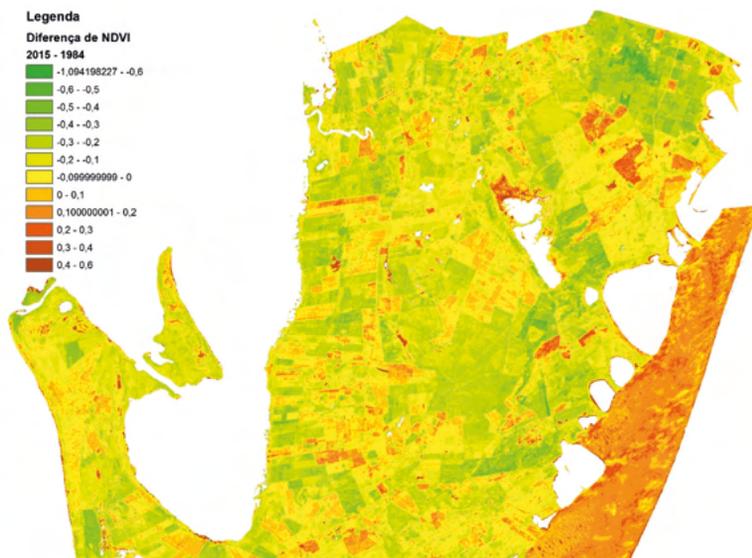


Figura 4. Diferença entre os NDVIs de 2015 e 1984 no município de Palmares do Sul-RS.

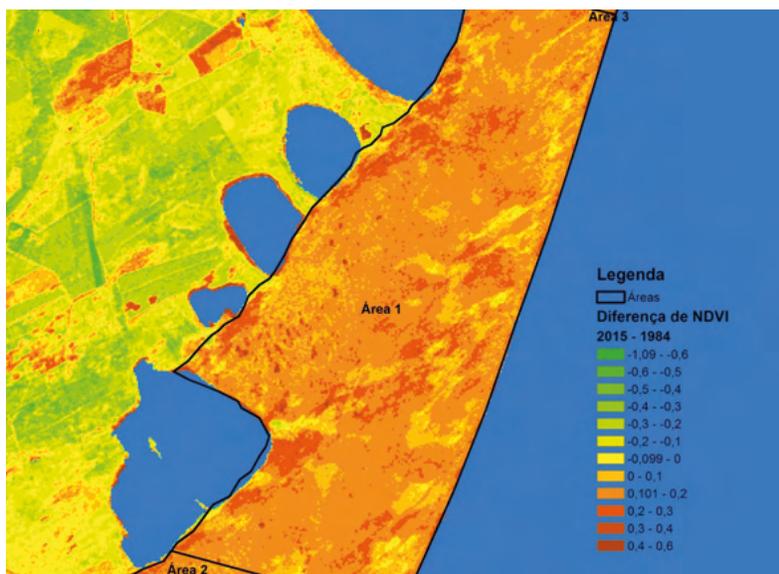


Figura 5. NDVI comparativo na área de estudo no litoral de Palmares do Sul-RS Imagem focada na Área 1 indicando a diferença de NDVI entre 1984 e 2015.

A Figura 5 apresenta uma imagem em melhor resolução, na qual é possível identificar os corpos vegetais com maior densidade, representados em tons de vermelho, representando o pico do NDVI conforme a intensidade do vermelho aumenta, variando de 0,2 até 0,6, o pico do índice. Esse tipo de vegetação arbórea densa não faz parte da formação vegetal natural deste ambiente. Apresenta-se na área, provavelmente, devido à disseminação espontânea de espécies exóticas, principalmente arbóreas, normalmente cultivadas no Município do estudo e regiões vizinhas. A análise desses índices permite inferir, por similaridade de densidades, que esse tipo de vegetação é decorrente da silvicultura local que vem crescendo e, com o vento, tem disseminado espontaneamente suas sementes às dunas e a outros locais de APP, conforme se pode observar pela imagem de satélite e na vegetação densa que aparece ao fundo na Figura 6. Os valores altos na diferença de NDVI entre os anos de 1984 e 2015 indicam a importância de programas de manejo para a conservação desses ecossistemas, visto que os índices são, muito provavelmente, resultantes da disseminação involuntária e sem controle a partir dos plantios de silvicultura locais. Especialmente, de espécies de *Pinus*, cuja invasividade pode causar mudanças drásticas no ecossistema local (Durigan *et al.*, 2020).

Similarmente, utilizando o NDVI, Signori (2018) obteve resultados que confirmaram a capacidade invasora do *Pinus* spp. e a sua crescente ocupação de áreas na região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, unidade de conservação também localizada na região costeira do Litoral Médio do RS. O autor verificou que o vento é o principal fator de dispersão de sementes formadoras das manchas de *Pinus* spp. nos campos de dunas. Essas manchas seguem aumentando, alimentadas por sementes de árvores adultas já instaladas.



Figura 6. Vegetação arbórea densa, indicada pela seta, sobre dunas costeiras, município de Palmares do Sul, RS.

Silva *et al.* (2020), usando técnicas de geoprocessamento com NDVI em uma série histórica de 19 anos, verificaram que o aumento da cobertura vegetal na ilha de Fernando de Noronha fora devido a um significativo acréscimo de plantas invasoras e ruderais, com impacto sobre a biodiversidade local. Para esses autores, o NDVI auxilia, com eficiência, a identificação de tais mudanças e a tomada de decisões para o manejo das invasoras, visando à conservação e à preservação do ambiente.

CONCLUSÕES

A metodologia utilizada mostrou-se plenamente satisfatória na identificação de alterações na cobertura vegetal em um período de três décadas no município litorâneo de Palmares do Sul. Os resultados detectados através do sensoriamento remoto em laboratório foram confirmados na verificação em vistoria de campo.

Baseando-se na análise dos resultados de NDVI, foi possível constatar, mapear e quantificar o aumento significativo na disseminação e estabelecimento de vegetação mais densa e invasora sobre dunas.

Esse aumento resulta da proliferação de sementes das árvores de corte cultivadas no Município, especialmente as do gênero *Pinus*, que têm por natureza um perfil de colonização invasivo. Assim, cabe alertar para a necessidade de ações de manejo e monitoramento para a erradicação e o controle de tais espécies invasoras exóticas, visando à proteção das dunas e demais áreas de preservação permanentes na região litorânea.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC da FEPAM, a J. M. Dias e G. M. Cauduro, enquanto estudantes do Curso de Geologia da UNISINOS. Agradecimentos ao colega da FEPAM, MSc Alexandre de Paula Alves, por auxílio técnico com o uso do aplicativo ArcGIS® Desktop 10.0.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES, C. A *et al.* **Caracterização da dinâmica dos índices de vegetação NDVI e EVI em plantações de *Pinus* do Brasil.** INPE. 2013, pp 2866-2973.

BRASIL. **Lei Federal Nº 12.651, de 25 de maio de 2012.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm>. Acesso em: 14 mai 2021.

BRASIL. **Lei Federal Nº 12.727, de 17 de outubro de 2012.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12727.htm>. Acesso em: 14 mai 2021.

DURIGAN, G.; ABREU, R. C. R. de; PILON, N. A. L.; IVANAUSKAS, N.; VIRILO, C. B, PIVELLO, V. R. **Invasão por *Pinus spp*: ecologia, prevenção, controle e restauração**. São Paulo: Instituto Florestal, 2020. 63p.: il. color ; Disponível em: <<http://www.iflorestal.sp.gov.br>> ISBN: 978-65-86549-00-3.

HELENO, R.; LACERDA, I.; RAMOS, J. A.; MEMMOTT, J. Evaluation of restoration effectiveness: community response to the removal of alien plants. **Ecological Applications**, v.20, n.5, p.1191-1203, doi.org/10.1890/09-1384.1, 2010.

LE MAIRE, G. *et al.* MODIS NDVI time-series allow the monitoring of Eucalyptus plantation biomass. **Remote Sensing of Environment**, 2011, pp.1741-1754.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade Brasileira – 2ª Atualização**, 2018. Disponível em:<<http://areasprioritarias.mma.gov.br/2-atualizacao-das-areas-prioritarias>>. Acesso em: 14 mai 2021.

MOREIRA, M. A. **Fundamentos do sensoriamento remoto e metodologia de aplicação**, 2 ed. Viçosa-MG, UFV, 2013, 307p.

PINHEIRO, *et. al.* Dunas móveis: Áreas de Preservação Permanente? **Sociedade & Natureza**, ISSN: 1982-4513 25, Uberlândia. 2013, (3): 595-607.

PORTZ, L; GUASSELLI, L. A.; CORRÊA, I. C. S. Variação Espacial e Temporal de NDVI na Lagoa do Peixe, RS. **Revista Brasileira de Geografia Física**, 05, 2011, 897-908.

SCHÄFFER, A, *et. al.* **Atlas socioambiental dos municípios de Cidreira, Balneário Pinhal e Palmares do Sul**. Caxias do Sul, EDUCS, 2013, 354p.

SHIMAMBUKURO, Y.E; BATISTA, G.T.; MELLO, E.M.K.; MOREIRA, J.C E DUARTE, V. Using shade fraction image segmentation to evaluate deforestation in landsat thematic mapper images in the Amazon region. **IJRS**, 1999, pp. 535-54.

SIGNORI, L. M. **Mapeamento por sensoriamento remoto de área de *Pinus spp* no Parque Nacional da Lagoa do Peixe**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pósgraduação em Sensoriamento Remoto. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2018.

SILVA, K. A.; EL-DEIR, S. G.; MONTEIRO JÚNIOR, J. J.; SANTOS, J. P. O.; SILVA, E. A. Analysis of vegetation dynamics using the normalized difference vegetation index (NDVI) at the archipelago of Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil. **Interações**, Campo Grande, MS, v. 21, n. 4, p. 885-901, out./dez. 2020.

SOUZA, D. F.; Gonzalez, G. D. D.; TEIXEIRA FILHO, J.; Variação temporal do índice de vegetação normalizada como ferramenta de identificação dos açudes na Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Cabras. **Revista Cerrados** (Unimontes), v. 17, n. 1, pp. 222-239, 2019.

SUWANNACHATKUL, S. *et al.* **Rice Cultivation and Harvest Date Estimation Using MODIS NDVI Time-series Data**. Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand. pp 2613-2625, s/d.

CAPÍTULO 4

CITOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EXPOSTAS À NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS FUNCIONALIZADOS

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 06/08/2021

Eduarda Rocha de Oliveira

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora
Juiz de Fora - Minas Gerais

Rafaella de Souza Salomão Zanette

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora
Juiz de Fora - Minas Gerais

Leonara Fayer

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora
Juiz de Fora - Minas Gerais

Elyabe Monteiro de Matos

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora
Juiz de Fora - Minas Gerais

Luiz Orlando Ladeira

Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – Minas Gerais

Humberto de Mello Brandão

Laboratório de Nanotecnologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)
Juiz de Fora – Minas Gerais

Michele Munk

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora
Juiz de Fora - Minas Gerais

RESUMO: O nanotubo de carbono multicamadas carboxilado (MWCNT-COOH) possui condução térmica e elétrica, resistência mecânica, capilaridade, grande superfície de contato, peso ultraleve, flexibilidade e atividade antimicrobiana. Sendo assim, é um nanomaterial (NM) com propriedades relevantes para possíveis aplicações biomédicas como a síntese de *scaffolds* para uso na bioengenharia tecidual e medicina regenerativa. Contudo, devido à alta reatividade proveniente da nanoescala e a possibilidade de toxicidade, existe a necessidade de avaliar os efeitos destes NMs quando em contato com sistemas biológicos. Portanto, neste trabalho, o propósito foi avaliar a citocompatibilidade *in vitro* de MWCNT-COOH em células-tronco mesenquimais de polpa dentária humana (CTMs). As células-tronco foram expostas às concentrações 0; 0,1; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOH por 48h. Posteriormente foram avaliados a viabilidade celular por Citometria de Fluxo utilizando a marcação com iodeto de propídeo e, o estresse oxidativo, por teste da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os resultados foram avaliados por ANOVA, post hoc Tukey, e $p < 0,05$. O ensaio de Citometria de Fluxo mostrou que o MWCNT-COOH não alterou a viabilidade celular ($P > 0,05$), assim como os resultados do ensaio da enzima SOD não indicaram estresse oxidativo ($P > 0,05$) em nenhum dos tratamentos testados quando comparado ao controle. Assim, nas atuais condições experimentais, a exposição *in vitro* de MWCNT-COOHs não altera a viabilidade celular ou gera estresse oxidativo em CTMs.

PALAVRAS - CHAVE: Citotoxicidade; Nanosseguurança; Nanotecnologia; Nanotoxicidade.

IN VITRO CYTOCOMPATIBILITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS EXPOSED TO FUNCTIONALIZED MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

ABSTRACT: Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotube (MWCNT-COOH) presents thermal and electrical conductivity, mechanical strength, capillarity, high surface area, light weight, flexibility, and antimicrobial activity. Therefore, it is a nanomaterial (NM) with appealing properties for possible applications in biomedicine, such as the synthesis of scaffolds for tissue bioengineering and regenerative medicine. However, nanoscale confers high reactivity to NMs, and it may cause toxicity. Consequently, it is important to evaluate the effect of these NMs when in contact with biological systems. This work evaluated the in vitro cytocompatibility of the MWCNT-COOH on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). The cells were exposed to MWCNT-COOH at 0, 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ for a period of 48h. Subsequently, cell viability was tested by Flow Cytometry using propidium iodide to stain cells, and oxidative stress was evaluated by testing the enzyme superoxide dismutase (SOD) activity. ANOVA and post hoc Tukey were used to statistically analyze data, and $p < 0.05$. The Flow Cytometry assay showed that MWCNT-COOHs did not alter cell viability ($P > 0.05$), as well as the results of the SOD enzyme assay, did not indicate oxidative stress ($P > 0.05$) in any of the treatments tested compared to the control. Therefore, according to the conditions tested, in vitro exposure to MWCNT-COOH does not alter cell viability or generate oxidative stress in SHED.

KEYWORDS: Cytotoxicity; Nanosecurity; Nanotechnology; Nanotoxicity.

1 | INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma área que estuda os materiais na nanoescala e seus potenciais de aplicação. Os nanomateriais (NMs) precisam apresentar no mínimo uma de suas dimensões variando entre 1 e 100 nm para ser classificado como tal. São essas dimensões nanométricas que conferem propriedades diferentes das que estes materiais teriam em escalas maiores (MIERNICKI et al., 2019). Neste cenário, temos os nanotubos de carbono (NTC) entre os materiais nanométricos mais utilizados mundialmente. Estes são folhas de grafeno enroladas de forma cilíndrica e podem ser de parede simples (Nanotubo de Carbono de Parede Simples – SWCNT) ou multicamadas (Nanotubo de Carbono Multicamada – MWCNT). No caso das multicamadas, as folhas de grafeno estão enroladas concêntricamente. Devido à sua forma e dimensões, os NTCs apresentam propriedades de interesse biotecnológico: condução térmica e elétrica, resistência mecânica, capilaridade, grande superfície de contato, peso ultraleve, flexibilidade e atividade antimicrobiana. Estas características possibilitam aplicações em diversas áreas, incluindo na bioengenharia tecidual e medicina regenerativa (QIAN et al., 2019).

Embora os NTCs sejam uma grande promessa para várias aplicações da biomedicina, a nanoescala confere uma maior reatividade aos NMs por apresentarem

uma área de superfície aumentada em relação ao volume. Assim, quando em contato com sistemas biológicos, os NTCs podem desencadear toxicidade (SUKHANOVA et al., 2018). Então, a nanotoxicidade é um fator crítico que pode limitar o uso da nanotecnologia e preocupa em casos de exposição humana e animal. Logo, a investigação da toxicologia relacionada à nanotecnologia é essencial para aplicações seguras destas tecnologias e reforça a necessidade de avaliar os possíveis impactos desses NMs, especialmente em células humanas.

Recentemente, pesquisadores têm examinado os efeitos de diferentes NTCs em células humanas e demonstrado sinais de toxicidade dependendo da característica desse NM, concentração e tipo celular (MOONEY et al. 2008; URSINI et al., 2012; LONG et al. 2017; ZHAO et al., 2019; KYRIAKIDOU et al., 2020; SANO et al., 2020; DI IANNI et al., 2021; REAMON-BUETTNER et al., 2021). Contudo, ainda não há relatos dos possíveis efeitos de MWCNTs funcionalizados com grupos carboxílicos em células-tronco de polpa dentária humana (CTMs). Portanto, o propósito deste trabalho foi avaliar a viabilidade celular e o estresse oxidativo de CTMs expostas *in vitro* a diferentes concentrações de MWCNT-COOH.

2 | METODOLOGIA

2.1 Cultivo celular e coincubação com mwcnt-cooh

As CTMs são provenientes do Biobanco de Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC) da Universidade Federal de Juiz de Fora. O procedimento foi autorizado pela Comissão Nacional de Pesquisa Ética (protocolo de identificação 022/2015) e as CTMs foram previamente caracterizadas (FERREIRA et al., 2019; ZANETTE, 2016). As células foram postas para crescimento em meio DMEM-F12 acrescido de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) e soro fetal bovino (10% v/v). Em seguida, as células foram incubadas em uma incubadora Thermo Scientific Forma Series 3 Water Jacketed CO₂ (Thermo Scientific, EUA), em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi substituído por um fresco a cada 3 dias. A subcultura ocorreu quando cerca de 80% de confluência foi alcançada, destacando as células por tripsinização. Para os ensaios citotóxicos, as células foram expostas a 0 (controle), 0,1, 1, 10, 50, 100 µg/mL de MWCNT-COOH dispersos (imediatamente antes da exposição) em DMEM-F12 suplementado e incubadas novamente por 48 h. Antes da exposição das células, o NM foi disperso com um sonicador UP200S (Hielscher, Alemanha) ajustado em amplitude 75 e ciclo de 0,5, por aproximadamente 1 min. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e repetidos duas vezes.

2.2 Análise de Viabilidade Celular

Para descobrir se os MWCNT-COOHs estavam levando as CTMs à morte, executamos uma análise de viabilidade celular por citometria de fluxo. Para isso, CTMs (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em uma placa de 6 poços e expostas ao MWCNT-COOH por 48 h. Após a exposição, o meio de crescimento foi removido e as células foram lavadas com 1X PBS 3 vezes e tripsinizadas. As células foram coletadas por centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1x PBS e coradas com iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As suspensões celulares foram lidas em citômetro CytoFLEX S (Beckman Coulter, EUA).

2.3 Análise de Estresse Oxidativo

Como os NMs podem aumentar a síntese de espécies reativas de oxigênio nas células, realizamos o ensaio da enzima superóxido dismutase (SOD) para entender se o MWCNT-COOH estava desencadeando estresse oxidativo nas CTMs. O kit de ensaio SOD foi usado de acordo com as instruções do fabricante para análise de SOD intracelular (Sigma-Aldrich, EUA). De forma breve, as células (5×10^3 células/poço) foram semeadas em uma placa de 96 poços e expostas a MWCNT-COOHs por 48 h. O meio de crescimento foi removido, as células foram lavadas três vezes usando 1x PBS para remoção de NM e tripsinizadas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 2.000 g x 10 min a 4°C. Depois elas foram lavadas duas vezes com 1 ml de 1x PBS e centrifugadas nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram lisadas pelo método de congelamento e descongelamento. Os peletes foram ressuspensos em 100 μl 1x PBS. Posteriormente, 20 μl da suspensão foram usados para prosseguir com o ensaio de acordo com as instruções do kit. A alteração colorimétrica foi detectada usando o espectrofotômetro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific, EUA) a 450 nm de absorvância.

2.4 Análises Estatísticas

Os dados de viabilidade celular e estresse oxidativo foram submetidos a análise de variância (ANOVA), a comparação das médias foi feita por teste Tukey, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morte celular pode estar presente como consequência da nanotoxicidade. Sendo assim, nós realizamos análise de viabilidade celular por citometria de fluxo marcando as células com iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo tem a capacidade de entrar nas células atravessando a membrana e marcar o DNA, por ser um intercalante. Por sua vez, as células que se encontram viáveis têm a capacidade de expelir este marcador (WAVER,

1998). Nas figuras 1 e 2, mostramos os resultados da citometria de fluxo e observamos que nenhum dos tratamentos (0,1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) de MWCNT-COOH diminuíram a viabilidade celular ($p>0,05$) quando comparados ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ levou fibroblastos de camundongo (VUKOVIC et al., 2009) e hepatócitos fetais humanos (LIU et al., 2013) a morte por apoptose celular.

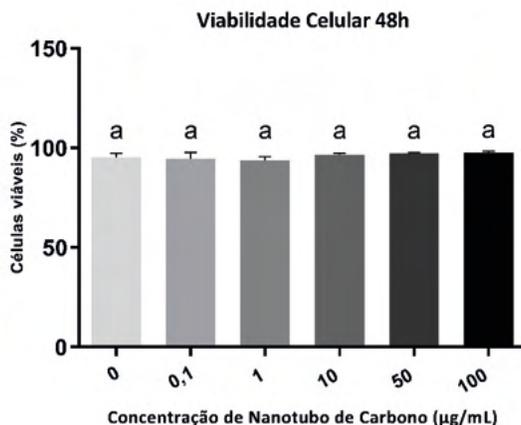


Figura 1. Análise estatística da viabilidade celular por citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio para células-tronco mesenquimais após 48 h de incubação com MWCNT-COOHs a 0, 0,1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.

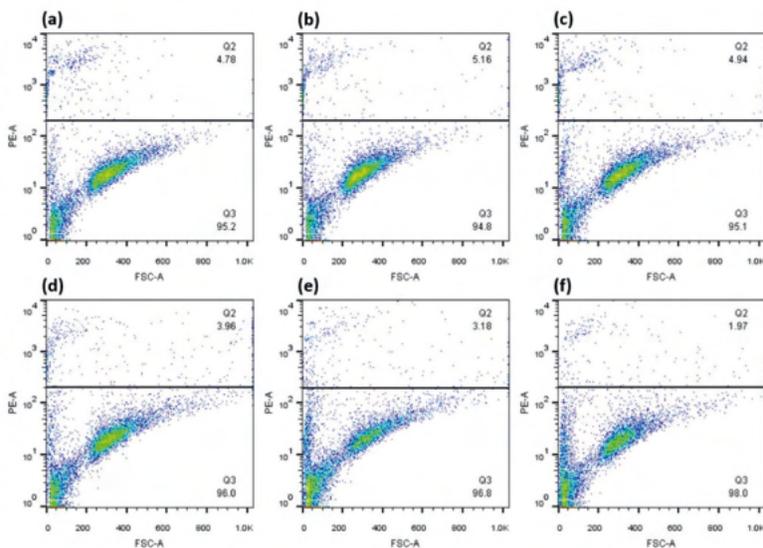


Figura 2. Gráficos PE-A x FSC-A de citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídeo das células tronco mesenquimais expostas a a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 0,1 $\mu\text{g/mL}$, c) 1 $\mu\text{g/mL}$, d) 10 $\mu\text{g/mL}$, e) 50 $\mu\text{g/mL}$, f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT-COOHs por 48 h.

Alterações indesejadas no metabolismo celular costumam ocorrer mesmo quando há a conservação da viabilidade das células. Então, apesar de não levar as CTMs à morte celular, investigamos se poderia estar ocorrendo síntese de espécies reativas de oxigênio nestas células. A produção destes radicais livres é um dos mecanismos de toxicidade dos NMs (WANG et al., 2014) e causa peroxidação lipídica da membrana celular devido a interação eletrostática dos NMs com as células (HOU t al., 2018). Na figura 3, mostramos a atividade da enzima SOD nas CTMs expostas ao MWCNT-COOH e observamos que não houve variação ($p>0,05$) na atividade da enzima nos diferentes tratamentos (0,1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de MWCNT-COOHs em comparação ao grupo controle (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esses dados sugerem que o MWCNT-COOH não altera o estado redox das CTMs cultivadas *in vitro* nas concentrações testadas. Demir & Marcos (2018) também reportaram ausência de alteração na porcentagem de EROs intracelular. Além disso, não observaram mudanças na expressão gênica de marcadores relacionados ao estresse oxidativo em células de linfoma de camundongo expostas a concentrações de até 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNT-COOH por 24h. Por outro lado, Liu et al. (2012), relataram diminuição nos níveis da enzima SOD em fibroblastos de pulmão embrionário humano expostos a concentrações de MWCNT-COOH que variaram de 5 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 24h. Estas observações indicam que as respostas aos NMs, relacionadas à atividade da enzima SOD, variam com o tipo celular e as condições testadas.

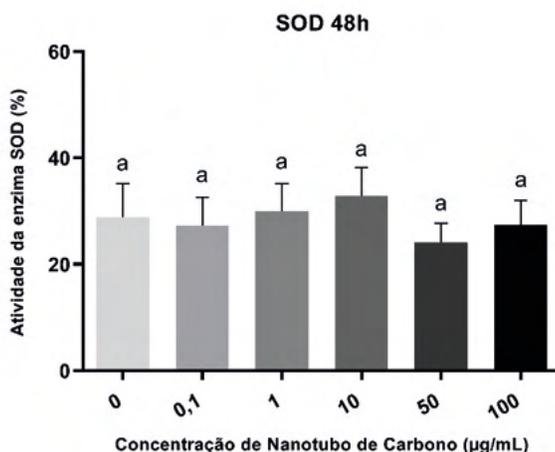


Figura 3. Análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) para células-tronco mesenquimais incubadas por 48h com 0, 0,1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNT-COOH. Médias que não diferem entre si estão representadas pelas mesmas letras.

Assim, concluímos que, de acordo com as condições dos atuais experimentos, o MWCNT-COOH não altera a viabilidade celular nem ocasiona estresse oxidativo

(considerando a via da SOD) nas células tronco mesenquimais da polpa dentária humana.

FINANCIAMENTO

FAPEMIG (TEC-RED-00282-16, APQ-02342-17), CNPq (433461 / 20187), Rede Agronano, Rede Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas, CAPES, EMBRAPA Gado de Leite e PPGCBIO-UFJF.

REFERÊNCIAS

DEMIR, E.; MARCOS, R. Toxic and genotoxic effects of graphene and multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 81, n. 14, p. 645–660, 2018.

DI IANNI, J. et al. In vitro-in vivo correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 18, 2021.

FERREIRA, L. S. et al. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 4, p. 659–666, 2019.

HOU, J. et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. **Journal of Environmental Sciences**, 2018.

KYRIAKIDOU, K. et al. In vitro cytotoxicity assessment of pristine and carboxyl-functionalized MWCNTs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, 2020.

LIU, S. et al. Cytotoxicity of carboxyl carbon nanotubes on human embryonic lung fibroblast cells and its mechanism. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 9, p. 210–220, 2012.

LIU, Y. et al. Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 702–713, 2013.

LONG, J. et al. The adverse vascular effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human vein endothelial cells (HUVECs) in vitro: role of length of MWCNTs. **Journal of Nanobiotechnology**, v.15, 2017.

MIERNICKI, M. et al. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions. **Nature Nanotechnology**, v.3, p. 2018-2016, 2019.

MOONEY, E. et al. Carbon Nanotubes and Mesenchymal Stem Cells: Biocompatibility, Proliferation and Differentiation, **Nano Letters**, v. 8, 2008.

QIAN, S. et al. Carbon nanotubes as electrophysiological building blocks for a bioactive cell scaffold through biological assembly to induce osteogenesis. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, p. 12001-12009, 2019.

REAMON-BUETTNER, S. et al. Cellular senescence as a response to multiwalled carbon nanotube (MWCNT) exposure in human mesothelial cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 193, 2021.

SANO, M. et al. Cellular Responses of Human Lymphatic Endothelial Cells to Carbon Nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 10, 2020.

SUKHANOVA, A. et al. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, 2018.

URSINI, C. et al. Study of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Hydroxyl-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes on Human Pulmonary Cells. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

VUKOVIĆ, G. et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of surface amino-functionalized water-dispersible multi-walled carbon nanotubes. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 8067–8075, 2009.

WANG, J. et al. Effects of chronic exposure to cigarette smoke on canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. **American Journal Physiological Cellular Physiological**, v. 306, p. 364–73, 2014.

WEAVER, J. L. Estimation of Cell Viability by Flow Cytometry. **Flow Cytometry Protocols**, v. 97, p. 77–84, 1998.

ZANETTE, R. S. S. **Produção de matrizes biológicas a partir de valvas cardíacas de suínos e recelularização com células tronco da polpa dentária humana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil, 2016.

ZHAO, X. et al. The toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 126, 2019.

QUALITY CONTROL OF ANTIVIRAL VACCINES WITH THE LITESIZER

Data de aceite: 25/10/2021

Nathalie Etchart

Anton Paar GmbH

Eduardo C. Araújo

Anton Paar Brasil

Talita Cardeal

Anton Paar Brasil

ABSTRACT: The particle size of vaccines has a considerable influence on their half-life *in vivo*, as well as on their uptake by antigen-presenting cells. The surface charge of particles is also suspected of influencing the same parameters. Here we use DLS and ELS to characterize respectively the particle size and zeta potential of two inactivated antiviral vaccines.

KEYWORDS: DLS, ELS, particle size, zeta potential, pharmaceuticals, inactivated virus, vaccine adjuvants, aluminum salt, cold chain

CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS ANTIVIRAIS UTILIZANDO DLS/ELS

RESUMO: O tamanho das partículas das vacinas tem uma influência considerável em sua meia-vida *in vivo*, bem como em sua absorção pelas células apresentadoras de antígenos. A carga superficial das partículas também é suspeita de influenciar os mesmos parâmetros. No artigo, utiliza-se DLS e ELS para caracterizar, respectivamente, o tamanho de partícula e o potencial zeta de duas

vacinas antivirais inativadas.

PALAVRAS - CHAVE: Vacina, DLS, ELS, tamanho de partículas, potencial zeta.

BACKGROUND

The particle size of vaccines has a considerable influence on their half-life *in vivo*, as well as on their uptake by antigen-presenting cells. The surface charge of particles is also suspected of influencing the same parameters. Here we use DLS and ELS to characterize respectively the particle size and zeta potential of two inactivated antiviral vaccines.

RESULTS

A tick-borne encephalitis (TBE) vaccine displays a monomodal particle size distribution in the lower micrometer range, corresponding to the expected size of the aluminum salt adjuvant. A cell-based influenza vaccine, in contrast, is shown to contain both split viruses (ca. 30 nm) and larger aggregates (ca. 250 nm). Zeta potential measurements indicate that both vaccines consist of weakly anionic particles. Interestingly, we demonstrate that simulated cold chain disruptions (heat treatment, freeze-thawing) induce significant changes in the particle size distribution of both vaccines.



1 | INTRODUCTION

Vaccines often constitute the only line of defense against viral infections, as the range of antiviral drugs currently available and treatment success are limited. The situation is different for bacterial infections, where antibiotics are an efficient therapeutic intervention.

Antiviral vaccines can consist of live-attenuated viral particles, which produce a low-noise infection in the recipient. While this strategy is able to mimic an infection by the pathogen very closely, and generally triggers a very robust immune response, it has the potential for serious side effects in immunocompromised individuals.

Thus, a majority of antiviral vaccines now consist in formulations which do not have the potential for replication in the host. These range from chemically inactivated whole or split viruses, to recombinant proteins or virus-like particles produced by genetic engineering. While these vaccines have a better safety profile, they also tend to trigger weaker immune responses than their live-attenuated counterparts.

Hence, many of them are administered together with so-called vaccine adjuvants, which increase the efficacy and longevity of the immune response.

The oldest and still most popular such adjuvant is aluminum salt (e.g., aluminum hydroxide or aluminum hydroxyphosphate). Its immunostimulatory properties are believed to be linked both to its capacity to adsorb and retain antigens for long periods at the site of injection, and to its ability to trigger the local release of pro-inflammatory mediators (1).

The particle size of a vaccine has a significant impact on its immunogenicity. With few exceptions, viruses are nanoparticles ranging in size from 15 to 300 nm. Upon injection, particles in this size range are efficiently taken up by dendritic cells, a class of sentinel cells uniquely endowed with the ability to induce both antibody- and killer cell-mediated immunity (2). In contrast, particles in the micrometer range, such as aluminum salt particles (1), are preferentially taken up by monocytes and macrophages, which predominantly induce an antibody-mediated immune response.

Bearing in mind that the distribution of the different classes of sentinel cells in the

body is strongly tissue- specific, a vaccine's particle size should therefore be tailored:

- Based on the type of immune response required to counter the pathogen, and
- Depending on the vaccine's delivery route (3).

Dynamic light scattering (DLS) is a fast and non- invasive measurement method which elucidates the size distribution of particles in the lower nanometer to lower micrometer size range. This makes DLS a method of choice for the quality control of antiviral vaccines (3).

Here we demonstrate the ability of the Litesizer to determine the particle size of two antiviral vaccines, an aluminum salt-adjuvanted, inactivated tick-borne encephalitis (TBE) vaccine, and a non-adjuvanted, inactivated and split influenza vaccine. We simulated cold chain disruptions by comparing samples stored in optimal conditions to samples that were heat-treated or submitted to a freeze-thaw cycle.

In addition, ELS measurements were performed to assess the zeta potential of the vaccine particles, giving additional clues on the stability of the preparations.

2 | EXPERIMENTAL SETUP

2.1 Samples

Two antiviral vaccines were purchased from a local pharmacy:

- TBE vaccine (FSME-Immun®, Pfizer, Austria)

Inactivated vaccine based on the Neudörfl strain of TBE. The virus is propagated in chicken embryo fibroblasts and inactivated by formaldehyde. Aluminum hydroxide is used as adjuvant, and human serum albumin as stabilizer. One dose consists of 2.4 μg of viral antigen in 0.5 mL of diluent (4).

- Influenza vaccine (Flucelvax®, Seqirus, USA) Quadrivalent influenza vaccine containing 2 strains of influenza A viruses and 2 strains of influenza B viruses, according to the WHO guidelines for the 2019-2020 northern hemisphere influenza season. The viruses are propagated in the continuous MDCK cell line, inactivated by b- propiolactone, detergent-disrupted and purified. One dose is formulated to contain 15 μg of viral hemagglutinin (HA) from every viral strain, or 60 μg total HA, in 0.5 mL (5).

2.2 Sample Treatment

Before treatment, the vaccines were stored in their original conditioning at +4 °C, according to manufacturer recommendations. Each sample was then split in 3 sub-samples in sterile microtubes, which were stored as follows:

- One sample was further stored at the optimal temperature of +4 °C (“Untreated” sample).
- One sample was stored in a dry oven set at 50 °C for 24 hrs., then returned to +4 °C (“Heat-treated” sample).
- One sample was frozen at -18 °C for 24 hrs., then thawed at +4 °C (“Freeze-thawed” sample).

All samples were tested in parallel, between 24 and 28 hrs. after collection from the original conditioning.

2.3 DLS Measurements

For DLS measurements, the TBE vaccine samples were diluted 1/10 in sterile saline solution (0.9 % NaCl). The influenza vaccine samples were diluted 1/5 in sterile saline. These dilutions were established as optimal for DLS measurements in a preliminary experiment (data not shown).

The measurements were performed on an Anton Paar Litesizer 500 instrument. Compared to disposable (polystyrene) cuvettes, quartz cuvettes display superior optical qualities and reduced protein adsorption, and were thus selected here.

Measurement were performed at 25 °C, in the 175° measurement angle (back angle), and using a manual quality mode (12 runs, 10 seconds per run). The optical filter and the focus position were selected automatically by the instrument.

Repetition series consisted in a minimum of 5 and a maximum of 8 consecutive measurements. Results were averaged over the whole measurement.

Statistical significance was established by standard t- test (two-sample, assuming unequal variance).

Differences between data sets were considered significant when the returned *P* value was < 0.05.

2.4 ELS measurements

Samples were analyzed in native, undiluted form, using the Univette and the low-volume accessory (sample volume: 50 μ L).

Zeta potential measurements were performed on a Litesizer 500 instrument at 25 °C, and using the Protein mode, which introduces small breaks between measurement runs and therefore limits Joule heating. The voltage was adjusted automatically by the instrument. The quality was set to the manual mode, with 200 runs per measurement.

Repetition series consisting in 5 consecutive measurements were performed.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Particle Size Measurement of TBE Vaccine Samples

As shown in Figure 1, the intensity-weighted particle size distribution of an optimally-stored TBE vaccine (“Untreated”, green curve) displays a single peak culminating between 2 and 3 μm . This is in accordance with the known particle size of commercial aluminum hydroxide used as vaccine adjuvant, which is in the lower micrometer range (1).

Furthermore, the particle size distribution of both mean curves (Figure 1) and of all individual measurements (not shown) is entirely devoid of peaks in the 0-to-1000 nm size range. This indicates that viral particles are not detectable as free-floating entities, and are likely overwhelmingly adsorbed onto the adjuvant particles.

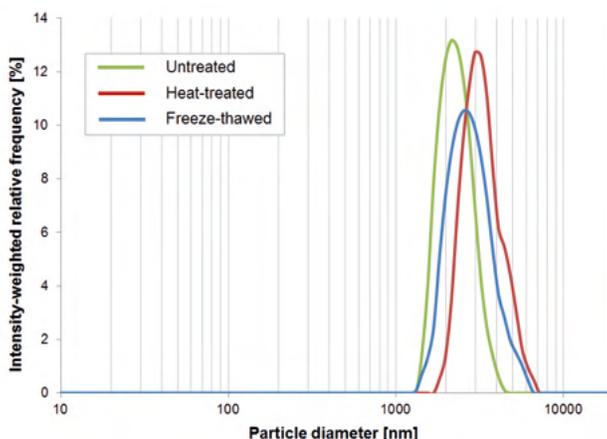


Figure 1: Intensity-weighted particle size distributions of TBE vaccine samples, either untreated (green), heat-treated (red), or freeze-thawed (blue). Curves represent the averages from 5 to 8 consecutive measurements.

The particle size distributions of both freeze-thawed and heat-treated vaccine samples display monomodal distributions of slightly enlarged sizes (Figure 1). This is confirmed by the hydrodynamic diameter (HDD) results obtained for these samples (Table 1, Figure 2). Indeed, the mean HDD of the freeze-thawed sample is slightly but significantly increased compared to that of the untreated sample, from 3030 to 3582 nm ($P < 0.05$). The heat-treated sample displays a more pronounced increase in HDD, from 3030 to 4030 nm ($P < 0.01$).

Parameter	Untreated	Heat-treated	Freeze-thawed
HDD [nm]	3030	4030	3582
Standard deviation [nm]	157	511	277
Rel. standard deviation [%]	5.18	12.68	7.73

Table 1: Hydrodynamic diameter (HDD) results for untreated, heat- treated or freeze-thawed TBE vaccine samples. Averages from 5 to 8 consecutive measurements.

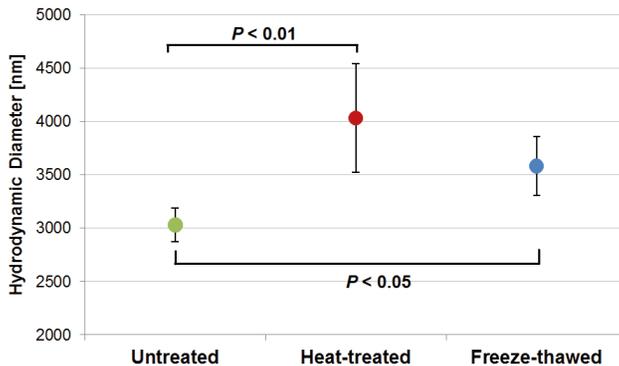


Figure 2: Hydrodynamic diameter results for untreated, heat- treated and freeze-thawed TBE vaccine samples. Statistical significance between the different data sets, as determined by standard t-test, is shown on the relevant brackets.

Of note, the standard deviation of the HDD for the heat-treated sample is much larger than that of the untreated sample (Figure 2). This sub-optimal reproducibility suggests that the Litesizer might be detecting very large aggregates in the heat-treated sample, which cannot be accurately represented as they are above the Litesizer detection limit of $10 \mu\text{m}$.

Taken together, these data indicate that the Litesizer is able to measure the particle size of an aluminum salt-adsorbed viral vaccine. The detected particles are of the size expected for aluminum hydroxide.

Interestingly, a significant increase in HDD is observed for both heat-treated and freeze-thawed vaccine samples, indicating that major disruptions in the cold chain promote adjuvant aggregation.

3.2 Particle Size Measurement of Influenza Vaccine Samples

The expected size of the live influenza virus is around 100 nm, but inactivation and detergent splitting has been shown to reduce the size of the primary particles in vaccine preparations (6).

The particle size distribution of the untreated influenza vaccine sample shows a bimodal distribution, with a major peak culminating around 250 nm and a minor peak culminating around 30 nm (Figure 3, green curve). Thus, our results suggest that the

vaccine under study is composed of split viral particles of diameter around 30 nm, and of aggregates of larger sizes.

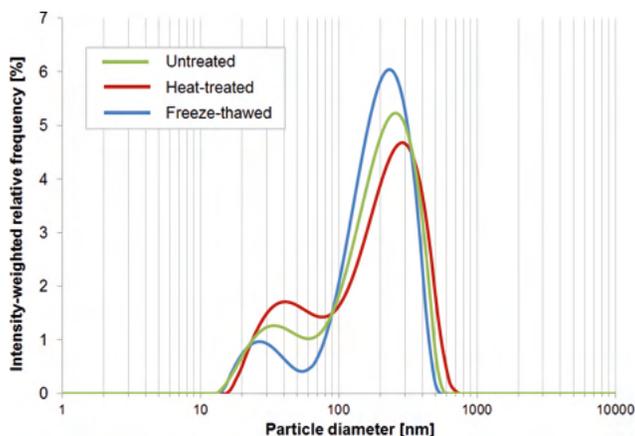


Figure 3: Intensity-weighted particle size distribution of influenza vaccine samples, either untreated (green), heat-treated (red), or freeze-thawed (blue). Curves represent the averages from 6 consecutive measurements.

Because large particles contribute much more strongly to the DLS signal than smaller ones, the fact that large particles visually dominate the distribution does not necessarily indicate that most of the material is in aggregated form. In fact, when the particle size distribution was switched from an intensity-weighted to a volume-based or a number-based one, the aggregate peak disappeared and only the minor peak (ca. 30 nm) was visible (data not shown). This indicates that the primary particles are much more numerous than the aggregates. However, since the DLS method is intrinsically intensity-weighted, and since the characterization of aggregates is highly relevant to the quality control of vaccines, we performed result analysis exclusively on the intensity-weighted data.

Figure 3 also reveals that both heat-treated and freeze-thawed preparations retain a bimodal profile, but that subtle differences in the size distribution arise from treatment. The heat-treated sample shows a major peak of decreased magnitude, and a minor peak of increased magnitude.

Interestingly, the freeze-thawed sample displays an opposite behavior, with a major peak of increased magnitude and a minor peak of decreased magnitude. This suggests that freeze-thawing tends to increase the aggregation of split virus particles, while heat treatment reduces it.

In addition to the HDD, which is calculated over the whole distribution, the Litesizer software calculates the mean diameter of particles contained in up to 3 individual peaks in the distribution. Furthermore, the area under the curve is calculated for every peak (Table 2), indicating the relative contribution of the particles in the relevant peaks to the DLS signal.

Parameter	Untreated	Heat-treated	Freeze-thawed
HDD \pm SD [nm]	156 \pm 2.2	151 \pm 4.4	164 \pm 3.3
Peak 1 by Intensity \pm SD [nm]	231 \pm 13.6	260 \pm 25.5	218 \pm 9.3
Peak 2 by Intensity \pm SD [nm]	34.2 \pm 3.8	42.3 \pm 5.4	29.4 \pm 2.6
Area under curve - Peak 1 \pm SD [%]	83.7 \pm 2.6	76.1 \pm 3.9	89.2 \pm 0.9
Area under curve - Peak 2 \pm SD [%]	16.3 \pm 2.6	23.9 \pm 3.9	10.8 \pm 0.9

Table 2: Hydrodynamic diameter (in nm), peak by intensity (in nm) and area under the curve – Peak (in %) for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples.

Results from the area under the curve for peak 1 (aggregates) and peak 2 (primary particles) confirm the differences between the samples observed in the particle size distribution. As shown in Figure 4, the contribution of primary particles (peak 2) to the DLS signal increases from 16 to 24 % when the sample is heat-treated ($P < 0.01$). Conversely, the primary particles only account for 11 % of the DLS signal in the freeze-thawed sample ($P < 0.001$).

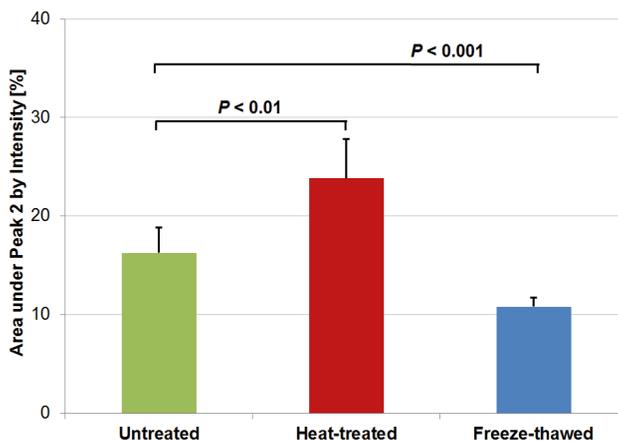


Figure 4: Area under the curve for peak 2 (primary particles), by intensity, in %, for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples. Statistical significance between the different data sets, as determined by standard t-test, is shown on the relevant brackets.

These results indicate that subtle but significant differences in the relative proportion of primary particles and aggregates can be efficiently detected by DLS. Our observations also suggest that heat treatment and freeze-thawing have opposite effects on the aggregation behavior of inactivated influenza particles, with freeze-thawing promoting aggregation while

heat treatment leads to de-aggregation.

3.3 Zeta Potential Measurement of TBE and Influenza Vaccine Samples

The surface charge of particles, as measured by their zeta potential, is commonly used as indicator of colloidal stability. The larger the absolute zeta potential, the greater the repulsive forces between the particles are, and the more stable the preparation will be. But, in the case of particles destined for *in vivo* administration, it is also demonstrated that zeta potential influences particle uptake by specific cells.

On exosomes, negative charges have been shown to limit protein opsonization. This, in turn, slows down their clearance by the reticulo-endothelial system and increases their lifetime *in vivo* (7). Other reports indicate that cationic nanoparticles are preferentially taken up by dendritic cells, and result in increased local immune responses, compared to their anionic counterparts (8). In all, this suggests that the measurement of zeta potential is highly relevant to the quality control of vaccine preparations.

Here, the zeta potential of TBE samples (untreated, heat-treated or freeze-thawed) was measured with the Univette and its low-volume accessory, which enabled measurements with as little as 50 μL of sample.

As shown in Figure 5 and Table 3, the zeta potential of the TBE vaccine particles can be efficiently measured with the Litesizer, with good repeatability. The mean zeta potential appears weakly negative (ca. -12 mV), and is not noticeably modified by heat treatment nor by freeze-thawing.

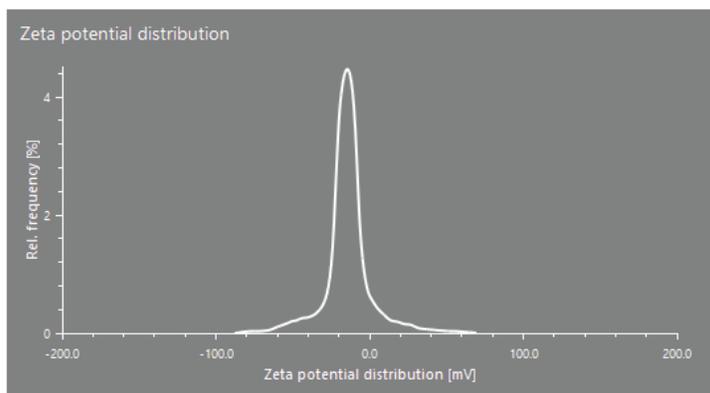


Figure 5: Representative Zeta potential distribution for an untreated TBE vaccine sample. Measurement performed with the Univette and the small volume accessory (sample volume = 50 μL).

Parameter	Untreated	Heat-treated	Freeze-thawed
Mean ZP	- 12.2 mV	- 11.5 mV	- 12 mV
Standard Deviation	1.3 mV	0.3 mV	0.2 mV
Rel. standard deviation	10.6 %	2.6 %	1.4 %

Table 3: Zeta potential results for untreated, heat-treated and freeze-thawed TBE vaccine samples. Mean results from 5 consecutive measurements.

The influenza vaccine sample also displays weakly negative (ca. - 6 mV) zeta potential values, which are also not significantly modified by heat treatment nor by freeze-thawing (Figure 6, Table 4).

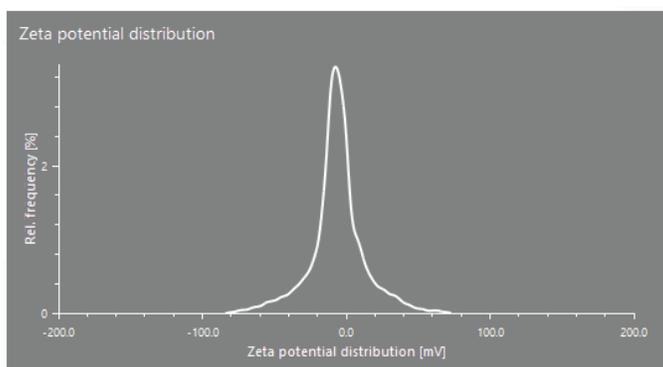


Figure 6: Representative Zeta potential distribution for an untreated influenza vaccine sample. Measurement performed with the Univetete and the small volume accessory (sample volume = 50 μ L).

Parameter	Untreated	Heat-treated	Freeze-thawed
Mean ZP	- 6.6 mV	- 6.0 mV	- 5.7 mV
Standard Deviation	0.9 mV	0.8 mV	1.3 mV
Rel. standard deviation	13.7 %	12.5 %	22.4 %

Table 4: Zeta potential results for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples. Mean results from 5 consecutive measurements.

As a rule of thumb, colloids are considered stable when absolute zeta potential values are over 30 mV. One can therefore speculate that the low zeta potential magnitude observed here for both vaccines accounts for their tendency to aggregate in response to cold chain disruptions.

4 | CONCLUSION

Both the size and the zeta potential of particles are relevant for the shelf life and immunogenicity of vaccine preparations. Here we demonstrate that the Litesizer is a quick and effective tool for the characterization of antiviral vaccines.

The TBE vaccine, which is adjuvanted with aluminum salt, is shown to consist of particles in the lower micrometer range, as expected from the literature. In the influenza vaccine, which is devoid of adjuvant, both split viruses and larger aggregates are observed. For both vaccines, simulated cold chain disruptions (heat treatment or freeze-thawing) are shown to trigger subtle but significant changes in the particle size distribution.

Zeta potential measurements were also successfully performed, demonstrating that both vaccines consist of weakly anionic particles. Cold chain disruptions do not appear to significantly modify the surface charge of the vaccine particles.

REFERENCES

1. **Shardlow E., Mold M. & Exley C. (2017).** From stock bottle to vaccine: elucidating the particle size distributions of aluminum adjuvants using dynamic light scattering. *Frontiers in Chemistry* 4:48.
2. **Etchart N., et al. (2001).** Dendritic cells recruitment and *in vivo* priming of CD8+ CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein. *Journal of Immunology* 167:384-391.
3. **Slütter B. & Jiskoot W. (2016).** Sizing the optimal dimensions of a vaccine delivery: a particulate matter. *Expert Opinion on Drug Delivery* 13:167-170.
4. **World Health Organization (WHO) (2011).** Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record* 86:241-256.
5. **Lamb Y.N. (2019).** Cell-Based Quadrivalent Inactivated Influenza Virus Vaccine (Flucelvax® Tetra/Flucelvax Quadrivalent®): A Review in the Prevention of Influenza. *Drugs* . 2019, Bd. 79, S. 1337–1348.
6. **Kon T.C., et al. (2016).** Influenza Vaccine Manufacturing: Effect of Inactivation, Splitting and Site of Manufacturing. Comparison of Influenza Vaccine Production Processes. *PLOS One* 11:e0150700.
7. **Ren J., He W., Zheng L. & Duan H. (2016).** From structures to functions: insights into exosomes as promising drug delivery vehicles. *Biomaterials sciences* 4:910-921.
8. **Fromen C.A., et al. (2016).** Nanoparticle surface charge impacts distribution, uptake and lymph node trafficking by pulmonary antigen-presenting cells. *Nanomedicine* 12:677–687.

CAPÍTULO 6

CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE GLUTARIMIDE ALKALOID JULOCROTINE

Data de aceite: 25/10/2021

Data da submissão: 03/08/2021

Regianne Maciel dos Santos Correa

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0002-9837-4304>

Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/9371025014746575>

Lorena Araújo da Cunha

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0002-1085-3635>

Tatiane Cristina Mota

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0001-8127-8503>

Diego Di Felipe Ávila Alcantara

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0001-5045-2265>

Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon

Laboratório de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0002-9257-8998>

Rosana de Nazaré Silva Peixoto

Laboratório de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/8910370386641451>

Rommel Rodriguez Burbano

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0002-4872-234x>

Marcelo de Oliveira Bahia

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
Belém – Pará
<https://orcid.org/0000-0001-6820-6521>

ABSTRACT: Natural products are potential drugs candidates to treat several pathologies. However, some of these compounds can be toxic to the body and may even have genotoxic properties, causing changes in DNA with consequent increased risk of carcinogenesis. Julocrotine (2-[N-(2-methylbutanoly)]-N-phenylethylglutarimide) is a natural glutarimide alkaloid isolated mainly from *Croton species* (Euphorbiaceae). *In vitro*

studies have shown that this alkaloid is an antiproliferative agent against the promastigote and amastigote forms of *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Thus, the present study aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of julocrotine using the MTT, the comet Assay and the DCFH-DA assay for reactive oxygen species (ROS) assessment in cultured human lymphocytes. The tested alkaloid was isolated from *Croton pullei* Lanj., a species collected in the Amazon Region. Our results showed that julocrotine is not cytotoxic to human lymphocytes at all tested concentrations, including the concentration that it is active against *L. amazonensis*. However, it was genotoxic to human lymphocytes. In addition, an increase in the rate of ROS was also observed. Although julocrotine was not cytotoxic in the assessed conditions, the genotoxic effect observed reinforces the need of caution for its possible use as a drug to treat not only leishmaniasis, but any other pathology.

KEYWORDS: Leishmaniasis; Julocrotine, Comet assay; Cytotoxicity; Reactive oxygen species.

EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ALCALÓIDE GLUTARIMIDA JULOCROTINA

RESUMO: Os produtos naturais são potenciais candidatos a medicamentos para o tratamento de diversas patologias. Porém, alguns desses compostos podem ser tóxicos para o organismo e podem até apresentar propriedades genotóxicas, causando alterações no DNA com consequente aumento do risco de carcinogênese. Julocrotina (2- [N- (2-metilbutanolil)] - N-feniletilglutarimida) é um alcalóide glutarimida natural isolado principalmente de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae). Estudos *in vitro* demonstraram que este alcalóide é um agente antiproliferativo contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da julocrotina por meio do MTT, ensaio do cometa e ensaio do DCFH-DA para avaliação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em cultura de linfócitos humanos. O alcalóide testado foi isolado de *Croton pullei* Lanj., Espécie coletada na região amazônica. Nossos resultados mostraram que a julocrotina não foi citotóxica para os linfócitos humanos em todas as concentrações testadas, incluindo a concentração que é ativa contra *L. amazonensis*. No entanto, foi genotóxico para os linfócitos humanos. Além disso, também foi observado um aumento na taxa de ROS. Embora a julocrotina não tenha sido citotóxica nas condições avaliadas, o efeito genotóxico observado reforça a necessidade de cautela quanto ao seu possível uso como medicamento para tratar não só a leishmaniose, mas qualquer outra patologia.

PALAVRAS - CHAVE: Leishmaniose; Julocrotina; Ensaio do cometa; Citotoxicidade; Espécies reativas de oxigênio.

1 | INTRODUCTION

Brazil has an abundant flora, popularly explored in the prevention, treatment, and cure of different diseases. Among these pathologies, one can mention fungal infections, malaria, diabetes, high cholesterol levels, and certain types of cancers (COELHO-FERREIRA, 2009; CARTAXO *et al.*, 2010). Nevertheless, it is important to note that some constituents of plants

can be toxic to the body. For example, plants used for therapeutic purposes may contain genotoxic properties that can cause changes in DNA (OYEYEMI, 2015). Even though ROS are produced during normal aerobic metabolism in mammalian cells, they are involved in cellular and tissue damage and the free radicals produced by oxidative processes can attack DNA bases or sugars, causing breakage of single strands that can evolve into double-strand breaks and abasic sites in DNA (MARSHALL; BARROWS, 2004; MARSHALL *et al.*, 2009). In that way, it is important to evaluate cytotoxic and genotoxic activities of natural products before their use in any kind of treatment.

Julocrotine (Figure 1) is a natural product included in a small group of alkaloids known as glutarimide alkaloids that have been isolated mostly from Euphorbiaceae species. It was first identified from *Julocroton montevidensis* (NAKANO *et al.*, 1961) and from some *Croton* species, such as *C. membranaceus* (ABOAGYE *et al.*, 2000), *C. cascarilloides* (CUONG *et al.* 2002), *C. cuneatus* (SUAREZ *et al.*, 2004), *C. pullei* var. *glabrior* Lanj. (BARBOSA *et al.*, 2007), among other *Croton* species. More recently, it was isolated from a *Cordia* species (Boraginaceae) (PARKS *et al.*, 2010). Julocrotine is the most common glutarimide alkaloid and therefore the most cited one. Stuart *et al.* (1973), Teng *et al.* (2011), Neves Filho *et al.* (2011), and Silva and Joussef (2011) have synthesized julocrotine and other glutarimide alkaloids.

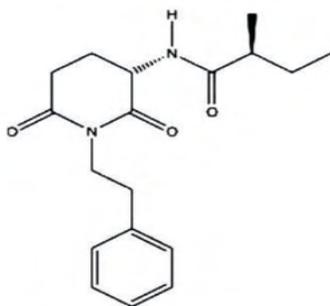


Figure 1: Chemical structure of julocrotine, a glutarimide alkaloid isolated from *Croton pulleivar. glabrior* (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Guimarães and coworkers (2010) have shown the inhibitory *in vitro* effect of julocrotine on the growth of promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* (L.) with no cytotoxicity against the host cell. Taking into account the observed antileishmanial activity of julocrotine, together with other biological activity that this alkaloid can show, with the possibility to be used in the future for different treatments, this study aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects induced by this compound in human lymphocytes using the MTT test, comet assay and DCFH-DA assay for reactive oxygen species (ROS) assessment.

2 | METHODS

2.1 Plant extraction and isolation

Stems of *Croton pullei* Lanj. (sin. *Croton pullei* var. *glabrior*) (SECCO *et al.*, 2008) were collected in the municipality of Peixe-Boi, State of Pará, Brazil. A voucher specimen (MG 188,908) was deposited in the herbarium of the Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém - PA - Brazil). The botanic material (1,000 g) was extracted with hexane and methanol, successively, at room temperature, yielding the hexane (0.65 g) and methanol (80.00 g) extracts, after concentration under vacuum. From the hexane solution, a white solid precipitated during concentration of the hexane solution. After filtration, the solid was purified by crystallization from a 5% hexane-EtOAc solution, yielding julocrotine (2.50 g). The methanol extract (20.00 g) was suspended in a 3:1 methanol – water solution and successively partitioned with CH_2Cl_2 , EtOAc and *n*-BuOH. The concentrated CH_2Cl_2 phase (5.00 g) was fractionated by column chromatography on silica gel using mixtures of hexane, ethyl acetate and methanol in gradients of increasing polarities as mobile phase. The fraction eluted with hexane-EtOAc 27% from the column yielded additional quantity (1.00 g) of julocrotine. The structure of the alkaloid julocrotine (N-(2,6-dioxo-1-phenethyl-piperidin-3-yl)-2-methyl-butyramide), also named as 2-[N-(2-methylbutanoyl)]-N-phenylethylglutarimide, was proposed from NMR spectrometry data. When first isolated, structure confirmation of julocrotine was proposed based on NMR, IR spectrometry and X-ray cristallography data (MOREIRA *et al.*, 2008). The drug was dissolved in methanol. For the experiments, julocrotine was diluted in the culture medium (RPMI) until the desired concentrations.

2.2 Culturing Isolated Lymphocytes

Blood samples (20 mL) were obtained by venipuncture from three healthy 20 to 30-year old non-smokers, two females and one male, with no recent history of exposure to mutagens. This study followed the principles of the local ethics committee (Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Pará) and the donors gave written informed consent to participate in the study after a full explanation of the purpose, nature and risk of all procedures. Blood lymphocyte isolation was carried out using the procedure described by Fenech (2000). 1×10^6 cells/mL were seeded in 5 mL of RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 4% phytohemagglutinin A (Gibco-Invitrogen, Carlsberg, CA, USA), 0.05 mg/mL gentamicin sulfate (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and $2.16 \mu\text{M}$ amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in an incubator containing 5% CO_2 .

2.3 MTT assay

For the MTT assay, isolated lymphocytes were grown in 96-wells culture plates at concentration of 0.5×10^6 cells/well and incubated for 24 hours. After the initial period of

incubation, cells were treated with different concentrations of julocrotine for 24 hours. After treatment, 100 μl of MTT (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the cells for 3 hours. Then, the MTT was removed and 100 μl of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma®) was added for 1 hour in order to dissolve the formazan obtained during the process. Afterward, DMSO was measured by spectrophotometry ($\lambda = 562 \text{ nm}$). The cell survival was calculated as the absorbance percentage compared to the control absorbance. The julocrotine concentrations used were 19.75; 39.5; 79; 158; 316; 632 and 1264 μM . These concentrations were chosen based on data from the literature (16). *N*-Nitroso-*N*-methylurea (NMU), a known carcinogenic alkylant was used as positive control.

2.4 Comet assay (alkaline version)

For the alkaline version of the comet assay, lymphocytes were grown in sterile 12-wells culture plates (Corning) at a concentration of 1×10^6 cells/well and treated with different concentrations of julocrotine (79, 158, 316 and 632 μM) for 24 hours. Doxorubicin (5.52 μM) was used as positive control. After treatment, 450 μL of the cell suspension were homogenized with 300 μL of a low-melting-point agarose (0.8%), spread onto microscope slides pre-coated with a normal-melting-point agarose (1.5%) and covered with a coverslip (24x60 mm). After 5 minutes at 4°C, the coverslip was removed and the slides were immersed in cold lysis solution (2.5M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton-X, pH=10). After lysis, the slides were placed in an electrophoresis chamber and covered with freshly made electrophoresis buffer (300 mM NaOH; 1 mM EDTA, pH>13). The electrophoresis was run for 25 minutes (34 V and 300 mA). Afterward, the slides were neutralized by submersion in distilled water (4°C) for 5 minutes and fixed in 100% ethanol for 3 minutes. Staining of the slides was performed immediately before the analyses using ethidium bromide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Slides were prepared in duplicate, and 100 cells were screened per sample (50 cells from each slide) using a fluorescent microscope (Olympus BX41) at 40x magnification. The DNA damage index (DI) (i.e. the relative intensity of fluorescence in the comet's tail in function of the frequency of DNA breaks) was visually determined. The following five categories (0-4) were used: class 0 (no damage), class 1 (little damage with a tail length shorter than the diameter of the nucleus), class 2 (medium damage with a tail length one or two times the diameter of the nucleus), class 3 (significant damage with a tail length one or two times the diameter of the nucleus), and class 4 (significant damage with a tail length greater than three times the diameter of the nucleus). Damage index was determined by the following formula:

$$DI \text{ (au): } [(N1*1 + N2*2 + N3*3 + N4*4)] / 100 \text{ (total number of analyzed cells)}$$

where DI = DNA damage index, au = arbitrary unit, N1 - N4 = cells in classes 1, 2, 3 and 4.

2.5 Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay

Intracellular ROS generation was evaluated using the fluorescent probe dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma Chemical Co. / St. Louis, MO, USA). Lymphocytes were grown in sterile 12-wells culture plates (Corning) (1×10^6 cells/well) and exposed to julocrotine at different concentrations (316 and 632 μM) for 3 h at 37°C. Thereafter, cells were collected by centrifugation and washed in PBS at 1000 rpm for 5 min. After a new centrifugation, cells were suspended in PBS and DCFH-DA was added to a final concentration of 10 μM . The suspension was incubated in dark for 30 min at 37°C and after a new wash in PBS, the samples were analyzed by spectrophotometry with an emission wavelength of 528 nm and an excitation wavelength of 485 nm. H_2O_2 (2mM) was used as positive control.

2.6 Statistical analysis

For parametric data sets, statistical analysis was performed using ANOVA, followed by the Tukey test. For nonparametric data sets, we used Kruskal-Wallis test. The BIOESTAT 5.0 software (AYRES *et al.*, 2007) was used to perform statistical analyses. *P*-values of <0.05 were considered significant.

3 | RESULTS

3.1 MTT assay

The cell viability showed no significant decrease in the lymphocytes survival rates after a 24 hours treatment with julocrotine at all tested concentrations (Figure 2). Using the same experimental conditions, the positive control (NMU) showed a statistically significant decrease in the survival rates. The cell viability values were 69.7, 78.4, 70.6, 64.2, 51.9, 45.7, and 11.7% for the NMU and 121.3, 109.2, 115.4, 105.4, 115.2, 107.2, and 108.2% for julocrotine using concentrations of 19.75, 39.5, 79, 158, 316, 632, and 1264 μM , respectively.

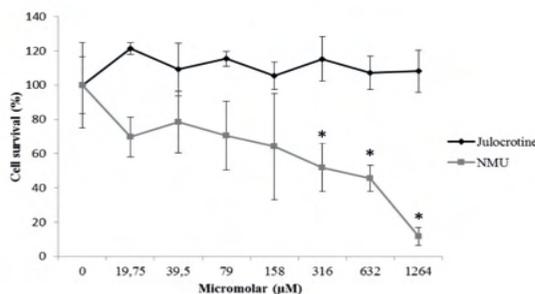


Figure 2: Effects of Julocrotine and NMU (positive control) in human lymphocyte culture analyzed by MTT assay. * $p < 0.05$ (ANOVA/Tukey post-test) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three experiments.

3.2 Comet assay

The comet assay with julocrotine showed that this compound is genotoxic to human lymphocytes only at high concentrations. A dose-response increase of the DNA damage (Damage index = DI) was observed (Figure 3). However, a significant increase ($p < 0.05$) of DI was observed only at $632 \mu\text{M}$ ($\text{DI} = 1.76$), when compared to control ($\text{DI} = 0.78$).

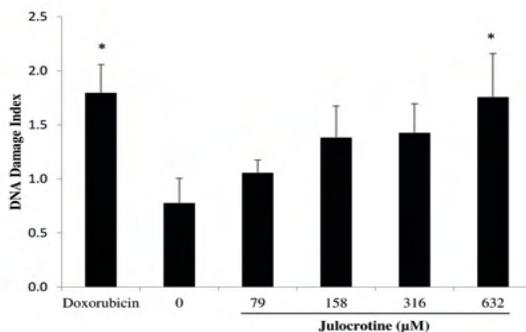


Figure 3: Effects of Julocrotine in human lymphocytes analyzed by comet assay. * $p < 0.05$ (ANOVA/Tukey post-test) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three experiments; $n = 3$.

3.3 ROS induction

ROS production experiments indicated that there was a significant ($p < 0.05$) increase in the rate of such molecules in all tested concentrations ($316 \mu\text{M}$ and $632 \mu\text{M}$ of julocrotine) in comparison to the negative control (Figure 4).

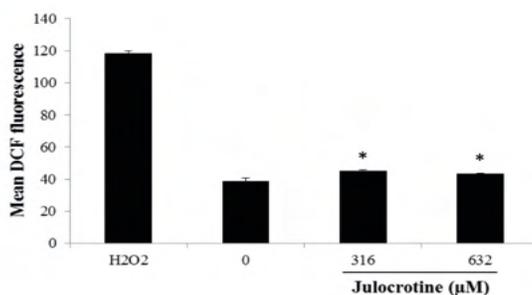


Figure 4: Mean fluorescence intensity of human lymphocytes stained with ROS indicator DCFH-DA after exposition to julocrotine. * $p < 0.05$ (ANOVA/Tukey post-test) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three

4 | DISCUSSION

The literature shows that alkaloids cytotoxicity is quite variable, as it is expected due to the variety of their structures. In addition to many types of alkaloids, little structures differences can affect most of the biological activities.

There are few cytotoxicity studies of glutarimide alkaloids and no one deals with effects on lymphocytes. Suarez and coworkers have observed that julocrotol and isojulocrotol (two glutarimide alkaloids isolated from *C. cuneatus*, which structures are very close to julocrotine), were reported to exhibit cytotoxic activity against MCF-7 (human breast carcinoma) and Hep-G2 (hepatoma). Julocrotine was also tested in the same study, but the results were considered not significant (SUAREZ *et al.*, 2004). A very high activity of julocrotine on the brine shrimp lethality test (*Artemia salina*) was reported (KAPINGU *et al.*, 2005). Antimicrobial effects of julocrotine (against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *C. albicans*) have been reported, but they were considered insignificant (BAYOR *et al.*, 2009).

The studies of Guimaraes and coworkers have shown that julocrotine (at 79 μM) was not toxic to mouse peritoneal macrophages using MTT assays when treated for periods of 24, 48, and 72 hr (GUIMARÃES *et al.*, 2010). According to the same authors, julocrotine showed antileishmanial activity in promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* when tested *in vitro* at concentrations ranging from 79 to 316 μM , and these findings indicated that julocrotine has the ability to diffuse through cell membranes being cytotoxic for intracellular parasites, although not to the host cell. Our results showed that julocrotine did not induce cytotoxic effects in lymphocytes, even at high concentrations (i.e. 1264 μM) and these results do not prevent a possible use of julocrotine on antileishmanial chemotherapy, which has been suggested by Guimarães and coworkers.

In order to compare the cytotoxic effects some alkaloids caused on lymphocytes, using similar experiments, some examples are cited. Cavalcanti *et al.* (2008) showed that the ingenamine G, an alkaloid isolated from the species *Pachychalina alcaloidifera*, induced a moderate cytotoxic effect in human lymphocytes after 24 h of treatment, using the MTT test. Chakraborty *et al.* (2004) showed that the extract of total alkaloids isolated from the root of *Tiliacora racemosa* (a medicinal plant used in India) was not cytotoxic to human lymphocytes; however, the extract proved to be cytotoxic to a panel of four cancer cells, namely, HL-60 (acute leukemia), K-562 (chronic leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), and HeLa (cervical carcinoma).

This is the first study dealing with genotoxic effects and ROS production of a glutarimide alkaloid. In the present study, julocrotine induced a genotoxic effect in human lymphocytes only at a high concentration (632 μM). Several authors using the same test have shown genotoxic effects of alkaloids. As an example, Cavalcanti *et al.* (2008) observed that the alkaloid ingenamine G extracted from the *Pachychalina alcaloidifera* significantly

increased the rate of DNA damage in human lymphocytes at concentrations ranging from 15 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The alkaloid vincristine, an anticancer drug with genotoxic effects, induced significant damage to the DNA of human lymphocytes at (WEI *et al.*, 2008). Furthermore, Kleinsasser and coworkers found that the alkaloid myosmine induces significant damage in the DNA of tonsil cells and human lymphocytes cells at concentrations ranging from 10 to 50 mM (KLEINSASSER *et al.*, 2003).

Julocrotine also increased the rate of ROS production. Some alkaloids are also known as oxidative stress inducers. For example, an induction of ROS was observed in human glioblastoma cells (T98G) after treatment with berberine, an alkaloid with antitumor properties (EOM *et al.*, 2010). The alkaloid nicotine is also capable of inducing oxidative stress in cells of the central nervous system (NEWMAN *et al.*, 2002), in cells of the rat brain (BHAGWAT *et al.*, 1998) and in human spermatozoa (ARABI, 2004).

The increased rate of ROS caused by julocrotine is in accordance with the studies of Guimarães and coworkers that suggested that one of the probable mechanisms by which julocrotine induces leishmanicidal effects could be the induction of ROS (GUIMARÃES *et al.*, 2010). It is tempting to assume that the genotoxic effects induced by julocrotine in the present study may be due to the ability of alkaloids to induce ROS that can damage DNA, however, further studies are needed in order to confirm such hypothesis, once other mechanisms must also be considered. Some substances, including alkaloids, have the ability to induce aneugenic effects through its interaction with the microtubule protein (GONZÁLEZ-CID *et al.*, 1999). In addition, pyridoacridine alkaloids, besides inducing ROS, have the ability to intercalate with the DNA and change the topology of this molecule, and change the way DNA metabolism enzymes interact with its substrate, which can inhibit many of the processes of metabolism of this molecule, including synthesis and topoisomerization (MARSHALL; BARROWS, 2004). Further studies are needed to define mechanism of the observed genotoxic effects of julocrotine.

The present study has shown no cytotoxic effect of julocrotine at all tested concentrations, but a clear genotoxic effect on lymphocytic cells, although at a very high concentration (632 μM). These observations reinforce the need of caution before the use of this substance as a therapeutic agent, including its possible use as antileishmanial chemotherapy.

REFERENCES

ABOAGYE, F.; SAM, G. H.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. **Julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton membranaceus***. *Fitoterapia*, v. 71, n. 4, p. 461-462, 2000.

ARABI, M. **Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa**. *Andrologia*, v. 36, n. 5, p. 305-310, 2004.

AYRES, M.; AYRES, J. R. M.; AYRES, D.L.; DOS SANTOS, A.S. **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5th ed. Belém: Sociedade Civil de Mamirauá, 2007.

BARBOSA, P. S.; ABREU, A. S.; BATISTA, E. F.; GUILHON, G. M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, A.C.; SECCO, R. S. **Glutarimide Alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj.** *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, n. 12, p. 887-890, 2007.

Bayor, M.; Gbedema, S. Y.; Annan, K. **The antimicrobial activity of *Croton membranaceus*, a species used in formulations for measles in Ghana.** *Journal of pharmacognosy and phytotherapy*, v. 1, n. 4, p. 47-51, 2009.

BHAGWAT, S. V.; VIJAYASARATHY, C.; RAZA, H.; MULLICK, J.; AVADHANI, N. G. **Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 in-duction and increased oxidative stress in the rat brain.** *Biochemical pharmacology*, v. 56, n. 7, p. 831-839, 1998.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 2 p. 326-342, 2010.

CAVALCANTI, B. C.; SOMBRA, C. M.; OLIVEIRA, J. H.; BERLINCK, R. G.; MORAES, O. M.; PESSOA, C. **Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*.** *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, v. 147, n. 4, p. 409-415, 2008.

CHAKRABORTY, S.; ROY, M.; TARAPHDAR, A. K.; BHATTACHARYA, R. K. **Cytotoxic effect of root extract of *Tiliacora racemosa* and oil of *Semecarpus anacardium* nut in human tumour cells.** *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 8, p. 595-600, 2004.

COELHO-FERREIRA, M. **Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil).** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, n. 1, 159-175, 2009.

CUONG, N. M.; SUNG, T. V.; AHN, B. Z. **Cytotoxic compounds from *Croton cascarilloides*.** *Kor J. Pharmacogn* 33:207-210, 2002.

EOM, K. S.; KIM, H. J.; SO, H. S.; PARK, R.; KIM, T.Y. **Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma 98g cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 10, p. 1644-1649, 2010.

FENECH, M. **The *in vitro* micronucleus technique.** *Mutation Research*, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

GONZÁLEZ-CID, M.; CUELLO, M. T.; LARRIPA, I. **Comparison of the aneugenic effect of vinorelbine and vincristine in cultured human lymphocytes.** *Mutagenesis*, v. 14, n. 1, p. 63-66, 1999.

GUIMARÃES, L. R. C.; RODRIGUES, A. P.; MARINHO, P. S.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S.; SANTOS, L. S.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. **Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*.** *Parasitology research*, v. 107, n. 5, p. 1075-1081, 2010.

KAPINGU, M. C.; MBWAMBO, Z. H.; MOSHI, M. J.; MAGADULA, J. J. **Brine shrimp lethality of a glutarimide alkaloid from *Croton sylvaticus* Hochst.** *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2005.

KLEINSASSER NH, WALLNER BC, HARRÉUS UA, ZWICKENPFLUG W, RICHTER E. **Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells.** *Toxicology*, v. 192, n. 2-3, p. 171-77, 2003.

MARSHALL, K. M.; BARROWS, L. R. **Biological activities of pyridoacridines.** *Natural Product Reports*, v. 21, n. 6, p. 731-751, 2004.

MARSHALL, K. M.; ANDJELIC, C. D.; TASDEMIR, D.; CONCEPCIÓN G. P.; IRELAND, C. M.; BARROWS, R. L. **Deoxyamphimedine, a Pyridoacridine Alkaloid, Damages DNA via the Production of Reactive Oxygen Species.** *Marine Drugs*, v. 7, n. 2, p. 196-209, 2009.

MOREIRA, R. Y. O.; BRASIL, D. S. B.; ALVES, C. N.; GUILHON, G. M.; ARRUDA, M.; MÜLLER, A.; MARINHO, P.; ABREU, A.; SILVA, E.; RUMJANEK, V.; JR, J.; SILVA, A.; SANTOS, R. **Crystal structure and theoretical calculations of Julocrotine, a natural product with antileishmanial activity.** *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 108, n. 3, p. 513-520, 2008.

NAKANO, T.; DJERASSI, C.; CORRAL, R. A.; ORAZI, O. O. **Structure of julocrotine.** *The Journal of Organic Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 1184-1191, 1961.

NEVES FILHO, R. A.; BERNHARD, W.; WESSJOHANN, L. A. **Synthesis of (-)-julocrotine and a diversity oriented Ugi-approach to analogues and probes.** *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 7, p. 1504-1507, 2011.

NEWMAN, M. B.; ARENDASH, G. W.; SHYTLER, R. D.; BICKFORD, P. C.; TIGHE, T.; SANBERG, P. R. **Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS.** *Life Sciences*, v. 71, n. 4, p. 2807-2820, 2002.

OYEYEMI, I. T.; YEKEEN, O. M.; ODUSINA, P. O.; OLOGUN, T. M.; OGBAIDE, O. M.; OLALAYE, O. I.; BAKARE, A. A. **Genotoxicity and antigenotoxicity study of aqueous and hydro-methanol extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrical* L. using animal bioassays.** *Interdisciplinary toxicology*, v. 8, n. 4, p. 184-192, 2015.

PARKS, J.; GYELTSHEN, T.; PRACHYAWARAKORN, V.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. **Glutarimide alkaloids and a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*.** *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 5, p. 992-994, 2010.

SECCO, R. S. **Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia Brasileira: um ensaio taxonômico.** Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, Brasil, 2008.

SILVA, L. L.; JOUSSEF, A.C. **Synthesis of *N*[(3*S*)-2,6-Dioxo-1-(2-phenylethyl)-3-piperidiny]- (2*S*)-2-methylbutanamide ((-)-Julocrotine).** *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 6, p.1531-1534, 2011.

STUART, K. L.; MCNEILL, D.; KUTNEY, J. P.; EIGENDOR, G.; KLEIN, P. K. **Isolation and synthesis of glutamine and glutarimide derivatives from *Croton humilis*.** *Tetrahedron*, v. 29, n. 4, p. 4071-4075, 1973.

SUAREZ, A. I.; BLANCO, Z.; DELLE MONACHE, F.; COMPAGNONE, R. S.; ARVELO, F. **Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus***. *Natural Product Research*, v. 18, n. 5, p. 421-426, 2004.

TENG, B.; ZHENG, J.; HUANG, H.; HUANG, P. **Enantioselective synthesis of glutarimide alkaloids cordiarimides A, B, crotonimides A, B, and julocrotine**. *Chinese Journal of Chemistry*, v. 29, n. 7, p. 1312-1318, 2011.

WEI, J.; YEZHENG, L.; ZHIJIAN, C.; SHIJIE, C.; MEIBIAN, Z.; LIFEN, J.; JIANLIN, L.; JILIANG, H. **Studying the genotoxicity of vincristine on human lymphocytes using comet assay, micronucleus assay and TCR gene mutation test *in vitro***. *Toxicology*, v. 252, n. 1-3, p. 113-117, 2008.

CAPÍTULO 7

ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA DO REMANESCENTE FLORESTAL DO CAMPUS DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (ARARAS, SP)

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 11/08/2021

Steve de Oliveira Costa

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-5642-8650>

Priscila Orlandini

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo
<https://orcid.org/0000-0002-1609-6452>

Letícia Ribes de Lima

Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, Alagoas
<https://orcid.org/0000-0002-9780-9177>

RESUMO: No presente estudo teve-se como objetivo realizar o levantamento florístico e fitossociológico de um fragmento florestal localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras - SP. A amostragem quantitativa foi realizada por meio de sorteio e instalação de dez parcelas de 10 x 10 m². Todos os indivíduos vivos da comunidade vegetal lenhosa, com altura igual ou superior a 1,30 m e diâmetro à altura do peito igual ou superior a 4,8 cm foram identificados até o nível de espécie. Foram amostrados 454 indivíduos, totalizando 77 espécies, distribuídas em 60 gêneros de Angiospermas. A estrutura da comunidade vegetal foi avaliada qualitativamente e a partir dessa análise foram propostas ações

de manejo, como a retirada da espécie exótica *Melia azedarach* L., o enriquecimento florístico, a retirada das lianas hiperabundantes e gramíneas invasoras identificadas na área, visando otimizar o papel deste remanescente florestal na conservação da biodiversidade regional.

PALAVRAS - CHAVE: Floresta estacional semidecídua, inventário florestal, mata atlântica.

STRUCTURE AND FLORISTIC COMPOSITION OF THE REMNANT FOREST FROM AGRARIAN SCIENCES CENTER CAMPUS OF THE FEDERAL UNIVERSITY OF SÃO CARLOS (ARARAS, SP)

ABSTRACT: This study aims at carrying out a floristic and phytosociological survey of a forest fragment located at the Center for Agricultural Sciences of the Federal University of São Carlos, Araras - SP. Quantitative samples were randomly chosen and taken by installing 10 plots, measuring 10 x 10 m each. All organisms from the woody plant community were placed at the plots, measuring 1.30 m or higher and diameter greater than or equal to 4,8 cm at breast high, were identified until species level. There were 454 individuals sampled, totalizing 77 species, distributed in 60 genera of Angiosperms. A qualitative evaluation of the plant community structure of each plot was executed. From its analysis, suggestions were made toward a list of management actions such as, the removal of the exotic species *Melia azedarach* L., floristic enrichment, removal of aggressive vines and invaders grass species identified in the area, hence wishing to optimize the role of the remnant

forest in the conservation of regional biodiversity.

KEYWORDS: Atlantic forest, forest inventory, semi deciduous seasonal forest.

1 | INTRODUÇÃO

O Brasil é, reconhecidamente, um dos países com a maior diversidade biológica, abrigando entre 15% a 20% do número total de espécies descritas no planeta (JOLY *et al.*, 2008). Dos vários ecossistemas existentes no país, as florestas tropicais possuem mundialmente os maiores índices de biodiversidade, o que evidencia a necessidade de ações voltadas para a sua conservação e restauração (MYERS *et al.*, 2000; BRANCALION *et al.*, 2013; FARAH *et al.*, 2014).

Apesar da importância biológica desses ecossistemas, historicamente parte das florestas tropicais foram substituídas por atividades de produção, o que tem elevado as taxas de perda de biodiversidade (VITOUSEK *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2003; BRANCALION *et al.*, 2013).

No estado de São Paulo, este processo de fragmentação dos habitats naturais já atingiu índices alarmantes, pois a cobertura florestal do bioma Mata Atlântica, que chegou a ocupar 82% de seu território, está hoje reduzida a aproximadamente 16,3 % (HIROTA, 2019).

Os poucos remanescentes deste tipo florestal existentes atualmente estão concentrados junto ao litoral na região do Vale do Ribeira, nas escarpas das Serras do Mar e da Mantiqueira e nas planícies litorâneas, regiões essas com baixa aptidão agrícola e difícil acesso (KRONKA *et al.*, 2005).

A região nordeste do estado de São Paulo concentra uma área rica em atividades vinculadas ao setor agropecuário desde o século XIX e, a partir da década de 70, com o Proálcool, a cultura da cana-de-açúcar ganhou grande importância na região (EMBRAPA, 2007). Como seria esperada, a implantação das culturas agrícolas trouxe impactos antrópicos, como a fragmentação e mesmo supressão da vegetação natural (INSTITUTO FLORESTAL, 2010).

Devido ao relevo plano e à fertilidade do solo, as áreas de Floresta Estacional Semidecídua, principal tipo de floresta encontrado na região de Araras - SP, sofreram grandes pressões antrópicas em favor do desenvolvimento da agricultura e da pecuária (KRONKA *et al.*, 2005).

Deste modo, historicamente, a região de Araras foi submetida a sucessivos ciclos econômicos de uso do solo e, atualmente, o pilar de sustentação de sua economia é a agroindústria e o cultivo da cana-de-açúcar, que representam aproximadamente 66% da produção agrícola local (EMBRAPA, 2007).

Neste processo, a vegetação original foi drasticamente reduzida e, atualmente, a cobertura vegetal da região de Araras está restrita a pequenos fragmentos florestais

distantes entre si, como observado também em outras áreas do território paulista (HIROTA, 2019). As margens de diversos rios e cursos d'água localizados nestes remanescentes florestais encontram-se totalmente desprovidas das matas ciliares (GOOGLE EARTH, 2020; GARCIA *et al.*, 2016), o que está em desacordo com a legislação vigente para as Áreas de Preservação Permanente (APPs) (BRASIL, 2012).

Neste contexto, embora altamente isolados e degradados, os fragmentos florestais ainda existentes na região de Araras são os únicos remanescentes da vegetação regional e conhecê-los, em termos de estrutura e composição florística, e do papel que desempenham sobre a conservação da biodiversidade vegetal regional, é uma das únicas formas de conservá-los, manejá-los, recuperá-los e interligá-los na paisagem (IVANAUSKAS *et al.*, 2006).

Compreender a situação atual da cobertura vegetal florestal dessa região e como essas comunidades vegetais estão respondendo, em termos florísticos, frente a pressões antrópicas com alto potencial de degradação como é o cultivo da cana-de-açúcar, é fundamental para a proposição de qualquer ação de conservação e recuperação da vegetação regional (LATAWIEC *et al.*, 2015).

Considerando que a região de Araras encontra-se inserida em um polo produtor agrícola e dada a importância da agricultura na região e seus possíveis impactos ambientais sobre a vegetação remanescente, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura e composição florística do componente lenhoso do remanescente de Floresta Estacional Semidecídua, localizado no interior do *campus* do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar - Araras, SP), a fim de fornecer subsídios para a proposição de ações de manejo e conservação da vegetação regional.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de estudo

O remanescente florestal está localizado no interior do *campus* do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, no município de Araras – SP, entre as coordenadas 22°18'00`` de latitude Sul e 47°23'03`` de longitude Oeste (figura 1). Encontra-se situado adjacente a represa do Ribeirão de Araras, possui 13 hectares e sua vegetação caracteriza-se como Floresta Estacional Semidecídua (VELOSO *et al.*, 1991).



Figura 1. Remanescente florestal localizado no campus do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras – SP (Google Earth 2020).

A Floresta Estacional Semidecídua apresenta dossel irregular, com altura entre 15 e 20 m, e árvores emergentes de 25 a 30 m de altura (VELOSO, 1992; RAMOS *et al.*, 2008). O relevo regional é predominantemente suave ondulado ou mesmo aplainado nos aluviões, caracterizados como áreas de depressão (OLIVEIRA *et al.*, 1982). A região situa-se na Depressão Periférica Paulista e a altitude média do município de Araras é de 620 m (KRONKA *et al.*, 2005). O material de origem é resultante do intemperismo de arenitos, argilitos, siltitos, basaltos e diabásios, sendo comum a ocorrência de espessos depósitos modernos resultantes do retrabalhamento destes materiais (ESPÍNDOLA & GARCÍA, 1978).

Segundo o sistema de classificação climática de Köppen, a região de Araras apresenta clima predominante do tipo Cwa, mesotérmico, com verões quentes e úmidos e invernos secos, com temperatura média anual entre 18,8° e 29,9° C e pluviosidade média inferior a 2.000 mm/ano (CEPAGRI, 2009).

2.2 Delineamento amostral

A amostragem quantitativa da comunidade vegetal lenhosa foi realizada por meio da instalação de dez parcelas de 10 x 10 m (100 m²), totalizando 1000 m². Para a instalação dessas unidades amostrais foi feita, primeiramente, uma divisão da imagem aérea do fragmento florestal, obtida no site institucional *Google Earth*, em quadrados que simulavam as parcelas reais (GOOGLE EARTH, 2020). Tais quadrados foram então georreferenciados e posteriormente sorteados.

Deste modo, no campo foram localizados os pontos sorteados, com o auxílio do sistema de georreferenciamento de posicionamento global, seguido da instalação das

parcelas. Segundo Rodrigues (1988), o método de parcelas aleatórias para o estudo estrutural da comunidade arbustivo-arbórea é vantajoso, por representar as maiores variações nos gradientes presumidos para a comunidade vegetal lenhosa do fragmento e por fornecer subsídios para o entendimento da distribuição espacial das espécies.

Em cada parcela, foram coletados e identificados os indivíduos arbustivo-arbóreos com altura igual ou superior a 1,30 m e diâmetro à altura do peito igual ou superior a 4,8 cm (DAP > 4,8 cm) (JOLY *et al.*, 2012).

O material botânico coletado foi herborizado e identificado, com o uso de literatura especializada, comparação com as exsicatas depositadas no Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESA) e consulta a especialistas (FIDALGO & BONONI, 1989), sendo este material botânico posteriormente depositado no Herbário ESA, da Universidade de São Paulo.

Nas checagens de campo, dados como altura e estrutura do dossel, presença de epífitas, espécies exóticas, lianas e gramíneas hiperabundantes em desequilíbrio, foram registrados para a avaliação do estado de degradação do fragmento florestal (BRANCALION *et al.*, 2015).

A cobertura de gramíneas exóticas invasoras foi calculada pela projeção vertical da parte aérea destas espécies na superfície do solo. Assim, em cada parcela instalada, o valor de porcentagem de cobertura foi quantificado numericamente, quadriculando-se cada parcela em 10 unidades amostrais, seguida da contagem do número de indivíduos na área (ISERNHAGEN *et al.*, 2009).

As espécies amostradas foram agrupadas segundo os critérios de classificação sucessional comumente adotados, no caso, pioneiras, secundárias iniciais, secundárias tardias e climáticas (BRANCALION *et al.*, 2015).

2.3 Análise estrutural e florística

Os descritores quantitativos de densidade, dominância e frequência, foram calculados conforme Müeller-Dombois & Ellenberg (1974), bem como os índices de valor de cobertura e de importância. Foram obtidos também os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H'), na base logarítmica natural, e o de equabilidade (J) de Pielou (1975). Para análise dos parâmetros fitossociológicos foi utilizado o software FITOPAC II (SHEPHERD, 1996).

A composição estrutural e florística da área de estudo foi comparada com os dados obtidos em outros levantamentos florísticos em áreas de remanescentes de Floresta Estacional Semidecídua (GOMIDE *et al.*, 2006; HIGUCHI *et al.*, 2006; LEITE & RODRIGUES, 2008; RAMOS *et al.*, 2008).

Nas comparações de estrutura e composição florística foram eliminados os indivíduos não identificados até o nível de espécie. A grafia dos nomes das espécies, bem como as sinonímias foram verificadas de acordo com a base de dados Tropicos v.3.2.3. (<https://www.tropicos.org/home>).

Para a definição do estado de degradação do fragmento florestal, foram utilizados como critérios de avaliação o número de estratos da cobertura florestal, entre eles, o sub-bosque (formado por indivíduos com altura inferior a 3 metros de altura); o sub-dossel (3 a 5 metros); o dossel (formando o estrato florestal contínuo); e por árvores emergentes (representadas por indivíduos com altura superior ao dossel) (ISERNHAGEN *et al.*, 2009).

Além da identificação nas checagens de campo de lianas em desequilíbrio no fragmento florestal, como indicadoras da intensidade de degradação da área de estudo (JOLY *et al.*, 2012). Os estratos do remanescente florestal foram caracterizados pela altura da copa dos indivíduos existentes nos diversos níveis de altura da cobertura florestal (BRANCALION *et al.*, 2015).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na área de estudo foram identificadas 77 espécies arbustivo-arbóreas fanerogâmicas, sendo uma delas exótica (*Melia azedarach* L. - Meliaceae), distribuídas em 60 gêneros, pertencentes a 32 famílias botânicas (tabela 1). Apenas dois indivíduos não foram identificados até o nível de espécie, devido à ausência de material reprodutivo no período de coleta, sendo assim desconsiderados na comparação florística, bem como nas análises dos parâmetros fitossociológicos.

Família/Nome Científico	Nome popular	G.E.
ACANTHACEAE		
<i>Justicia brasiliiana</i> Roth	Jacobina-vermelha	St-sb
ANACARDIACEAE		
<i>Astronium graveolens</i> Jacq.	Guaritá	St
ANNONACEAE		
<i>Annona cacans</i> Warm.	Araticum	Si
<i>Gutteria australis</i> A.St.-Hill.	Araticum	St
ARECACEAE		
<i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham.) Glassm.	Jerivá	Si
ASTERACEAE		
<i>Piptocarpha quadrangularis</i> (Vell.) Baker		P
<i>Lessingianthus macrophyllus</i> (Less.) H. Rob.		P
BIGNONIACEAE		
<i>Jacaranda macrantha</i> Cham.	Caroba	P
BORAGINACEAE		

<i>Cordia ecalyculata</i> Vell.	Café-de-bugre	St
CANNABACEAE		
<i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sarg.	Gradiúva	P
<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	Candiúva	P
CARDIOPTERIDACEAE		
<i>Citronella paniculata</i> (Mart.) R.A. Howard	Murchão	St
EUPHORBIACEAE		
<i>Actinostemon conceptionis</i> (Chodat & Hassl.) Hochr.	Folha-fedorenta	St-sb
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Capixingui	P
<i>Croton piptocalyx</i> Müll.Arg.	Caixeta-mole	P
<i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.	Leiteiro-branco	St-sb
FABACEAE		
Caesalpinioideae		
<i>Holocalyx balansae</i> Micheli	Alecrim	C
<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell.) Blake	Guapuruvu	P
Faboideae		
<i>Centrolobium tomentosum</i> Guillemin ex Benth.	Araribá	Si
<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel	Sapuva	Si
<i>Machaerium brasiliense</i> Vogel.	Jacarandá-branco	Si
Mimosoideae		
<i>Senegalia tenuifolia</i> (L.) Britton & Rose	Arranha-gato	Si
<i>Inga marginata</i> Willd.	Ingá-de-folha-lisa	P
<i>Inga striata</i> Benth.	Ingá-de-folha-peluda	Si
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F. Macbr.	Pau-jacaré	Si
LAURACEAE		
<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez	Canelinha	Si
<i>Ocotea dyospirifolia</i> (Meisn.) Mez	Canela-pimenta	St
<i>Nectandra lanceolata</i> Nees	Canelão-amarelo	St
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Canela-louro	Si
LECYTHIDACEAE		
<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze	Jequitibá-branco	St-C
<i>Cariniana legalis</i> (Mart.) Kuntze	Jequitibá-rosa	St-C
MALVACEAE		
<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	Paineira	St
<i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc.	Açoita-cavalo	Si
MELASTOMATACEAE		

<i>Miconia hymenonervia</i> (Raddi) Cogn.		Si
MELIACEAE		
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Canjerana	St
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Cedro	St
<i>Guarea kunthiana</i> A. Juss.	Marinheiro	St
<i>Melia azedarach</i> L.	Santa-bárbara	nc
<i>Trichilia clausenii</i> C. DC.	Catiguá-vermelho	St-sb
<i>Trichilia elegans</i> A. Juss.	Catiguazinho	St-sb
<i>Trichilia pallida</i> Sw.	Baga-de-morcego	St-sb
MONIMIACEAE		
<i>Mollinedia schottiana</i> (Spreng.) Perkins	Pau-de-espeto	St-sb
MORACEAE		
<i>Ficus glabra</i> Vell.	Figueira-branca	Si
MYRTACEAE		
<i>Eugenia florida</i> DC.	Pitanga-preta	St-sb
<i>Eugenia tinguyensis</i> Cambess.	Araçarana	St-sb
<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	Lanceira	St-sb
<i>Myrciaria floribunda</i> (H. West. ex Willd.) O.Berg.	Cambuí vermelho	St-sb
NYCTAGINACEAE		
<i>Guapira hirsuta</i> (Choisy) Lundell	Flor-roxa	Si
<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	Maria-mole	Si
PHYLLANTACEAE		
<i>Savia dictyocarpa</i> Müll.Arg.	Guaraiúva	C
PIPERACEAE		
<i>Piper aduncum</i> L.	Erva-de-jaboti	St-sb
<i>Piper amalago</i> L.	Falso-jaborandi	P
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	Falso-jaborandi	St
<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.	Pimenta	St
<i>Piper glabratum</i> Kunth.		St-sb
PROTEACEAE		
<i>Roupala montana</i> Aubl.	Carne-de-vaca	nc
ROSACEAE		
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	Coração-de-negro	Si
RUBIACEAE		
<i>Chomelia parvifolia</i> (Standl.) Govaerts		St-sb
<i>Ixora venulosa</i> Benth.	Ixora	St-sb
<i>Psychotria appendiculata</i> Müll.Arg.		St-sb
RUTACEAE		

<i>Esenbeckia febrifuga</i> (A. St.-Hil.) A. Juss. Ex Mart.	Mamoninha	St-sb
<i>Galipea jasminiflora</i> (A.St.-Hil.) Engl.	Mamoninha	St-sb
<i>Zanthoxylum acuminatum</i> (Sw.) Sw.	Mamicão	Si
<i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) Sarg.	Arruda-brava	Si
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Mamica-de-porca	Si
SALICACEAE		
<i>Casearia gossypiosperma</i> Briq.	Pau-de-espeto	Si
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Guaçatonga	Si
SAPINDACEAE		
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk.	Baga-de-macaco	Si
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Camboatã	Si
<i>Diatenopteryx sorbifolia</i> Radlk.	Maria-preta	St
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Camboatã-branco	Si
SAPOTACEAE		
<i>Chrysophyllum gonocarpum</i> (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl.	Guatambu-de-leite	St
SOLANACEAE		
<i>Cestrum schlechtendalii</i> G. Don		P
<i>Solanum argenteum</i> Dunal	Joá-manso	Si
URTICACEAE		
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Embaúba-branca	P
<i>Urera baccifera</i> (L.) Guadich. ex Wedd.	Urtigão	P
VIOLACEAE		
<i>Hybanthus atropurpureus</i> (A. St.-Hil.) Taub.	Apanha-saia	St-sb

Tabela 1. Lista das espécies identificadas nas dez parcelas instaladas no fragmento florestal analisado (G.E. = Grupo Ecológico; P = pioneira; Si = secundária inicial; St = secundária tardia; C = climácica; sb = sub-bosque; nc = não classificada).

Das famílias botânicas identificadas na área, a maior riqueza foi observada em Fabaceae, sendo esta representada por nove táxons, o que representa 11,68% das espécies amostradas, seguida de Meliaceae, que apresentou sete espécies, ou seja, 9,09% do total de espécies. As famílias Piperaceae e Rutaceae contribuíram cada uma com 6,49% das espécies da área, ambas representadas por cinco táxons. No total, essas quatro famílias contribuíram com 33,75% de todas as espécies amostradas no fragmento florestal (figura 2).

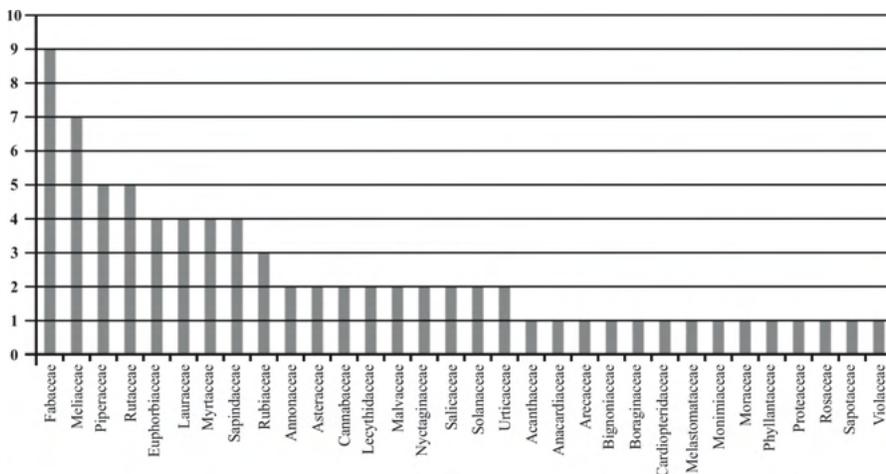


Figura 2. Riqueza de espécies por família botânica amostradas no fragmento de Floresta Estacional Semidecídua localizado na Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras - SP.

Myrciaria floribunda foi a espécie com a maior densidade relativa (DR) de indivíduos na área (17,1/ha), seguida por *Esenbeckia febrifuga* (6,17/ha), *Piper amalago* (5,95/ha), *Piper glabratum* (5,73/ha) e *Actinostemon conceptionis* (5,51/ha) (tabela 2). Estas cinco espécies foram responsáveis por 40,46% da densidade relativa total.

As espécies com maior dominância relativa (DoR) foram *Piper amalago* (13,61 m²/ha), *Allophylus edulis* (9,59 m²/ha), *Centrolobium tomentosum* (7,28 m²/ha), *Croton piptocalyx* (5,61 m²/ha) e *Croton floribundus* (5,56 m²/ha), sendo responsáveis por 41,65% da dominância relativa total.

Espécie	NI	DR	DoR	FR	IVI	IVC
<i>Piper amalago</i>	27	5,95	13,61	5,00	24,6	19,56
<i>Myrciaria floribunda</i>	78	17,18	1,80	5,56	24,5	18,98
<i>Allophylus edulis</i>	15	3,30	9,59	2,22	15,1	12,9
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	28	6,17	2,85	4,44	13,5	9,01
<i>Croton floribundus</i>	18	3,96	5,56	3,33	12,9	9,52
<i>Centrolobium tomentosum</i>	8	1,76	7,28	3,33	12,4	9,03
<i>Piper glabratum</i>	26	5,73	4,21	2,22	12,2	9,93
<i>Actinostemon conceptionis</i>	25	5,51	0,94	2,22	8,67	6,45
<i>Croton piptocalyx</i>	10	2,20	5,61	0,56	8,37	7,81
<i>Galipea jasminiflora</i>	23	5,07	2,35	0,56	7,97	7,41
<i>Cupania vernalis</i>	16	3,52	0,48	3,33	7,34	4,00

<i>Machaerium stipitatum</i>	3	0,66	4,13	1,67	6,46	4,78
<i>Piper gaudichaudianum</i>	2	0,44	4,56	0,56	5,56	5,00
<i>Zanthoxylum acuminatum</i>	3	0,66	3,74	1,11	5,51	4,39
<i>Cecropia pachystachya</i>	5	1,10	3,10	1,11	5,31	4,19
<i>Cariniana estrellensis</i>	7	1,54	1,38	2,22	5,15	2,92
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	5	1,10	0,96	2,78	4,84	2,06
<i>Guarea kunthiana</i>	4	0,88	1,31	2,22	4,42	2,19
<i>Piper aduncum</i>	7	1,54	0,10	2,78	4,42	1,64
<i>Sebastiania brasiliensis</i>	8	1,76	1,50	1,11	4,38	3,26
<i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	6	1,32	0,65	2,22	4,2	1,97
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	4	0,88	1,55	1,67	4,1	2,43
<i>Holocalyx balansae</i>	3	0,66	2,22	1,11	3,99	2,87
<i>Hybanthus atropurpureus</i>	10	2,20	0,09	1,67	3,95	2,28
<i>Eugenia florida</i>	5	1,10	0,47	2,22	3,79	1,57
<i>Guapira hirsuta</i>	3	0,66	1,31	1,67	3,63	1,96
<i>Jacaranda macrantha</i>	1	0,22	2,76	0,56	3,54	2,98
<i>Solanum argenteum</i>	5	1,10	0,22	2,22	3,54	1,32
<i>Casearia sylvestris</i>	4	0,88	0,25	2,22	3,35	1,13
<i>Trichilia elegans</i>	6	1,32	0,12	1,67	3,11	1,44
<i>Nectandra lanceolata</i>	2	0,44	1,43	1,11	2,99	1,87
<i>Trema micrantha</i>	2	0,44	1,93	0,56	2,93	2,37
<i>Ixora venulosa</i>	7	1,54	0,25	1,11	2,9	1,79
<i>Schizolobium parahyba</i>	1	0,22	2,10	0,56	2,88	2,32
<i>Myrcia splendens</i>	3	0,66	0,42	1,67	2,75	1,08
<i>Ficus glabra</i>	3	0,66	0,36	1,67	2,69	1,02
<i>Nectandra megapotamica</i>	3	0,66	0,14	1,67	2,46	0,80
<i>Senegalia tenuifolia</i>	2	0,44	1,35	0,56	2,35	1,79
<i>Cedrela fissilis</i>	2	0,44	0,69	1,11	2,24	1,13
<i>Piper arboreum</i>	5	1,10	0,43	0,56	2,09	1,53
<i>Matayba elaeagnoides</i>	4	0,88	0,06	1,11	2,05	0,94
<i>Trichilia pallida</i>	2	0,44	0,43	1,11	1,98	0,87
<i>Melia azedarach</i>	3	0,66	0,10	1,11	1,87	0,76
<i>Cabralea canjerana</i>	3	0,66	0,64	0,56	1,86	1,3
<i>Cordia ecalyculata</i>	2	0,44	0,17	1,11	1,72	0,61
<i>Urera baccifera</i>	2	0,44	0,12	1,11	1,67	0,56

<i>Guatteria australis</i>	2	0,44	0,64	0,56	1,63	1,08
<i>Miconia hymenonervia</i>	2	0,44	0,02	1,11	1,58	0,46
<i>Luehea divaricata</i>	1	0,22	0,77	0,56	1,55	0,99
<i>Savia dictyocarpa</i>	1	0,22	0,64	0,56	1,42	0,87
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	1	0,22	0,63	0,56	1,4	0,85
<i>Ceiba speciosa</i>	1	0,22	0,38	0,56	1,16	0,60
<i>Citronella paniculata</i>	1	0,22	0,34	0,56	1,11	0,56
<i>Trichilia clausenii</i>	2	0,44	0,04	0,56	1,04	0,48
<i>Ocotea dyospirifolia</i>	1	0,22	0,25	0,56	1,02	0,47
<i>Piptocarpha quadrangularis</i>	2	0,44	0,02	0,56	1,02	0,46
<i>Justicia brasiliana</i>	2	0,44	0,01	0,56	1	0,45
<i>Psychotria appendiculata</i>	2	0,44	0,01	0,56	1	0,45
<i>Ocotea corymbosa</i>	1	0,22	0,20	0,56	0,98	0,42
<i>Mollinedia schottiana</i>	1	0,22	0,12	0,56	0,9	0,34
<i>Inga striata</i>	1	0,22	0,11	0,56	0,88	0,33
<i>Roupala montana</i>	1	0,22	0,10	0,56	0,87	0,32
<i>Lessingianthus macrophyllus</i>	1	0,22	0,09	0,56	0,87	0,31
<i>Inga marginata</i>	1	0,22	0,09	0,56	0,86	0,30
<i>Prunus myrtifolia</i>	1	0,22	0,03	0,56	0,81	0,25
<i>Annona cacans</i>	1	0,22	0,03	0,56	0,81	0,25
<i>Chomelia parvifolia</i>	1	0,22	0,03	0,56	0,81	0,25
<i>Diatenopteryx sorbifolia</i>	1	0,22	0,03	0,56	0,81	0,25
<i>Guapira opposita</i>	1	0,22	0,02	0,56	0,80	0,24
<i>Machaerium brasiliense</i>	1	0,22	0,02	0,56	0,80	0,24
<i>Eugenia tinguyensis</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,79	0,23
<i>Astronium graveolens</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,79	0,23
<i>Celtis iguanae</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,79	0,23
<i>Zanthoxylum fagara</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,79	0,23
<i>Casearia gossypiosperma</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,79	0,23
<i>Cestrum schlechtendalii</i>	1	0,22	0,01	0,56	0,78	0,22
<i>Cariniana legalis</i>	1	0,22	0,00	0,56	0,78	0,22
Total	454	98,63	100	100	298,87	198,53

Tabela 2. Parâmetros fitossociológicos para cada espécie do remanescente florestal do CCA-UFSCar, Araras – SP. Legenda: NI - número de indivíduos, DR - densidade relativa (%), DoR - dominância relativa (%), FR - frequência relativa (%), IVI - índice de valor de importância, IVC - índice de valor de cobertura. As espécies estão ordenadas por valor decrescente de IVI.

Dos 454 indivíduos amostrados, as 11 espécies mais abundantes foram: *Myrciaria floribunda* (78 indivíduos), *Esenbeckia febrifuga* (28 indivíduos), *Piper amalago* (27 indivíduos), *Piper glabratum* (26 indivíduos), *Actinostemon conceptionis* (25 indivíduos), *Galipea jasminiflora* (23 indivíduos), *Croton floribundus* (18 indivíduos), *Cupania vernalis* (16 indivíduos), *Allophylus edulis* (15 indivíduos), *Croton piptocalyx* (10 indivíduos) e *Hybanthus atropurpureus* (10 indivíduos).

O dossel do fragmento florestal analisado é descontínuo, com altura entre três e seis metros (tabela 3). Em todas as parcelas analisadas observou-se a ocorrência de lianas hiperabundantes e, muitas vezes, de gramíneas exóticas invasoras e/ou adensamentos de bambus.

P	Nº de estratos	Altura do dossel (m)	Continuidade	Presença de lianas em desequilíbrio	Invasão de gramíneas exóticas (%)	Presença de espécies exóticas	Proposta de manejo	Sistema de restauração
1	3	4	Descontínuo	Sim	0	<i>Melia azedarach</i>	Retirada da espécie exótica e lianas em desequilíbrio	Condução da regeneração natural
2	3	4	Descontínuo	Sim	0	-	Retirada de lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
3	2	3	Descontínuo	Sim	40%	Bambus	Retirada de bambus e lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
4	2	5	Descontínuo	Sim	30%	Bambus	Retirada de bambus e lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
5	3	6	Descontínuo	Sim	0	<i>Melia azedarach</i>	Retirada da espécie exótica e lianas em desequilíbrio	Condução da regeneração natural
6	3	5	Descontínuo	Sim	0	-	Retirada de lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
7	3	4	Descontínuo	Sim	0	-	Retirada de lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
8	2	6	Descontínuo	Sim	70%	Bambus	Retirada de bambus e lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
9	3	5	Descontínuo	Sim	0	-	Retirada de lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento

10	3	6	Descontínuo	Sim	0	-	Retirada de lianas em desequilíbrio	Adensamento e enriquecimento
----	---	---	-------------	-----	---	---	-------------------------------------	------------------------------

Tabela 3. Dados qualitativos da vegetação encontrada em cada uma das parcelas instaladas no remanescente florestal localizado no Centro de Ciências Agrárias da UFSCar e método de restauração proposto. Legenda: P = parcela.

Excetuando-se *P. glabratum*, *G. jasminiflora*, *C. piptocalyx* e *H. atropurpureus*, as espécies mais frequentes na área de estudo são também as espécies predominantes em outras áreas de Floresta Estacional Semidecídua no estado de São Paulo, como a existente na Estação Ecológica de Caetetus (2.178 ha), localizada nos municípios de Gália e Alvinlândia (RAMOS *et al.*, 2008). Quase a metade das espécies amostradas (49,3%) são pioneiras ou secundárias iniciais, enquanto 45,4% são espécies secundárias tardias. Apenas duas espécies (2,6%) pertencem ao estágio climácico de sucessão. Essa situação evidencia que o atual estágio sucessional do remanescente florestal estudado não é climácico.

O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') obtido para a área foi de 3,5 nats/indivíduo, o que é compatível com a variação encontrada em estudos de estrutura e composição florística realizados em remanescentes de Floresta Estacional Semidecídua no interior do estado de São Paulo, visto que em trabalhos realizados por Martins (1991), Ivanauskas *et al.* (1999) e Leite & Rodrigues (2008) este índice de diversidade variou de 3,16 a 4,01 nats/indivíduo.

Souza & Lorenzi (2008) evidenciam que indivíduos da família Piperaceae são comuns no sub-bosque destes remanescentes florestais, principalmente nos ecossistemas em situação de degradação. Deste modo, os altos índices de valor de cobertura (9%) e de importância (16,9%) apresentados pelos indivíduos dessa única família botânica indicam que o fragmento florestal estudado apresenta indícios de degradação florestal.

O valor obtido para a equabilidade (J) foi de 0,82. Esse valor é considerado elevado quando comparado aos valores de equabilidade obtidos em outros trabalhos de composição florística realizados em remanescentes de Floresta Estacional Semidecídua, situados entre 0,62 a 0,87 (IVANAUSKAS *et al.*, 1999; GOMIDE *et al.*, 2006; HIGUCHI *et al.*, 2006).

A área de estudo analisada consiste em uma única clareira, enquanto os outros estudos analisaram tanto áreas em floresta fechada quanto clareiras pequenas, isto é, tiveram chance de analisar estruturas diferentes. Assim, esse alto valor para a equabilidade obtido se justifica devido a pequena área deste remanescente florestal quando comparada aos levantamentos florísticos dos outros estudos, visto que o fragmento florestal analisado apresenta uma composição florística homogênea.

Entre as espécies que apresentaram os maiores índices de valor de cobertura estão *Piper amalago* (IVC=19,56), *Myrciaria floribunda* (IVC=18,98) e *Allophylus edulis* (IVC=12,9). Tais espécies somadas perfazem 25,72% do IVC total e são as mesmas que

ocuparam as primeiras posições no índice de valor de importância (IVI), devido ao grande número de indivíduos, no caso, *Piper amalago* (27 indivíduos), *Myrciaria floribunda* (76 indivíduos) e *Allophylus edulis* (15 indivíduos).

Vale ressaltar que, quanto ao grupo ecológico, cada uma dessas três espécies apresenta uma classificação. A primeira é uma espécie tipicamente pioneira, ocorrendo, especialmente, em regiões de clareira. *Myrciaria floribunda* é uma espécie secundária tardia de sub-bosque, o que demonstra que parte da área se encontra em estágio avançado de recuperação, ao passo que a terceira é uma espécie secundária inicial. Deste modo, pode-se concluir que o fragmento florestal se apresenta bastante heterogêneo quanto à sua conservação, com áreas em estágio mais inicial de sucessão ecológica e outras, mais tardio.

A dominância de poucos táxons é um forte indício de perturbações no ambiente, visto também que entre as 32 famílias botânicas identificadas na área de estudo, quase a metade (43,75%) foram representadas por um único indivíduo, evidenciando, mais uma vez, que o fragmento florestal apresenta-se em estágio de sucessão não-climático (BRANCALION *et al.*, 2015).

Comparando-se os resultados aqui obtidos com os de outros trabalhos, realizados também em remanescentes de Floresta Estacional Semidecídua, pode-se perceber que floristicamente, as posições iniciais das famílias mais representativas são ocupadas por representantes das mesmas famílias botânicas, como Fabaceae, Rubiaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae e Annonaceae, entretanto, a posição desses grupos é variável conforme a área de estudo.

No trabalho de Meira-Neto & Martins (2002), realizado em um fragmento de 17 hectares no município de Viçosa (MG), Rubiaceae foi identificada como a segunda família botânica mais representativa, enquanto que em outro trabalho realizado neste mesmo município, mas em um fragmento de 32 hectares (SILVA *et al.*, 2003), Euphorbiaceae foi a família que ocupou a segunda posição.

Apesar de, no presente trabalho, Fabaceae também ser a família mais representativa floristicamente, com nove espécies ocorrentes na área, a segunda posição foi ocupada por sete espécimes de Meliaceae, o que não é muito comum, já que nos trabalhos aqui analisados essa família aparece ocupando posições mais distantes, como a sexta ou a sétima (MEIRA-NETO & MARTINS, 2002; SILVA *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2008).

Outra característica observada foi a importância da família Piperaceae que, na área de estudo, contribuiu com cinco espécies, ocupando a terceira posição em termos de representatividade, fato esse pouco frequente. A identificação de uma elevada riqueza e abundância de indivíduos de diferentes espécies de Piperaceae no remanescente florestal estudado pode estar relacionada à presença de um dossel aberto e descontínuo, já que esses táxons estão frequentemente associados a locais com maior incidência luminosa (SOUZA & LORENZI, 2008).

Algumas espécies presentes no fragmento florestal estudado evidenciam a importância da sua preservação, entre elas, *Cariniana legalis* (Lecythidaceae), o jequitibá-rosa, que se encontra em um nível vulnerável de ameaça de extinção (IUCN, 2020a), e *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae), que se encontra ameaçada de extinção, principalmente devido à intensa utilização madeireira (IUCN, 2020b). Merece ainda destaque *Cedrela fissilis* (Meliaceae), que também se encontra ameaçada de extinção (SMA, 2004).

Para otimizar o papel de conservação da biodiversidade regional desempenhado pelo fragmento florestal estudado, uma das primeiras etapas do manejo recomendado é a retirada dos fatores de degradação identificados na área de estudo, dentre os quais se destacam as lianas em desequilíbrio, que apresentam crescimento descontrolado, as touceiras de bambus que foram observadas em campo (VIANA & PINHEIRO, 1998) e a espécie exótica invasora *Melia azedarach* L.

(ISERNHAGEN *et al.*, 2009).

A partir da análise da estrutura e composição florística, junto à checagem de campo ao longo das visitas, sugere-se ainda o isolamento dos fatores causadores de degradação, entre eles, a eliminação da prática de queimadas na área e a construção de um aceiro com largura mínima de 6 metros no entorno do remanescente florestal (BRANCALION *et al.*, 2015).

No caso da área de cultivo dos canaviais, propõe-se a colheita manual da cana-de-açúcar em uma faixa no entorno do remanescente florestal e o controle dos processos erosivos, que podem resultar no assoreamento do curso d'água adjacente ao fragmento florestal estudado (AMADOR & VIANA, 1998; FARAH *et al.*, 2014).

Sugere-se ainda o adensamento florístico na área, por meio do aumento no número de indivíduos de espécies nativas regionais nos trechos não reocupados naturalmente pela regeneração natural (BRANCALION *et al.*, 2012).

Um plantio na área de borda do fragmento florestal também é recomendado, com espécies do estágio inicial de sucessão ecológica, com o objetivo de controlar a expansão de espécies exóticas invasoras, como a *Melia azedarach* L. identificada na área, o que favorece ainda o desenvolvimento das espécies finais por meio do sombreamento (RODRIGUES *et al.*, 2007).

A presença de indivíduos da espécie exótica invasora *Melia azedarach* L. em remanescentes florestais inibe o desenvolvimento da regeneração de espécies nativas, pois esta espécie possui alta capacidade de se reproduzir, perpetuando-se e ocupando completamente a área (ISERNHAGEN *et al.*, 2009).

O enriquecimento florístico também é proposto, com alta diversidade de formas vegetais da Floresta Estacional Semidecídua, podendo contemplar o resgate da diversidade genética (RODRIGUES & GANDOLFI, 2004; ESTAVILLO *et al.*, 2013; BRANCALION *et al.*, 2013).

4 | CONCLUSÕES

O fragmento florestal localizado no *campus* do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos apresenta uma composição florística proveniente prioritariamente de espécies ocorrentes em Floresta Estacional Semidecídua.

O remanescente florestal estudado apresenta menor número de estratos em relação às formações mais conservadas de Floresta Estacional Semidecídua, além de baixa estatura dos indivíduos arbóreos, dossel descontínuo, frequente desequilíbrio de lianas e presença de gramíneas exóticas.

Apesar do tamanho reduzido e do cultivo de cana-de-açúcar em seu entorno, o fragmento florestal objeto deste estudo é um dos poucos remanescentes da vegetação nativa presente na região de Araras e possui um banco genético único e importante regionalmente.

Deve-se, assim, dar especial atenção aos fatores de degradação atuantes no remanescente florestal aqui estudado, tais como a superabundância de lianas em desequilíbrio, a presença de indivíduos da espécie exótica *Melia azedarach* L. na área e a frequência de queimadas no local, assim como em seu entorno. Para que este fragmento florestal venha a desempenhar, de maneira mais eficiente, seu papel de conservação da biodiversidade regional, em especial, no tocante à flora e seus serviços ambientais, como a proteção do solo e da água.

Ressaltando a importância da conservação dos fragmentos florestais de tamanho reduzido enquanto representantes da flora regional, para proteger de forma significativa a variabilidade florística da região, sugere-se que as ações relacionadas ao plantio de espécies e recuperação dos fragmentos florestais na região de Araras devem ser embasadas, entre outras medidas, na lista de espécies obtida neste trabalho, assim como nas recomendações da Regulamentação da SMA n. 08/2008, no que diz respeito ao número de espécies necessárias e número de indivíduos de cada espécie para a conservação e restauração do remanescente florestal estudado (SMA, 2008).

O conhecimento das espécies fanerogâmicas ocorrentes no fragmento florestal objeto deste estudo forneceu subsídios para embasar a proposição de ações de manejo e conservação desse remanescente florestal, bem como de outros remanescentes da vegetação regional e nas ações relacionadas à determinação de áreas prioritárias para a restauração e conservação da biodiversidade, visando à manutenção da biodiversidade regional.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica concedida ao primeiro autor (Processo nº 139442). Aos professores Ricardo Ribeiro Rodrigues e Vinicius Castro Souza, da Universidade de São

Paulo, pelo auxílio na identificação do material botânico.

REFERÊNCIAS

AMADOR, D.B. & VIANA, V.M. Sistemas agroflorestais para recuperação de fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF 12**: 105-110, 1998.

BRANCALION, P.H.S.; GANDOLFI, S. & RODRIGUES, R.R. **Restauração Florestal**. Oficina de Textos, São Paulo, 2015.

BRANCALION, P.H.S.; LIMA, L.R. & RODRIGUES, R.R. Restauração ecológica como estratégia de resgate e conservação da biodiversidade em paisagens antrópicas tropicais. *In*: C.A. PERES, J. BARLOW, T.A. GARDNER & I.C.G. VIEIRA (orgs.) **Conservação da Biodiversidade em paisagens antropizadas do Brasil**, UFPR, Curitiba, pp. 565-587, 2013.

BRANCALION, P.H.S.; VIANI, R.A.G.; RODRIGUES, R.R. & CÉSAR, R.G. Estratégias para auxiliar na conservação de florestas tropicais secundárias inseridas em paisagens alteradas. **Boletim Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais 7**: 219-234, 2012.

BRASIL. **Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012**. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. 2012. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm (acesso em 10-II-2020).

CEPAGRI (**Centro de Pesquisas Meteorológicas e climáticas aplicadas a agricultura**), 2009. Disponível em <http://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html> (acesso em 11-II-2020).

EMBRAPA (**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**), 2007. Disponível em <http://www.nordestesp.cnpm.embrapa.br/conteudo/AreasAntropicas.html> (acesso em 28-IV-2020).

ESPÍNDOLA, C.R. & GARCÍA, G.J. Interpretação fotográfica de redes de drenagem em diferentes categorias de solos. **Notícia Geomorfológica 18**: 71-94, 1978.

ESTAVILLO, C.; PARDINI, R. & ROCHA, P.L.B. Forest Loss and the Biodiversity Threshold: An Evaluation Considering Species Habitat Requirements and the Use of Matrix Habitats. **Plos One 8**: 1-10, 2013.

FARAH, F.T.; RODRIGUES, R.R.; SANTOS, F.A.M.; TAMASHIRO, J.Y.; SHEPHERD, G.J.; SIQUEIRA, T.; BATISTA, J.L.F. & MANLY, B.J.F. Forest destructuring as revealed by the temporal dynamics of fundamental species – Case study of Santa Genebra Forest in Brazil. **Ecological Indicators 37**: 40–44, 2014.

FIDALGO, O. & BONONI, V.L.R. (coords.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, 1989.

GARCIA, L.C.; ELLOVITCH, M.F.; RODRIGUES, R.R.; BRANCALION, P.H.S.; MATSUMOTO, M.H.; GARCIA, F.C.; LOYOLA, R. & LEWINSOHN, T.M. **Análise científica e jurídica das mudanças no Código Florestal, a recente Lei de Proteção da Vegetação Nativa**. ABECO/UFMS. Rio de Janeiro, 2016.

GOMIDE, L.R.; SCOLFORO, J.R.S. & OLIVEIRA, A.D. Análise da diversidade e similaridade de fragmentos florestais nativos na bacia do rio São Francisco, em Minas Gerais. **Ciência Florestal** 16: 127-144, 2006.

GOOGLE EARTH. **Mapa do remanescente florestal localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP**. Disponível em <https://www.google.com/maps/d/viewer?ie=UTF8&t=h&oe=UTF8&msa=0&mid=1-YYR9QoGExz2so4QQAkRPBwi44c&ll=22.30762094509333%2C-47.385946404623425&z=17> (acesso em 20-VI-2020).

HIGUCHI, P.; REIS, M.D.G.F.; REIS, G.G.D.; PINHEIRO, A.L.; SILVA, C.T.D. & OLIVEIRA, C.H.R.D. Composição florística da regeneração natural de espécies arbóreas ao longo de oito anos em um fragmento de floresta estacional semidecidual, em Viçosa, MG. **Revista Árvore** 30: 893-904, 2006.

HIROTA, M.M. (coord.) **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 2019.

INSTITUTO FLORESTAL. **Mapas municipais do Estado de São Paulo**. Disponível em <http://www.iflorestal.sp.gov.br/sifesp/mapasmunicipais.html> (acesso em 23-II-2020).

IUCN (**International Union for Conservation of Nature**). Disponível em <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/34747/0> (acesso em 22-VI-2020), 2020a.

IUCN (**International Union for Conservation of Nature**). Disponível em <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/33928/0> (acesso em 22-VI-2020), 2020b.

ISERNHAGEN, I.; RODRIGUES, R.R.; NAVE, A.G. & GANDOLFI, S. Diagnóstico ambiental das áreas a serem restauradas visando a definição de metodologias de restauração florestal. In: R.R. RODRIGUES, P.H.S. BRANCALION & I. ISERNHAGEN (orgs.). **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. LERF/ESALQ, Instituto BioAtlântica, São Paulo, pp. 87-127, 2009.

IVANAUSKAS, N.M.; RODRIGUES, R.R. & NAVE, A.G. Fitossociologia de um trecho de Floresta Estacional Semidecidual em Itatinga, São Paulo, Brasil. **Scientia Forestalis** 56: 83-99, 1999.

IVANAUSKAS, N.M.; RODRIGUES, R.R. & SOUZA, V.C. Restoration Methodology: the importance of the regional floristic diversity for the forest restoration successfulness. In: R.R., RODRIGUES, S.V. MARTINS & S. GANDOLFI. **High Diversity Forest Restoration in Degraded Areas: Methods and Projects in Brazil**. Nova Science Publishers, New York, pp. 63-76, 2006.

JOLY, C.A., CASATTI, L., BRITO, M.C.W., MENEZES, N.A., RODRIGUES, R.R. & BOLZANI, V.S. Histórico do programa BIOTA/FAPESP – O instituto virtual da Biodiversidade. In: R.R. RODRIGUES, C.A. JOLY, M.C.W. BRITO, A. PAESE, J.P. METZGER, L. CASATTI, M.A. NALON, N. MENEZES, N.M. IVANAUSKAS, V. BOLZANI & V.L.R. BONONI. **Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, FAPESP, SEMA, São Paulo, pp. 44-55, 2008.

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P. & BELINELLO, R. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica** 12: 123-145, 2012.

KRONKA, F.J.N.; MATSUKUMA, C. K.; NALON, M.A. & PONTINHAS, A.A.S. (orgs.). **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo**. Imprensa Oficial, São Paulo, 2005.

LATAWIEC, A.E.; STRASSBURG, B.B.N.; BRANCALION, P.H.S.; RODRIGUES, R.R. & GARDNER, T. Creating space for large-scale restoration in tropical agricultural landscapes. **Front. Ecol. Environment** 13: 211-218, 2015.

LEITE, E.C. & RODRIGUES, R.R. Fitossociologia e caracterização sucessional de um fragmento de floresta estacional no sudeste do Brasil. **Revista Árvore** 32: 583-595, 2008.

MARTINS, F.R. **Estrutura de uma floresta mesófila**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

MEIRA-NETO, J.A.A. & MARTINS, F.R. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual montana no município de Viçosa, MG. **Revista Árvore** 26: 437-446, 2002.

MÜELLER-DOMBOIS, D. & ELLENBERG, H. **Aims and methods in vegetation ecology**. John Willey e Sons, New York, 1974.

MYERS, N. MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858, 2000.

OLIVEIRA, J. B.; MENK, J. R. F.; BARBIERI, J. L.; ROTTA, C. L. & TREMONCOLDI, W. **Levantamento Pedológico Semidetalhado do Estado de São Paulo: Quadrícula de Araras**. Instituto Agrônomo, Campinas, 1982.

PIELOU, E.D. **Ecological diversity**. Wiley, New York, 1975.

RAMOS, V.S.; DURIGAN, S., FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. & RODRIGUES, R.R. **Árvores da floresta estacional semidecidual: guia de identificação de espécies**. Editora da Universidade de São Paulo, Biota Fapesp, São Paulo, 2008.

REIS, A.; BECHARA, F.C.; ESPÍNDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K. & SOUZA, L.L. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. **Natureza & Conservação** 1: 28-36, 2003.

RODRIGUES, R.R. **Métodos Fitossociológicos mais usados**. Casa da Agricultura 10: 20-24, 1988.

RODRIGUES, R.R. & GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de Florestas Ciliares. In: R.R. RODRIGUES, H.F. LEITÃO-FILHO. **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. Editora da Universidade de São Paulo, Fapesp, São Paulo, pp. 235-247, 2004.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S.; NAVE, A.G. & ATTANASIO, C.M. Atividades de adequação ambiental e restauração florestal do LERF/ESALQ/USP. **Pesquisa Florestal Brasileira** 55: 7-21, 2007.

SILVA, A.F.; OLIVEIRA, R.V.; SANTOS, N.R.L. & PAULA, A. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua submontana da fazenda São Geraldo, Viçosa-MG. **Revista Árvore** 27: 311-319, 2003.

SMA (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). **Listagem das espécies arbóreas do Estado de São Paulo com a categoria de ameaça de extinção**, 2004. Disponível em http://www.ibot.sp.gov.br/pesquisa_cientifica/restauracao_ecologica/anexo_resol_sma08-.pdf (acesso em 20-IV-2020).

SMA (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). **Resolução SMA 08. Altera a Resolução SMA 21, de 21-XI-2001 e Resolução SMA 47, de 27-XI-2003**. Fixa orientação para o reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas e dá providências correlatas. São Paulo, 07 de março de 2007. 2008. Disponível em https://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/documentos/2008_Res_SMA_08.pdf (acesso em 30-V-2020).

SHEPHERD, G.J. **FITOPAC versão 2.0**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008.

TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <https://www.tropicos.org/home>. Acesso em 19 de agosto de 2021.

VELOSO, H.P. Sistema fitogeográfico. In: IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, pp. 8-38, 1992.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R. & LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. IBGE, Rio de Janeiro, 1991.

VIANA, V.M. & PINHEIRO, L.A.F.V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Revista Série Técnica IPEF** 12: 35-42, 1998.

VITOUSEK, P.M.; MOONEY, H.A.; LUBCHENCO, J. & MELILLO, J.M. Human domination of the Earth's ecosystems. **Science** 277: 494-499, 1997.

COMPARATIVE STUDY OF DRYING AND POST-FIXATION TECHNIQUES OF NIH 3T3 FIBROBLAST FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 11/10/2021

Susane Lopes

Federal University of Santa Catarina, Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory and Central Laboratory of Electron Microscopy Florianópolis - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/0622601144873237>

Giulia Galani Martha

Federal University of Santa Catarina, Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory Florianópolis - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/2088999381986220>

Ana Paula Lorenzen Voytena

Federal University of Santa Catarina, Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory
<http://lattes.cnpq.br/9627168694321383>

Deise Rebelo Consoni

Federal University of Santa Catarina, Central Laboratory of Electron Microscopy Florianópolis - Brazil.
<http://lattes.cnpq.br/1818529453459251>

Marcelo Maraschin

Federal University of Santa Catarina, Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory Florianópolis - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/9590623317873900>

dimensional (2D) fibroblast adhered cell cultures (NIH 3T3) for quality analysis in scanning electron microscopy (SEM). The critical point drying (CPD) technique is the most used to prepare biological samples for SEM structure analysis. However, the availability of the critical point drying apparatus may preclude microstructure analysis. In addition, not performing the post-fixation process (OsO_4) may interfere with specimen preservation. Therefore, the objective of this study was to evaluate qualitatively, the drying and post-fixation techniques for sample preparation of stabilized murine fibroblasts (NIH 3T3) for SEM. Drying techniques by the oven at 40°C (OV), desiccator (DS), hexamethyldisilazane (HMDS), and critical point drying (CPD), post-fixed (PF) or not post-fixed (nPF) were evaluated. As a result, micrographs suggest that adherent cell culture samples can be analyzed with more straightforward drying techniques with results similar to the commonly used critical point process. In addition, the PF-HMDS and nPF-HMDS samples did not show significant morphological differences. However, the post-fixation step for CPD is essential to maintain the integrity of the samples. The order of preservation quality from best to worst sample of NIH 3T3 fibroblast cell cultures analyzed in this study was PF-CPD \geq PF-HMDS \geq nPF-HMDS > DS \geq OV > nPF-CPD.

KEYWORDS: fibroblasts; adherent cell culture; scanning electron microscopy; drying technique; post-fixation.

ABSTRACT: This paper investigated the effects of different preparation techniques and reports the importance of proper sample preparation of two-

ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE SECAGEM E PÓS FIXAÇÃO DE FIBROBLASTOS NIH 3T3 PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO: Este artigo investigou os efeitos de diferentes técnicas de preparação e relata a importância da preparo adequado de amostras de culturas de células aderidas bidimensionais (2D) de fibroblastos (NIH 3T3) para uma análise de qualidade em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A técnica de secagem por ponto crítico (CPD) é a mais utilizada no preparo de amostras biológicas para análise da estrutura em MEV. No entanto, a disponibilidade do aparelho de secagem de ponto crítico pode impedir a análise da microestrutura. Além disso, a não realização do processo de pós-fixação (OsO_4) pode interferir na preservação da amostra. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente, as técnicas de secagem e pós-fixação para preparo de amostras de fibroblastos murinos estabilizados (NIH 3T3) para MEV. Foram avaliadas as técnicas de secagem em estufa a 40 °C (OV), dessecador (DS), hexametildisilazano (HMDS) e secagem de ponto crítico (CPD), pós-fixados (PF) ou não pós-fixados (nPF). Como resultado, as micrografias sugerem que as amostras de cultura de células aderentes podem ser analisadas com técnicas de secagem mais simples, com resultados semelhantes ao processo de ponto crítico, comumente usado. Além disso, o processo de pós-fixação não apresentou diferenças significativas na morfologia celular pela técnica de secagem por HMDS. Entretanto, a pós-fixação é essencial para manter a integridade das amostras quando secas pela técnica de CPD. A ordem de qualidade de preservação da melhor para a pior amostra de culturas de células de fibroblastos NIH 3T3 analisadas neste estudo foi PF-CPD \geq PF-HMDS \geq nPF-HMDS > DS \geq OV > nPF-CPD.

PALAVRAS-CHAVE: fibroblastos; cultura de células aderentes; microscopia eletrônica de varredura; técnicas de secagem; pós-fixação.

1 | INTRODUCTION

Cell culture is indispensable *in vitro* tool used to improve our perception and understanding of cell biology (SAJI JOSEPH; TEBOGO MALINDISA; NTWASA, 2018). The study of morphology cells is of particular interest to the scientific community because it has the potential to understand different approaches, i.e., the invasive properties of malignant cells, to quantify different mechanisms of wound repair, as well as in the discovery of potential drugs (MATSIKA et al., 2018).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis enables significant advances in biological science. The use of scanning electron microscopy in biological research dates back to the 1970s (KOWNACKI; SZAREK-GVIAZDA; WOŹNICKA, 2015). It is a technique that complements several biochemical and colorimetric studies commonly employed to evaluate the mechanisms and behaviors of cell cultures exposed to different conditions and treatments. Therefore, SEM analysis has been assumed as a protagonist in the area of microanalysis.

Generally, the steps used for biological samples in SEM comprise fixation, post-fixation or not, and dehydration. After, the samples pass for the drying process, which

removes the residual water from the dehydration process. One of the most well-known techniques found in the literature for the drying process is the critical point (CPD) (SALUCCI et al., 2015; LAGONEGRO et al., 2017; SULEIMENOVA et al., 2014; BRAY et al., 1993). Although several methods can be utilized to dry specimens for examination with the SEM, CPD is the most widely used. The technique was first introduced by Anderson (1951) to preserve the three-dimensional structure of biological specimens for transmission electron microscopy. Later, it was “re-introduced” to obtain dry specimens for SEM examination (BRAY, 2000). However, the unavailability of the CPD in research laboratories can impede the microstructure analysis. Furthermore, the suspension of the post-fixation process (OsO_4) can interfere with the preservation and integrity of adhered cells, resulting in false-negative data.

Therefore, the objective of this study was to evaluate different drying techniques that can be used as an alternative to the critical point for analysis of adhered cells culture by SEM. Initially, different sample drying techniques for NIH 3T3 fibroblast adhered cells were investigated as an alternative to CPD, i.e., hexamethyldisilazane (HMDS), 40°C oven (OV), and desiccator (DS). Then, the importance was evaluated and the need for the post-fixation (OsO_4) process, also called secondary fixation, before the CPD and HMDS techniques.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin, poly-L-lysine, osmium tetroxide (OsO_4), glutaraldehyde, paraformaldehyde, ethanol and all other chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from LGC Biotecnologia (São Paulo, Brazil). Sodium cacodylate trihydrate ($\text{C}_2\text{H}_{12}\text{AsNaO}_5$) and hexamethyldisilazane (HMDS) were purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). Paraformaldehyde was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Cell Culture

NIH 3T3 fibroblasts were obtained from the Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ, Brazil). Cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in coverslips previously poly-L-lysine treated to facilitate cell adhesion into a 6-well plate in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS, 3.7 g of sodium bicarbonate (NaHCO_3), and antibiotics penicillin/streptomycin (10 mL/L). The plates were kept in an incubator oven at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO_2). Upon reaching confluence, the culture medium was carefully removed from the cell monolayer and the cells were washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 (3 × 5 min) at room temperature. After washing, cells were fixed

in modified Karnovsky's solution (glutaraldehyde 2.5%, sodium cacodylate 0.1 M and paraformaldehyde 2% - v/v/v) for 1 h at 4°C (KARNOVSKY, 1965). Then, the material was rewashed in 0.1 M sodium cacodylate solution (3 × 20 min). Subsequently, the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO₄) in sodium cacodylate buffer solution 0.1 M, pH 7.2 (v/v) for 1 h at room temperature and washed again in 0.1 M sodium cacodylate solution (3 × 20 min). The samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations (50, 70, 80, 90 %, and 2 × with absolute ethanol) for 10 min immersion in each concentration at room temperature. Afterward, each sample group went through the following drying technique:

2.3 Drying Technique

2.3.1 40°C oven (OV)

The culture plates containing adhered cells on coverslips were kept in an oven at 40°C for 24 h. (S80ST, Biopar, MT, Brazil). Then, the coverslips were fixed in stubs with carbon tape.

2.3.2 Desiccator (DS)

The coverslips were stored in a glass vacuum desiccator containing silica gel at room temperature for 24 h (0538, RBRVidros, SP, Brazil). Then, the coverslips were fixed in stubs with carbon tape.

2.3.3 Hexamethyldisilazane (HMDS)

The coverslips were fixed in stubs with carbon tape. HMDS (10 μL – v) was pipetted over the coverslips. Samples remain in a fume hood until completely HMDS volatilizes at room temperature.

2.3.4 Critical point drying (CPD)

The specimen baskets containing the coverslips with cells were transported to a critical point drying apparatus with critical pressure (Pc) of 90 bars and critical temperature (Tp) of 40°C (EM CPD030, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). After, the coverslips were fixed in stubs with carbon tape.

2.4 Post-fixation (PF) X No post-fixed (NPF)

In a second moment, in addition to evaluating post-fixed samples with OsO₄, samples with no post-fixation (nPF) were also evaluated, i.e., nPF-HMDS and nPF-CPD dried by HMDS and CPD techniques, respectively, and compared the post-fixed samples, PF-HMDS and PF-CPD.

2.5 Scanning Electron Microscope Analysis

In order to promote surface conductivity, the samples were subjected to be sputter deposition with gold (Leica, model EM SCD 500, Wetzlar, Germany) under the following conditions: sputtering current 40 mA, sputtering time 80 seg, and film thickness 20 nm.

The samples were stored in a desiccator connected to a vacuum pump (-500 mmHg) (Lucadema, model Luca 175/60, SP, Brazil) until the time of analysis by scanning electron microscope (SEM) (JSM-6390LV, Jeol, Tokyo, JNP) and field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM) (JSM – 6701F, Jeol, Tokyo, JNP). The parameters used for image acquisition were:

a) Scanning electron microscope (SEM): high vacuum system, secondary electron detectors, accelerating voltage 8kV, working distance 11 – 12mm, and 85 μ A acceleration current (Probe).

b) Field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM): high vacuum system, secondary electron detectors, accelerating voltage 5kV, working distance 5.9 – 6.1mm, and accelerating current (Probe) of 10 μ A.

Analyzes were performed in triplicate in two independent experiments (n = 6). Images were selected in the magnifications of 250, 500, 2000, 5000, 10000 and 20000 \times , in the resolution of 1.32 MP.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

In the first test, NIH 3T3 fibroblasts were previously fixed (modified Karnovsky's solution), post-fixed (OsO₄), dehydrated in increasing ethanol concentrations (50 - 100%), and dried by different techniques: 40°C oven for 24 h (OV); desiccator at room temperature for 24 h (DS); Hexamethyldisilazane (HMDS); and critical point drying (CPD), as shown in figure 1 A.

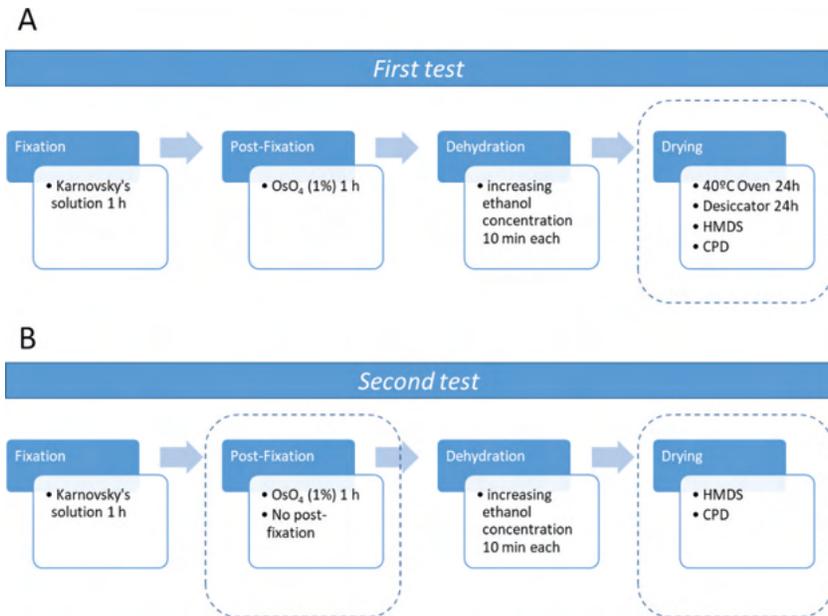


Figure 1. Methods of preparing NIH fibroblasts for scanning electron microscope analysis. (A) The first test, evaluating different drying techniques. (B) The second test, evaluating post-fixed and no post-fixed samples, and dried by HMDS and CPD.

In the analysis of electron micrographs obtained by NIH 3T3 fibroblast cultures, it was possible to observe that the morphological characteristics were preserved in OV (Fig.2 A-C), DS (Fig.2 D-F) and, mainly in HMDS (Fig. 2 G-I). In addition, that the cells in these groups of samples showed morphological characteristics similar to those verified in cells dried by CPD. Flat cells and intense scattering were observed, including membrane protrusions, i.e., (1) lamellipodia, (2) filopodia. These morphological characteristics are identified in different types of active cells and are related to their migratory activity (STEFFEN et al., 2006). According to Tashiro and Imoto (2016), cells with migratory capacity and intense metabolic activity have fusiform morphology and may present different membrane protrusions. Using preparation techniques to maintain these cellular characteristics is essential for a more reliable analysis and closer to its physiological activity *in vivo*.

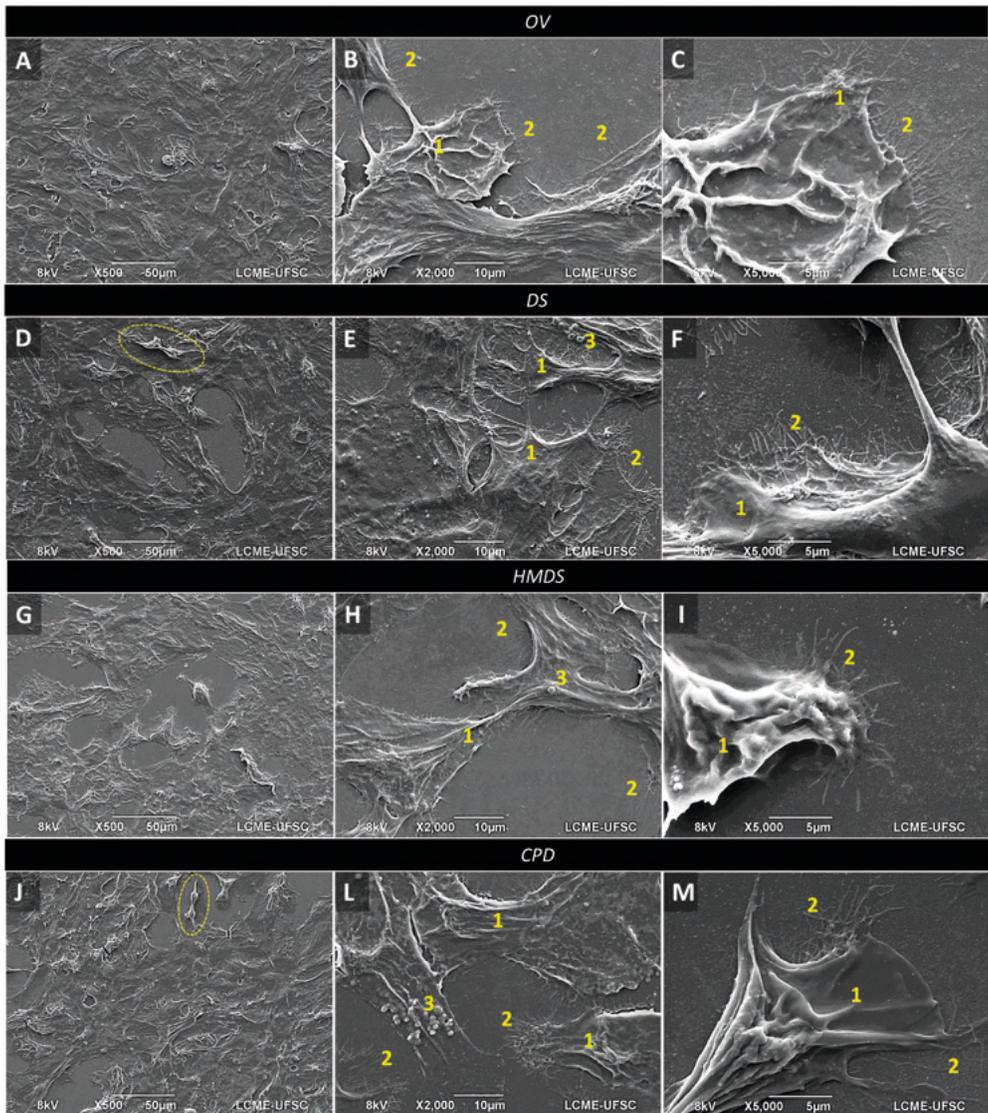


Figure 2. Cell morphology of NIH 3T3 fibroblasts exposed to different drying techniques for Scanning Electron Microscopy analysis. Cells were previously fixed (modified Karnovsky's solution), post-fixed (OsO_4), dehydrated in increasing ethanol concentrations (50 - 100%), and dried by different techniques: (A-C) 40°C oven for 24 h (OV); (D-F) desiccator at room temperature for 24 h (DS); (G-I) Hexamethyldisilazane (HMDS); and (J-M) critical point drying (CPD). All samples have similarities in cell integrity. Ellipsis suggests cytokinesis. Preserved cytoplasmic extensions: (1) lamellipodia, (2) filopodia. (3) Vesicles. However, a better-preserved topography was found in CPD at high magnifications, followed by HMDS, OV, and DS. Magnifications: 500, 2000, and 5000 \times .

A wide variety of cells release different types of extracellular vesicles originating from the endosome and the plasma membrane, known as exosomes and microvesicles with sizes of 40-150 nm and 100-1000 nm, respectively. Physiologically active substances, including various proteins and nucleic acids, are found in vesicles and act as central mediators of

regulation of neighboring cells and distant receptors with incorporated vesicles (SEO et al., 2018). These vesicles were preserved and identified in cells in the different drying methods and are shown in Fig. 2 E, H and L. None of the samples showed a charge effect due to the accumulation of electrons in the digitized area of the sample.

Although CPD samples have better topographic definitions of filopodia when evaluated high magnification, it is possible to suggest that the results obtained by OV, DS, and mainly by HMDS, direct to the maintenance of favorable cellular morphological characteristics and can be strongly considered as alternative techniques to CPD.

A significant amount of the present knowledge on the cellular structure is based on electron microscopic studies. For this analysis, a sequential fixation first with aldehydes such as formaldehyde, glutaraldehyde, or acrolein is employed to stabilize tissue components and reduce their extraction in dehydration. Afterward, there is washing and a second fixation step with osmium tetroxide. This sequential “double fixation” has become the classical fixation scheme in electron microscopy laboratories since the pioneering work of Sabatini, Bensch, and Barnett (1963) (FRANKE et al., 1969; BRAY, 2000). The dehydration process also requires some techniques to remove water content naturally. After the dehydration process, the drying process is required to ensure the specimen’s dryness and losing water molecules (JUSMAN; NG; ABU OSMAN, 2014). However, it is assumed that if cell cultures are not post-fixed (OsO₄), they may exhibit technical changes and/or artifacts at the moment of the analysis, depending on the drying method that is subsequently developed. Therefore, NIH 3T3 fibroblast samples post-fixation were compared with samples no post-fixation, dried by the CPD and HMDS techniques (Fig. 1B).

The nPF-HMDS (Fig. 3 A-C) and PF-HMDS (Fig. 3 D-F) samples showed similar preserved cell morphology, where it is possible to observe good confluence and cellular connections through conserved cytoplasmic extensions.

It is essential to verify that the technique nPF-CPD (Fig. 3 G-I), there was a decrease in cell confluence with cell displacement and voids caused by the rupture of intercellular connections compared to the PF-CPD sample (Fig. 3 J–M). In addition, the cells that remained adherent showed retractions of the cellular projections (lamellipodia and filopodia), contributing to the decrease in cell volume.

Based on these results, it is possible to suggest that the fixations process is insufficient to preserve the adherent cells’ original state when the CPD process is performed. The post-fixation process with OsO₄ is essential to maintain cell integrity for CPD. It is hypothesized that the various CO₂ substitutions for total ethanol removal may physically interfere with the maintenance of cell confluence. There was no charge effect due to the accumulation of electrons in the digitized area of the sample.

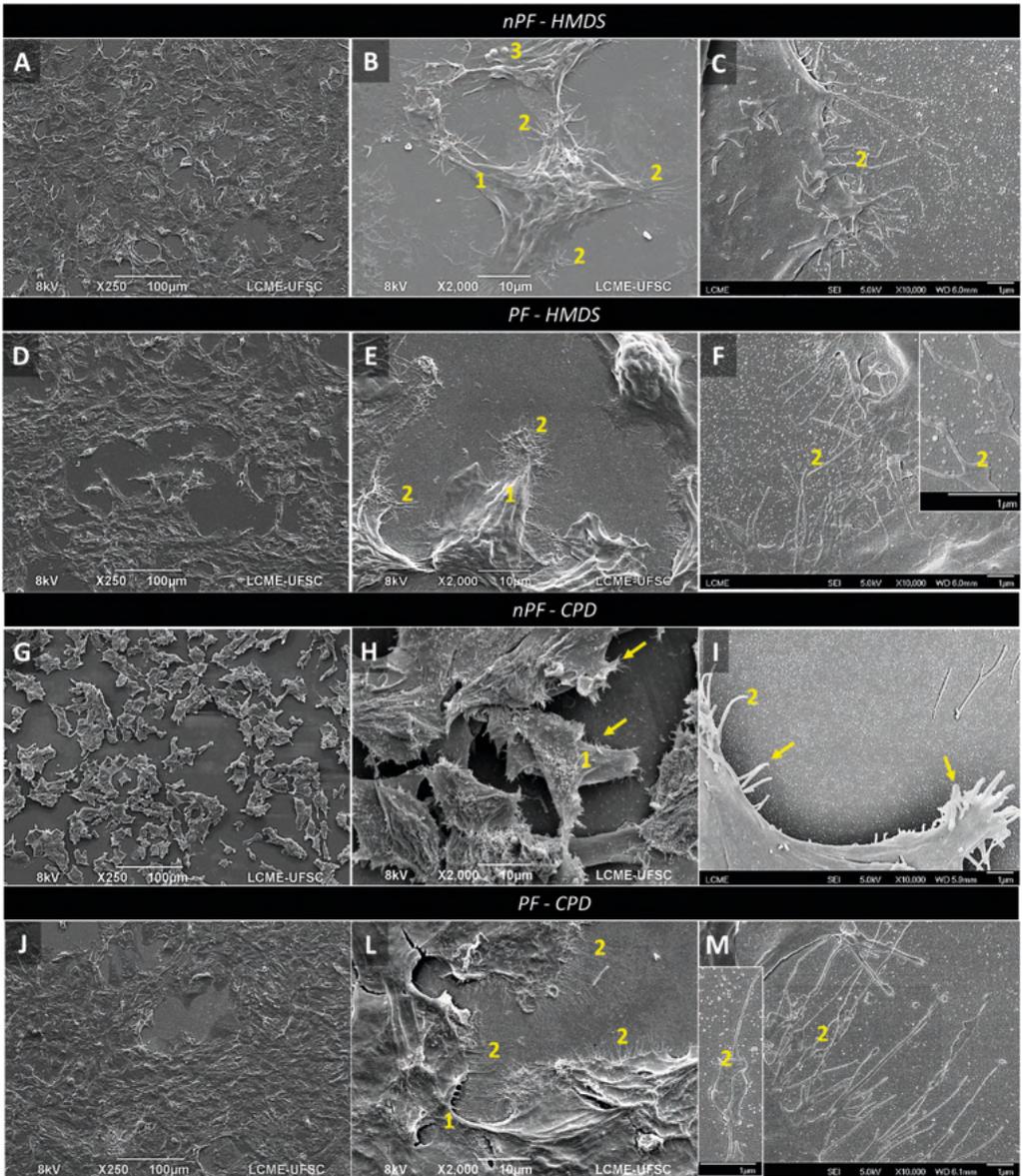


Figure 3. Cell morphology of NIH 3T3 fibroblasts post-fixed and non-post-fixation, dried by critical point (NPF/CPD) and Hexamethyldisilazane (HMDS) techniques, analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM). (A–C) without post-fixed and dried by Hexamethyldisilazane (NPF/HMDS); (D–F) post-fixed and dried by Hexamethyldisilazane (PF-HMDS); (G–I) without post-fixed and dried by critical point (nPF-CPD); and (J–M) post-fixed and dried by critical point (PF/CPD). NPF/CPD sample with cell monolayer disturbances. Arrow: retraction of filopodia. (1) Lamellipodia, (2) filopodia and (3) vesicles. PF-HMDS and nPF-HMDS showed no significant differences in morphological integrity and were similar to PF-CPD, although PF-CPD presented a more conserved topography of filopodia (2). Magnifications: 250, 2000, and 10000 \times . Details in F and M: 20000 \times .

These results indicate that HMDS provides a time-saving and inexpensive alternative to CPD for adhered cell cultures, i.e., NIH 3T3 fibroblasts.

4 | CONCLUSION

In conclusion, for the study of the morphology of NIH 3T3 fibroblast cultures by SEM, it is possible to use cheaper drying techniques, simplifying the process, i.e., HMDS, DS, and OV that can replace equipment for CPD and OsO₄ reagent, showing good integrity of the cellular monolayer. In the process using CPD, the results of this study showed that the post-fixation process (OsO₄) is essential to ensure the maintenance of cellular morphological characteristics. The order of preservation quality from best to worst technique was PF-CPD ≥ PF-HMDS ≥ nPF-HMDS > DS ≥ OV > nPF-CPD. It is crucial to verify that nPF-HMDS samples can still be considered as the best alternative in situations where CPD is not available due to: (i) the results presented concerning the preservation of the original state of adhered cell cultures were satisfaction by SEM analysis; (ii) decreased sample processing time; and (iii) it prevents the handling of toxic chemicals, as the OsO₄, avoiding environmental contamination and damage to the health of researchers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial support to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination). Research supported by LCME-UFSC (Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina).

REFERENCES

- ANDERSON, T. F. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. **Transactions of the New York academy of sciences**, v. 13, n. 4, p. 130–134, 1951.
- BRAY, D. F. Critical Point Drying of Ethanol-Infiltrated, Cryofractured Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. **Supercritical Fluid Methods and Protocols. Methods In Biotechnology**™, v. 13, p. 275–281, 2000.
- BRAY, D. F.; BAGU, J.; KOEGLER, P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. **Mycroscopy Research & Technique**, v. 26, n. 6, p. 489–495, 1993.
- FRANKE, W. W.; KRIEN, S.; BROWN, R. M. Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation with postosmication. **Histochemie**, v. 19, n. 2, p. 162–164, 1969.
- JUSMAN, Y.; NG, S. C.; ABU OSMAN, N. A. Investigation of CPD and HMDS sample preparation techniques for cervical cells in developing computer-aided screening system based on FE-SEM/EDX. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KARNOVSKY, M. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 27, n. November 1964, p. 1A–149A, 1965.

KOWNACKI, A.; SZAREK-GVIAZDA, E.; WOŹNICKA, O. The importance of scanning electron microscopy (sem) in taxonomy and morphology of Chironomidae (Diptera). **EUROPEAN JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 5, n. 1, p. 41–44, 2 jul. 2015.

LAGONEGRO, P. et al. A cytotoxicity study of silicon oxycarbide nanowires as cell scaffold for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 465–471, 2017.

MATSIKA, O. M. et al. Discrete and Continuum Approximations for Collective Cell Migration in a Scratch Assay with Cell Size Dynamics. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 80, n. 4, p. 738–757, 2018.

SAJI JOSEPH, J.; TEBOGO MALINDISA, S.; NTWASA, M. Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery. In: **Cell Culture**. IntechOpen, v. i, p. 21–42, 2018.

SALUCCI, S. et al. Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, v. 80, n. 1, p. 61–68, 2015.

SEO, N. et al. Activated CD8+ T cell extracellular vesicles prevent tumour progression by targeting of lesional mesenchymal cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.

STEFFEN, A. et al. Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 2581–2591, 2006.

SULEIMENOVA, A. et al. Acid demineralization with critical point drying: A method for kerogen isolation that preserves microstructure. **Fuel**, v. 135, p. 492–497, 2014.

TASHIRO, E.; IMOTO, M. Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 213–219, 2016.

CAPÍTULO 9

MULHERES ERVEIRAS DA AMAZÔNIA E O TURISMO DE BASE COMUNITÁRIA NA PERSPECTIVA DO DESENVOLVIMENTO LOCAL

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 06/08/2021

Márcia Sueli Castelo Branco Bastos

Universidade Federal do Pará, Núcleo de Meio Ambiente, Programa de Pós-Graduação em Gestão de Recursos Naturais e Desenvolvimento Local da Amazônia – PPGEDAM.
Belém-Pará
<https://orcid.org/0000-0002-4260-1467>

Wagner Luiz Ramos Barbosa

Universidade Federal do Pará, Núcleo de Meio Ambiente, Programa de Pós-Graduação em Gestão de Recursos Naturais e Desenvolvimento Local da Amazônia – PPGEDAM.
Belém-Pará
<https://orcid.org/0000-0002-2421-8245>

RESUMO: Esta pesquisa aborda o saber popular com o uso de plantas medicinais amazônicas para a produção de remédios artesanais e trata da natureza, limitações e desafios pelos quais passam as mulheres do Grupo Erva Vida para organização dessa cadeia produtiva em busca de sua subsistência e para atender residentes e visitantes. Foram realizadas entrevistas para identificar o perfil socioeconômico e profissional das mulheres do Grupo Erva Vida, residentes em Marudá, os fatores que contribuem ou limitam esta produção artesanal e sua importância para um desenvolvimento territorial mais humanizado no campo da saúde. Também foram aplicados

questionários aos visitantes de Marudá, que é uma das principais localidades turísticas da Amazônia Paraense, com vistas a, entre outros aspectos, identificar a importância dos saberes dessas mulheres para o desenvolvimento local. Os dados reafirmam o valor comunitário e turístico-cultural dessa cadeia produtiva, percebendo-se, no entanto, a necessidade de superar certos desafios relacionados à gestão da produção, de marketing e contábil e na comercialização dos produtos. A partir do olhar das mulheres e do resultado da pesquisa, desenvolveu-se esta proposição que visa potencializar a cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais com vistas a compor um produto turístico de base comunitária como produção associada.

PALAVRAS - CHAVE: Amazônia Paraense; cadeia produtiva local; plantas medicinais.

AMAZON HERBAL WOMEN GROUP AND COMMUNITY-BASED TOURISM FROM THE PERSPECTIVE OF LOCAL DEVELOPMENT

ABSTRACT: This paper approach the empirical knowledge by using Amazon herbal plants for the production the handmade herbs remedies and deals with the nature, limitations and challenges faced by the women of the Erva Vida Group to organize this productive chain in search of their livelihood by selling products to residents and visitors. Through interviews, we identified the socioeconomic and professional profile of the women that participate to the *Erva Vida* Group, residents of Marudá and we verified the factors that contribute or limit this artisanal production and

its importance for a more humanized territorial development in the health field. Questionnaires were also applied to visitors from Marudá, which is one of the main tourist locations in the Amazon of Pará, with a view to identify the importance of those women's knowledge for local development. Our data confirmed the community and the tourist-cultural value of this productive chain. However, it's needed to overcome challenges related to the management of production, marketing and accounting and the commercialization of products. From the perspective of women and the result of this research, a proposition was developed to enhance the productive chain of medicinal plants and handmade herbs remedies in order to compose a community-based tourism product as an associated production.

KEYWORDS: *Paraense* Amazon; local productive chain; herbal plants.

1 | INTRODUÇÃO

Este trabalho, elaborado na perspectiva do empreendedorismo, está baseado no saber popular, na organização das ações para cultivo de plantas medicinais e para a produção de remédios artesanais, e sua comercialização pelo Grupo de Mulheres do Erva Vida, atividades desenvolvidas no espaço físico localizado na comunidade do Sossego, distrito de Marudá, município de Marapanim, na Amazônia Paraense. Ele foi motivado pela necessidade de compreender a relação entre o saber popular e o turismo, a partir das experiências locais, como importantes elementos da ação local, em um projeto inserido nas atividades realizadas pelo grupo de pesquisa em Etnofarmácia da da Universidade Federal do Pará (UFPA).

O saber popular é aqui delimitado ao uso e aproveitamento de plantas medicinais na obtenção de remédios artesanais como fatores que contribuem para o estabelecimento e a manutenção desta cadeia produtiva. Para esta análise, as políticas públicas em fitoterápicos e as práticas integrativas e complementares de saúde existentes foram adotadas como referência, posto que preconizam que no uso terapêutico de plantas medicinais os saberes e práticas tradicionais e populares estão relacionados ao território com seus recursos naturais, como parte integrante da reprodução sociocultural e econômica desses povos e comunidades, aliando a riqueza biológica com a sociodiversidade.

Este estudo partiu do princípio que a cadeia produtiva local em desenvolvimento pode ser aliada a outras cadeias, como a do turismo. De modo que se estruture o potencial turístico de comunidades locais com o reconhecimento e valorização de saberes populares, que possam contribuir para a geração de renda local e de divisas para o município.

No contexto territorial buscou-se uma intercessão entre a cadeia produtiva do turismo e a cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais, como estratégia de resposta aos problemas Local-Global e às questões ambientais vigentes. Visou-se, assim, romper com os modelos de exploração estritamente econômicos, adotados historicamente, que se caracterizam por promover o “desenvolvimento no local”, onde a localidade é somente a sede desse desenvolvimento, não havendo envolvimento da coletividade (VASCONCELOS, 2013).

Adotou-se o seguinte percurso metodológico: na primeira etapa realizou-se breve pesquisa exploratória para reconhecimento do *Locus* de estudo, conhecimento das mulheres do Grupo, assim como, obtenção das primeiras impressões a respeito do objeto de pesquisa, o que favoreceu a identificação do problema.

Em seguida foi realizada pesquisa piloto no local, com a aplicação de questionários aos visitantes em dois períodos turísticos distintos: na alta estação (julho e outubro) e na baixa estação (agosto e setembro), visando identificar o perfil socioeconômico e profissional do visitante de Marapanim-PA, sua avaliação sobre os aspectos turístico-culturais do município e sobre a produção local de remédios artesanais, caso fossem clientes do grupo. Os resultados obtidos com a aplicação dos questionários foram tabulados, sistematizados e analisados descritivamente.

Foram também aplicados questionários em forma de entrevistas com as mulheres do Grupo Erva Vida, visando o conhecimento do perfil socioeconômico e profissional dessas mulheres, bem como o perfil de sua produção e das atividades que realizam. Nessas entrevistas foram identificados fatores que contribuem ou limitam a produção e comercialização de remédios artesanais local, assim como a novas perspectivas do grupo para o empreendimento.

A etapa seguinte foi a de identificação dos elementos de interação entre a cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais e as estratégias na área do turismo sustentável e comunitário.

O Planejamento Estratégico anteriormente realizado com as mulheres do Grupo, entre outros fatores, identificou a necessidade de qualificação da cadeia produtiva e comercialização e valorização dos saberes locais. Com isso, conduziu-se levantamento bibliográfico para compor o referencial teórico do trabalho, que envolveu: a produção de remédios artesanais, sob os princípios da etnofarmácia (BARBOSA; SILVA e SOLER, 2009); os conceitos e estratégias de turismo comunitário (BENI, 2006); a produção associada ao turismo local (SANCHO E MALTA, 2015); segmentação turística (BRASIL, 2010b); e desenvolvimento local e endógeno (BENI, 2006; VASCONCELOS, 2013). Outras fontes também foram consultadas, tais como relatórios, planos e programas oficiais de turismo e de plantas medicinais e fitoterápicos.

Ao estudar o empreendimento do grupo Erva Vida à luz da Etnofarmácia e das políticas do setor, Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), propõe-se a qualificação dessa cadeia produtiva. Abordagem que considera uma visão holística e interdisciplinar da saúde do indivíduo, agregando a cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos a um produto turístico de base comunitária, com identidade local e regional, com vistas a alcançar um novo nicho de mercado para a região. Consideraram-se também as características do negócio, como os meios de produção e distribuição no mercado, destacando-se os principais produtos, assim como, gestão financeira do negócio, requisitos

importantes para a produção associada ao Turismo Comunitário Local ou Turismo de Base Comunitária (TBC).

Sendo assim, visa-se apresentar uma proposição que, em princípio parte dos estudos anteriormente realizados neste território, como segue: No tópico 2. Políticas de Turismo no Brasil: Turismo de Base Comunitária e Segmentação de Mercado como Estratégias para o Desenvolvimento Turístico Regional.

O tópico 3. O Turismo Comunitário e a Cadeia Produtiva de Plantas Medicinais e Remédios Artesanais como Produção Associada, que apresenta os resultados e discussão sobre as pesquisas piloto realizadas com a comunidade de Marapanim-PA e no tópico 4. Considerações Finais trata-se de reflexões a respeito do resultado da pesquisa.

21 TURISMO DE BASE COMUNITÁRIA E SEGMENTAÇÃO DE MERCADO COMO ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO LOCAL

A partir dos anos 90 os debates sobre turismo e desenvolvimento ganham nova orientação no âmbito do turismo sustentável, na perspectiva de serem adotadas alternativas, que venham se contrapor ao convencional turismo de massa, abordagem estritamente econômica (SANCHO E MALTA, 2015).

A criação do Ministério do Turismo (MTur), em 2003, contribuiu com este novo cenário, resultando no fortalecimento da gestão turística, no planejamento e compreensão do produto turístico, seu ciclo de vida, competitividade e na ampliação e diversificação da oferta de roteiros turísticos regionais (BRASIL, 2006b). O Plano Nacional do Turismo (PNT) 2018-2022 coloca a Produção Associada ao Turismo (PAT) e o Turismo de Base Local (TBL) como estratégias de valorização e qualificação dos destinos com grande impacto para o desenvolvimento local. Visam contribuir na diversificação da oferta turística para atender um mercado cada vez mais exigente, que tem se voltado às vivências (BRASIL, 2018).

A PAT e o TBL são estratégias que já haviam sido mencionadas em planos nacionais de turismo anteriores, por meio do conceito de Turismo de Base Comunitária (TBC). De acordo com o MTur, estes conceitos alinham-se aos planos nacionais anteriores, que abordam o Turismo de Base Comunitária (TBC) como estratégia de gestão integrada, que oportuniza a inclusão das cadeias produtivas locais na atividade turística, como produção associada. Tem por pressuposto a articulação de parcerias e a estruturação e fortalecimento da cadeia produtiva do turismo (BRASIL, 2011).

O TBC já havia surgido na América Latina devido às críticas às atividades turísticas vigentes, como uma resposta às pressões de mercado sobre o patrimônio natural e cultural, apontando caminhos para uma nova política de turismo. No *V Fórum Social Mundial de Porto Alegre*, em 2005 foi iniciado um movimento, que culminou na elaboração da “Declaração de Porto Alegre: um outro turismo é possível”.

O turismo comunitário ou TBC baseia-se nos princípios do desenvolvimento territorial endógeno que considera as condições regionais de produção, avanços tecnológicos locais e a produção coletiva (BENI, 2016; VASCONCELLOS, 2013). Mielks e Pegas (2013) também defendem a ideia do turismo comunitário sob o referencial teórico do desenvolvimento endógeno. Os autores recomendam, e consideram como fundamental, o estudo sobre clusters, arranjos e sistemas produtivos locais como pilares para o entendimento da sustentabilidade em TBC e dos processos de cooperação. Para esses autores, os projetos de TBC no Brasil enfrentam problemas similares de outros países, como acesso ao mercado, governança e gestão de parcerias estratégicas.

O TBC prioriza a dimensão humana e o encontro intercultural entre residentes e visitantes, porém os empreendimentos, em geral, são pouco sistematizados, o que ocasiona oferta dispersa e fragmentada, além de carência nos mecanismos de cooperação, há limitação profissional em sua gestão e operacionalização; os serviços de informação e capacitação são insuficientes; posicionamento incerto e pouca divulgação nos mercados emissores de turistas, assim como, meios de promoção e comercialização individuais e diretos, com fraca capacidade de negociação (MALDONADO, 2010).

Os planos nacionais de turismo propõem políticas para o setor, entre elas definiu onze segmentos turísticos prioritários como uma de suas estratégias para a estruturação e comercialização de destinos com novos roteiros (BRASIL, 2010a; 2013). Esta política preconiza que é necessário, por um lado, entender os desejos dos visitantes (demanda real e potencial) e por outro promover a qualificação do destino turístico (oferta local).

Em relação à oferta turística de novos roteiros, destaca-se o turismo de saúde, que ao longo do tempo tem utilizado áreas naturais como recurso terapêutico, motivando o deslocamento de pessoas de todo o mundo em busca desses benefícios. É um dos mais antigos do mundo, cujo volume imprimiu caráter turístico às viagens de saúde. De acordo com o MTur, o “Turismo de Saúde constitui-se das atividades turísticas decorrentes da utilização de meios e serviços para fins médicos, terapêuticos e estéticos” (BRASIL, 2010b. p. 53).

No Brasil, surge no século XIX, aos moldes da Europa, com as visitas às estâncias hidrominerais, com a comprovação da qualidade científica da água quando passam a ser denominadas de águas medicinais, fortalecida pelo transporte, com o surgimento das ferrovias. No entanto, essa procura reduziu significativamente em meados do século XX, consequência da urbanização, da expansão dos meios de transporte, aliados à evolução da medicina e o avanço da indústria farmacêutica (BRASIL, 2010b).

A demanda turística mundial tem crescido, e o segmento turístico de saúde é um deles, considerando que as pessoas estão cada vez mais ocupadas e num ritmo acelerado de vida, buscando diferentes opções para serem bem tratadas do estresse diário, também procuram rejuvenescimento e condicionamento físico. Como exemplo, a busca pelos SPAS cresceu aceleradamente não somente visando perda de peso, mas boa saúde e boa

alimentação (BENI, 2006). As pesquisas turísticas apontaram nos anos que se seguiram um mercado internacional promissor e em ascensão para este segmento (BRASIL, 2010b).

Atualmente, o turismo de saúde se subdivide em dois tipos: médico e de bem-estar. Enquanto o turismo médico tem a intenção de tratamento curativo, cujo objetivo é ajudar no quadro clínico do paciente, o turismo de bem-estar busca o relacionamento com o paciente/cliente, que possa estabelecer a cura preventiva, num ambiente tranquilo no qual possa sentir equilíbrio, com aumento da autoestima, relaxamento e qualidade de vida, com equilíbrio entre as dimensões mental, corporal e espiritual (SILVA, MANÉ E FERREIRA, 2019).

O turismo e a saúde estão necessariamente interligados, pois ambos incidem sobre a economia dos países. A saúde é parte fundamental para a política social, pois é tanto um indicador de desenvolvimento humano como de crescimento econômico para alcançar o desenvolvimento. Os países da América Latina possuem um enorme potencial para o turismo, uma atividade que visa promover o bem-estar social e o crescimento econômico. (GÓMEZ Y PÉREZ APUD CASTRO et al 2011). O segmento turístico de saúde, por sua vez, poderá favorecer o uso sustentável dos recursos socioambientais à medida que contribua para a revitalização de ambientes naturais e a ressignificação das estações balneárias, esportivas e atividades de natureza, assim como a regulamentação local e regional da hotelaria e atividade de base local.

O termo bem estar está relacionado à qualidade de vida, saúde, lazer, relaxamento, paz de espírito e a prática do chamado “turismo de bem-estar” tem como indicador o uso dos recursos naturais e/ou artificiais (mar, conchas, sal, areia, lama, lodo, água, flores, plantas), como os centros de talassoterapia e termas, que utilizam águas termais, minerais e propriedades da terra. Apesar do declínio em um dado momento histórico, na atualidade, cresce vertiginosamente o número de pessoas que fazem turismo, buscando tratamentos para a promoção e manutenção da saúde, prevenção e cura de doenças, ou mesmo com fins estéticos, almejando o bem-estar biopsicossocial (BRASIL, 2010b, p.15).

No Brasil destacamos a experiência de Itaipu, que teve início com a assinatura do Tratado de Itaipu, em 1973, mas somente ampliou sua missão institucional e objetivos estratégicos quando passou a conter responsabilidades social e ambiental. O turismo, que já era a maior fonte de renda de Foz do Iguaçu, em 1939, quando o Parque Nacional do Iguaçu foi criado, em 2014, o Parque Nacional do Iguaçu e o aeroporto da cidade bateram recordes. O primeiro recebeu 1.550.607 visitantes de 172 países. O segundo registrou 1,8 milhão de passageiros” (ITAIPU BINACIONAL, 2015. p. 71).

A organização possui uma gestão integrada em todas as áreas de atuação, destacam-se na dimensão social-sociedade, o programa de Incentivo ao Turismo, que visa “potencializar o desenvolvimento turístico de Foz do Iguaçu e região, por meio da articulação, campanhas de divulgação, capacitação para os profissionais do setor e investimentos em infraestrutura” (ITAIPU BINACIONAL, 2015. p. 74) e o Programa de Plantas Medicinais, que

cultiva, beneficia e distribui espécies medicinais, entre outras, “para atender os projetos socioeconômicos e ambientais da Itaipu e região, produzindo resultados tecnológicos e científicos” (ITAIPIU BINACIONAL, 2015. p. 74).

O horto Medicinal/Ervanário, criado para a produção e comercialização de plantas medicinais, localiza-se no Refúgio Bela Vista, que serve como atrativo para os visitantes locais. Possui uma estrutura de produção de mudas (viveiro medicinal), entre outras atividades, que compõem um complexo de programas da dimensão ambiental de preservação e conservação da fauna e da flora. Os principais *stakeholders* deste programa são as universidades, associações, Parque Tecnológico Itaipu, institutos de pesquisa, Ministério da Saúde, Ministério do Desenvolvimento Agrário, Fiocruz e prefeituras da região da Bacia Hidrográfica (ITAIPIU BINACIONAL, 2015. p. 71).

No âmbito da América Latina, mais especificamente na Amazônia Continental, um exemplo significativo é o *Inkaterra* Reserva Amazônica, um Hotel de Lazer e Saúde, no Peru. Na verdade, é uma cadeia, que possui aproximadamente 05 hotéis, que todo ano hospeda mais de 100.000 viajantes e fornece experiências autênticas no Peru, mostrando a cultura e a natureza peruana para o mundo. *Inkaterra* é uma organização sem fins lucrativos que desenvolve pesquisa científica, tecnológica, social e cultural, a fim de gerenciar e proteger a biodiversidade dos Andes e Amazônia Peruana, possui 40 anos de experiência em iniciativas de turismo sustentável, centrando-se em preservar a natureza e as culturas do Peru e compartilhá-los com o mundo (INKATERRA, 2020).

Estas são experiências, entre tantas outras que apresentam inovações importantes a serem seguidas. Em princípio, cabe identificar como existente uma potencial demanda regional, nacional, e mesmo internacional, que poderá gerar fluxo turístico à localidade em questão ou polo receptor (demanda turística). Identificar os principais atrativos e estrutura local (oferta turística) para o seu desenvolvimento, assim como, as potenciais parcerias que poderão ser geradas para a formação de um APL (Arranjo Produtivo Local) ou rede fortalecida entre poder público, coletividade e iniciativa privada. Estes são alguns requisitos que poderão desenvolver a produção associada ao Turismo (PAT) de plantas medicinais e produtos artesanais como valor cultural e de bem-estar, contribuindo para a constituição de um produto turístico e, conseqüentemente para a formação de roteiros turísticos de forma integrada e participativa com as comunidades da Amazônia Paraense.

3 | A CADEIA PRODUTIVA DE PLANTAS MEDICINAIS E REMÉDIOS ARTESANAIS COMO PRODUÇÃO ASSOCIADA AO TURISMO

A cura por meio de plantas medicinais e remédios caseiros ou artesanais é característica de grande parte da população local e regional, considerada um dos principais elementos culturais da Amazônia Paraense e Brasileira. É considerado um tema de interesse nacional e por sua relevância tem sido preconizado nas políticas públicas do setor, entre

elas a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que desde sua oficialização, em 2006, têm fortalecido as discussões e incentivado os programas de fitoterapia (produtos a base de plantas medicinais) e práticas complementares como políticas públicas regionais na área de saúde e nos meios científicos (BRASIL, 2006a;2018).

Apoiada nos estudos da etnofarmácia, que busca uma visão holística da saúde e do homem e se utiliza da informação popular como referência em seus experimentos e da interdisciplinaridade para elaboração de um método que envolve o aproveitamento de espécies medicinais, com a padronização e qualificação da produção, do cultivo à comercialização de remédios artesanais (BARBOSA, 2011). Considera a aproximação do homem com o meio ambiente, valoriza o conhecimento empírico e surge como forma de preservação dessas práticas terapêuticas, fundamentando o trabalho experimental (BARBOSA, 2011).

O município de Marapanim, onde está localizado o Distrito de Marudá possui um relevante desenvolvimento turístico de sol e praia, além de forte apelo para o turismo de natureza, baseado no uso sustentável dos recursos naturais. Vale lembrar que a política pública de turismo tem como estratégia diminuir a pressão sobre os recursos naturais e culturais e visa à sustentabilidade econômica com a gestão mais eficiente dos recursos. Visa também fornecer uma fonte de renda alternativa para diversificar a base produtiva local e tem como função a redução da pobreza e inclusão social e para tanto será necessário diversificar e interiorizar o turismo no Brasil (BRASIL, 2010b).

As referidas políticas públicas que sustentam as duas cadeias produtivas em questão subsidiaram a elaboração deste trabalho e permitiram delinear a intersecção entre ambas cadeias produtivas. Considerou-se nesta interação os aspectos socioambientais, econômicos e culturais de Marapanim/PA. Além disso, o município caracteriza-se pelos aspectos ambientais e paisagísticos, destacando-se as praias (oceânicas e fluviais), os balneários (espaço de lazer com olho d'água, denominado Igarapé). Oferece uma diversidade de ecossistemas e paisagens que favorecem a terapêutica, a exemplo do clima, relevo e atmosfera típica da floresta amazônica, com mangues e restingas.

Uma porção do município de Marapanim e distrito de Marudá se encontra na Reserva Extrativista (RESEX) Marinha Mestre Lucindo, Unidade de Conservação (UC), que foi oficializada pelo Decreto Federal de 10 de outubro de 2014, como solicitação das comunidades pesqueiras do município, preocupadas com a situação da degradação ambiental. Influenciados, ainda, com a criação das Reservas Extrativista Mãe Grande de Curuçá e a de Maracanã, municípios limítrofes (BRASIL, 2014).

Este município paraense, portanto, possui atrativos ambientais, culturais e certa infraestrutura como meios importantes para desenvolver o segmento turístico de saúde, porém as opções apresentadas pelo MTur para este tipo de segmento turístico, como SPAS, Resorts, centros de bem-estar, entre outros, limitam muito o desenvolvimento

desse segmento no estado do Pará e em outros estados brasileiros, que não possuem tais estruturas.

Ressalta-se também até que ponto tais estruturas responderiam às necessidades locais, fortaleceriam o turismo local e fariam de Marapanim um diferencial no mercado. Sem deixar de lado as modalidades de segmento de saúde apresentadas, como experiências relevantes a serem consideradas, vimos destacar o uso de plantas medicinais e a produção de remédios artesanais como um nicho de mercado regional importante a ser considerado pelos gestores municipais, visto que, além do seu valor simbólico reflete aspectos socioculturais, históricos e ambientais, com potencial de geração de renda e divisas para promover o desenvolvimento local.

Destaca-se no que preconiza as políticas de turismo entre suas ações estratégicas estabelece “Estimular o desenvolvimento sustentável da atividade turística” (BRASIL, 2013. p. 98), por meio do fomento e apoio a projetos ou ações de desenvolvimento local e sustentável, integrando a produção associada (local ou endógena) à cadeia produtiva do turismo (BRASIL, 2018). As pesquisas que vêm sendo realizadas sobre a cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais de Marudá (BARBOSA, 2011; MONTEIRO; SOUZA; BARBOSA, 2012; SILVA, 2016) visam também, entre outros aspectos, aproveitar esse potencial, favorecendo a produção e comercialização para o território.

Não se deve perder de vista que a cadeia produtiva dos remédios caseiros ou artesanais do Grupo Erva Vida e o uso de plantas medicinais com a finalidade curativa tem sua origem remota que data dos primórdios da humanidade. No Brasil essas práticas de cura são originárias das populações indígenas brasileiras, tão importantes para a formação étnica e cultural do país, em especial da Região Amazônica, que é a região que possui maior número de comunidades indígenas do país. Eles têm deixado seu legado de forma oral para seus descendentes e as populações remanescentes desta região (PARÁ, 2011), que se mesclam às influências culturais trazidas por africanos e àquelas dos colonizadores.

Devido à importância do valor cultural e simbólico desses saberes para o município, como também para a região e até mesmo em âmbito nacional, a atividade não pode ser examinada de forma independente, deve-se abordá-la em uma perspectiva mais ampla, destacando-se o que se refere às políticas públicas e o marco legal dos setores envolvidos.

Quanto à cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais, como produção associada à cadeia produtiva do turismo, destaca-se como produto turístico associado aos saberes da população local em uma região turística e estimular o desenvolvimento do turismo com objetivo de inclusão, seja no âmbito dos prestadores de serviços, do grupo social de interesse turístico, das comunidades residentes e dos próprios turistas é uma estratégia fundamental a ser adotada para sua efetiva realização. A partir desta discussão e na perspectiva de torná-la uma produção associada ao turismo, pode-se considerar que para o desenvolvimento do turismo deve-se ter um profundo conhecimento a respeito da demanda e da oferta para a comercialização no turismo. “Cooperar no

âmbito da atividade turística é lidar com um negócio com ganhos individuais e coletivos. Estabelecer suas regras e processos é um desafio constante” (MIELKS E PEGAS, 2013, p. 184).

Ao levantar os fatores que contribuem ou limitam a prática de remédios caseiros e artesanais foi possível identificar a necessidade de fortalecer as políticas públicas no setor. A ideia de inclusão no ângulo dos prestadores de serviços turísticos está nos micro e pequenos empreendedores e nos trabalhadores em geral que tem a possibilidade de fazerem parte da cadeia produtiva do turismo, assim como a integração com outras atividades econômicas do Arranjo Produtivo do Turismo, dando ênfase às condições sociais e culturais que compõem o ativo turístico local, assim como, a promoção do capital social e do patrimônio natural e cultural (BRASIL, 2013).

Fortalece o protagonismo e a inclusão das populações locais aos benefícios da atividade turística, tanto àqueles que não podem usufruir da experiência turística, por estarem em uma situação de exclusão, como também, os que em situação de exclusão, têm suas possibilidades de lazer bastante limitadas, o que é um elemento significativo para turismo de base comunitária.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento estratégico realizado com o grupo Erva Vida (SILVA, 2012) e as entrevistas realizadas com as mulheres (BASTOS, 2016) identificaram fatores que contribuem ou limitam a manutenção da prática popular e o uso de plantas medicinais à luz da PNPMF e da PNPIC e fatores de integração entre as cadeias produtivas de turismo e de plantas medicinais e remédios artesanais.

Como resultado da aplicação das entrevistas, identificou-se que as mulheres do Grupo têm acima de 40 anos e como nível de escolaridade possuem nível fundamental e nível médio de ensino. Nascidas em Marudá (Marapanim/PA) ou em outros municípios paraenses, como Castanhal e Igarapé Açu; atualmente moram em Marudá, em residência própria com a família (2 a 6 integrantes). Elas têm um espaço físico com estrutura de produção e comercialização, próximo às suas residências e que funciona como elemento de integração entre elas, localizado no bairro do Sossego, às proximidades da RESEX Marinha Mestre Lucindo. Possuem ampla experiência na produção de remédios artesanais, adquiridas de geração para geração e interesse em novos produtos (BASTOS, 2016).

Na produção de remédios artesanais, identificou-se uma cadeia produtiva que requer o fortalecimento de ações empreendedoras, dos meios de produção, e da qualificação profissional, com destaque à gestão, comercialização e comunicação e marketing. A maioria das mulheres do Grupo Erva Vida tem como atividade principal a produção de remédios artesanais e a confecção de artesanato, sendo a metade das entrevistadas pescadora aposentada. Nas horas vagas são donas de casa, costureiras e vendem alimentos, produtos

de beleza e no período de férias escolares, trabalham no turismo em outras atividades, como renda complementar (BASTOS, 2016).

Além de forças, a matriz FOFA (Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças realizada previamente por Silva (2016) e adaptada neste trabalho, destaca oportunidades, entre elas: não há concorrência local forte; há o reconhecimento do trabalho do Grupo na região. Na área do turismo conta com a política de turismo sustentável e comunitário, presença de público nacional e internacional, atraídos pela RESEX de Curuçá e limítrofes, possui fluxo turístico local e tendência para mudança de padrão de consumo: naturalistas, adultos e idosos (SILVA, 2012; 2016).

O Grupo de Mulheres tem acesso a outras associações, o que possibilita a criação de um APL ou a constituição de rede com outras cadeias locais. Além dos parceiros locais também conta com a colaboração do grupo de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Gestão de Recursos Naturais e Desenvolvimento Local na Amazônia do Núcleo de Meio Ambiente - PPGEDAM/NUMA/UFGA, que tem participado das ações realizadas no decorrer dos últimos anos, entre elas contribuindo para a criação do Programa Municipal de Fitoterapia e demais Práticas Integrativas e Complementares em Saúde de Marapanim (PROFITIC), junto ao poder legislativo e executivo municipal (Marapanim, 2019).

Deve-se considerar como fragilidades a carência de pontos de distribuição e a sazonalidade na comercialização dos produtos. Não possuem política de formação de preços bem definida, nem número suficiente de mulheres para cumprir as escalas de trabalho necessárias e possuem dificuldade na manutenção da estrutura física. Também não acessam novas ferramentas de informação e comunicação, não possuindo identidade visual e logomarca patenteada (BASTOS, 2016).

Como ameaça tem-se que as instâncias de governança locais não são atuantes e a comunidade não possui uma cultura organizacional e empreendedora, dificultando o envolvimento de novos membros, assim como a juventude, que não tem interesse nas atividades tradicionais. Por fim, a falta de linhas de crédito para empreendimentos desta natureza (SILVA, 2012; 2016).

As informações obtidas com o questionário aplicado aos visitantes do município de Marapanim e do “Grupo Erva Vida” identificam que existe uma demanda turística real no município, e que a maioria dos turistas procedeu da Região Metropolitana de Belém (34,6%) e do interior do Pará (26,9%); somente uma minoria vem de fora do estado do Pará (3,8%). Do total de visitantes, 34,6% não respondeu sua localidade de procedência. A maioria de 61,5% vem do próprio estado do Pará, o que revela que há uma tendência para o turismo regional, tendo como mercado emissor o próprio Estado (BASTOS, 2016).

Quanto ao perfil do visitante identificou-se grande diversidade de respostas em relação à profissão, de forma que 65,39% era servidor público, dona de casa ou estudantes, aposentado comerciante, profissionais da assistência social, da comunicação e da dança. Quanto à faixa etária dos turistas se concentra entre 19 e 59 anos de idade,

num total de 84,6%; o intervalo entre 19 e 39 anos, contém a maior parte (50%) e entre 40 e 59 anos (34,6%), um público de adultos, que tanto tem interesse pelo TBC, como pelo segmento turístico de saúde. A maior parte viaja acompanhada e possui ensino médio (50%), seguido dos que possuem ensino superior incompleto (26,92%). Foi identificado um menor percentual de visitantes, 20% no total, de aposentados, comerciantes e profissionais liberais (BASTOS, 2016).

Ainda como busca de alternativa local para o turismo no município, consultou-se o visitante a respeito do nível de contribuição direta para o turismo de base comunitária, identificando, que este ainda não é uma realidade no município, pois a maioria não conhece pessoa ou negócio que desenvolva o TBC no local (76,92%). Existe, no entanto, uma minoria que conhece iniciativas neste sentido (23,08%), e citaram grupos culturais, fabricação de farinha, extração e comercialização de caranguejo e camarão, não somente daquele município, como também de outras localidades do estado do Pará, como da Ilha do Combu, em Belém (BASTOS, 2016).

Os dados mostram que a quase totalidade (96,15%) dos entrevistados, considera o TBC Importante ou Extremamente Importante para a localidade. É inquestionável que por serem os remédios artesanais de interesse, não somente regional, mas nacional e até mesmo internacional, evidencia-se um potencial nestes produtos como produção associada ao turismo (TBC), que a médio e longo prazos possa atender este nicho de mercado. Dessa forma, o produto turístico associado aos saberes da população local são elementos significativos que devem ser considerados na gestão territorial dos recursos naturais e no desenvolvimento local desta região turística (BASTOS, 2016).

Os visitantes de Marapanim buscam os atrativos locais, tais como, praias e outros aspectos naturais, eventos culturais, como o Festival do Carimbó, originário do município de Marapanim, com os famosos “mestres do carimbó”. Destacando-se também aqueles que visitam os parentes no período de férias escolares. A maioria dos visitantes (88,46%) não identifica prejuízo provocado diretamente pela atividade turística, o turismo é bem visto pela maioria dos visitantes, o que favorece a versão de que a atividade traz benefícios para o local. Apenas a minoria (11,54%) considera que existem prejuízos causados pela atividade turística, a exemplo da degradação ambiental.

Diante do exposto, cabe questionar. São realmente as ações de turismo ou a falta de políticas públicas de gestão e ações técnico-científicas de turismo e áreas afins que contribuam para a degradação local? Os planejadores públicos municipais consideram a capacidade de carga para o desenvolvimento da atividade e a sustentabilidade socioeconômica e ambiental com a crescente chegada de turistas a uma localidade? (BENI, 2006).

Quanto à gestão de recursos especiais é possível visualizar novas alternativas para desenvolvimento do turismo local, considerando-se a criação de roteiro e rota turística como uma tendência nacional e internacional, que tem gerado negócios no polo receptor,

valorizando aspectos culturais e ambientais de uma localidade, os visitantes foram consultados para saber se conheciam algumas delas. Do total, 46,15% conheciam rota turística, as mais citadas foram a Rota das Igrejas, em Salvador, Rota do Sol integrando os Lençóis Maranhenses (MA), Delta do Parnaíba (PI) e Jeriquaçuara (CE), Rota da Cachaça, em Manaus, Rota das Cervejas (RJ), Rota do Pescado (Angra) (BASTOS, 2016).

Nos municípios amazônicos, a gestão dos recursos especiais e o estudo da capacidade de carga que servem como instrumento para identificar os limites de uso e o número de visitantes permitidos para o local são questões que ainda precisam ser melhor diagnosticadas (CHIAS, 2007). Para tanto poderá se valer da regulamentação ambiental estabelecida, a exemplo da Lei No 9985/2000, Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) e do diagnóstico realizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para criação da Resex Mestre Lucindo, Reserva que ocupa parte do município de Marapanim, 26.464,88 ha.

De acordo com os estudos do MTur (BRASIL, 2010b) no âmbito do turismo de saúde, conhecer o perfil do turista, seus desejos, interesses e principais necessidades é um passo fundamental para a formatação de produtos compatíveis. Buscar atender suas expectativas poderá ser uma ferramenta competitiva importante para o território. Estes estudos ressaltam: “não existem pesquisas nacionais que apresentem uma base de dados consistente que possibilite identificar com precisão as principais tendências sobre os hábitos de viagem e preferências específicas do turista de saúde no Brasil” (BRASIL, 2010b).

Considerando a atual limitação, o MTur procura demonstrar esta tendência com os estudos realizados fora do Brasil sobre o perfil de turistas de saúde da Europa, e dos Estados Unidos, que estão relacionados ao turismo de bem-estar e ao turismo médico hospitalar, respectivamente, como uma referência sobre o perfil do turista deste segmento.

Adota como diretriz as políticas de turismo sustentável de base comunitária quando se refere à organização e qualificação da produção local, melhoria da qualidade dos serviços, incentivo ao associativismo e empreendedorismo, formação de redes, entre outras ações estratégicas. E as políticas de plantas medicinais e práticas integrativas quanto à produção e comercialização de remédios caseiros e a inserção destes produtos na cadeia produtiva do turismo, em especial, ao se referir aos “produtos e serviços turísticos de base comunitária com representatividade da cultura local, valorização do modo de vida e defesa do meio ambiente” (BRASIL, 2013. p.99).

As referidas políticas públicas orientam a obtenção e discussão dos resultados deste trabalho dando ênfase às ações estratégicas de gestão turística que trata do segmento de saúde. Considerou-se, para tanto, a interação entre os aspectos socioambientais, econômicos e culturais do município de Marapanim, que sob o princípio do turismo sustentável e do desenvolvimento local poderão contribuir com a cadeia produtiva de fitoterápicos.

Há que se fortalecer a cooperação técnica com instituição de ensino e pesquisa

para capacitação gerencial, técnico-científica e socioambiental e para realização de atividades de educação ambiental, projetos culturais, ambientais e turísticos e promoção de eventos municipais e regionais relacionados à sua área de atuação. Identificou-se, ainda a necessidade de aquisição de equipamentos de produção, de levantamento etnobotânico e de cultivo comunitário de ervas medicinais para posterior construção de um herbário ou horto medicinal. Para tanto, será necessário firmar parcerias externas e com instituições locais, como Secretaria Municipal de Educação, Secretaria Municipal de Saúde e participação em conselhos municipais com interface nas atividades do Grupo.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os planos oficiais do Ministério do Turismo desde o Programa de Regionalização, em 2004, tratam do mercado turístico (demanda e oferta local) e da importância do desenvolvimento sustentável para a construção de produtos turísticos regionais. O Plano Nacional de Turismo (PNT) 2013-2016 estabelece que “o desenvolvimento da atividade turística deve se dar por meio do fomento e apoio a projetos ou ações de desenvolvimento local e sustentável, que integram a produção associada da cadeia produtiva do turismo” (BRASIL, 2013. p. 98).

Sancho e Malta (2015) acrescentam que o desenvolvimento de ações indiretas se torna mais viável, com melhores resultados operacionais, quando se faz o mapeamento da cadeia de valor do turismo local junto à otimização da produção local das comunidades. “Nestes casos o desenvolvimento de projetos de produção associada ao turismo local tem sido uma estratégia importante na inclusão social das comunidades localizadas próximas a destinos turísticos” (p. 177). O reconhecimento da importância desses projetos para o desenvolvimento local tem como alguns dos principais desafios, a conquista da autonomia das comunidades, com geração de renda, de emprego e divisas para o destino turístico.

Este trabalho visa, portanto, dar um novo passo nas pesquisas realizadas sobre a cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais ou fitoterapia popular do grupo Erva Vida, considerando que as atividades de pesquisas e extensão realizadas no âmbito desta cadeia produtiva, nos últimos dez anos, possibilitou a criação do Programa Municipal de Fitoterapia e Práticas Integrativas e Complementares em Saúde de MARAPANIM/PA, em 2019, resultante da intercessão entre o saber empírico e o saber científico, como importante elemento da ação local, que juntamente com o Acordo de Cooperação Técnico-científica, firmado pela UFPA e entidades locais, em 2018, vem fortalecer e trar novas perspectivas à atividade.

No município de Marapanim, as mulheres do Grupo Erva Vida trazem consigo os elementos simbólicos de uma população amazônica com identidade própria e protagonismo de gênero, o que se reflete na sua capacidade organizacional, que vêm amadurecendo enquanto unidade produtiva, com seu estoque de conhecimento regional

e reconhecimento local. A manipulação e uso de plantas medicinais constitui-se em um diferencial, por seu valor como patrimônio cultural imaterial e pelo significado simbólico e terapêutico para estas mulheres, para as comunidades locais e do entorno, assim como, para grande parte das comunidades amazônicas, que possui este potencial produtivo.

Neste aspecto, o uso sustentável dos recursos vegetais na produção de hortos medicinais locais, por exemplo, é uma forma de incentivo à participação da população local na produção de mudas de plantas medicinais e insumos para a cadeia produtiva aqui tratada. O apoio técnico-científico, o fortalecimento dos produtos de base local, maior inclusão das comunidades e a parceria do poder público e do *trade turístico* local também são ações necessárias.

Espera-se, assim, ampliar a atual discussão no âmbito da atividade turística, ultrapassando a dimensão estritamente econômica e integrando-a as demais dimensões, numa perspectiva socioambiental, turístico-cultural e política do território. Diante deste contexto visualiza-se a possibilidade de desenvolvimento do turismo de base comunitária local, associado à cadeia produtiva de plantas medicinais e remédios artesanais ou fitoterápicos populares (insumo, produção, renda, saberes, gênero e comercialização). Fatores estes, que se somam para a criação de um produto turístico de caráter local, visando gerar uma demanda turística real para a região, que é uma das principais do estado do Pará, voltada a novos nichos de mercado em ascensão, tais como o turismo de bem estar e de produção associada.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, Wagner. **Aproveitamento Farmacêutico da Flora como Instrumento de Preservação Cultural e Ambiental**. In: BARBOSA, Wagner et al. (org.). *Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica*. Curitiba: EDITORA CRV, 2011.

BARBOSA, Wagner; SILVA, Wellington e SOLER, Orenzio. **Etnofarmácia**: uma abordagem de plantas medicinais pela perspectiva das Ciências Farmacêuticas. In: BARBOSA, Wagner et al. (org.). *Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica*. Curitiba: EDITORA CRV, 2011.

BASTOS, Marcia; BARBOSA, Wagner. **Mulheres Erveiras da Amazônia e o turismo de Base Comunitária na Perspectiva do Desenvolvimento Local**. XI Colóquio de Organizações, Desenvolvimento e Sustentabilidade (CODS). Anais: UNAMA, 2020.

BASTOS, Marcia. **Turismo de Saúde**: Saberes e Remédios Caseiros para o Desenvolvimento Local na Comunidade do Sossego. 2016. 120p. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão dos Recursos Naturais e Desenvolvimento Local na Amazônia), Núcleo de Meio Ambiente, Universidade Federal do Pará, Belém, 09/05/2016.

BENE, Mário (2006). **Política e Planejamento de Turismo no Brasil**. Série turismo. São Paulo: Editora Aleph, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Estudo Socioambiental referente à proposta de criação de Reserva Extrativista Marinha no Município de Marapanim**. Estado do Pará. Brasília, DF, 2014.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** (PNPMF). (Série B. Textos Básicos de Saúde). Brasília, DF, 2006a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS** (PNPIC). (Série B. Textos Básicos de Saúde). 2 ed. Brasília, DF, 2018.

_____. Ministério do Turismo. **Plano Nacional de Turismo: mais emprego e renda para o Brasil**. PNT. 2018-2022. Brasília, DF, 2018.

_____. Ministério do Turismo. **Plano Nacional de Turismo: o turismo fazendo muito mais pelo Brasil**. PNT. 2013-2016. Brasília, DF, 2013.

_____. Ministério do Turismo. **Estudo de Competitividade do Turismo Brasileiro**. Desenvolvimento sustentável do turismo. Brasília, DF, 2006b

_____. Ministério do Turismo. **Turismo de Saúde: orientações básicas**. Secretaria Nacional de Políticas de Turismo, Departamento de Estruturação, Articulação e Ordenamento Turístico, Coordenação-Geral de Segmentação. (Col.). Brasília, DF, 2010a.

_____. Ministério do Turismo. **Segmentação do Turismo e o Mercado**. Cadernos e Manuais de Segmentação. Marcos Conceituais. Brasília, DF, 2010b.

_____. Ministério do Turismo. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Manual para o Desenvolvimento e Integração das Atividades Turísticas com Foco na Produção Associada**. Brasília, 2011.

CHIAS, Joseph. **Turismo, o negócio da felicidade: desenvolvimento e marketing turístico de países, regiões, lugares**. São Paulo: Editora SENAC, 2007.

GÓMEZ Y PÉREZ. (2011). **Turismo en salud: una tendencia mundial que se abre paso en Colombia**: In: CASTRO, A. D. et al. Cien. tecnol. salud. vis. ocul. vol. 9, no. 1 / enero-junio / pp. 125-137.

INKATERRA: **Authentic Nature Travel in Peru**. Disponível em: <http://www.inkaterra.com/inkaterra-experience/map-of-peru/>. Acesso em: 10/01/2016.

INKATERRA: **Authentic Nature Travel in Peru**. Disponível em: www.inkaterra.com/byinkaterra/guide-to-machu-picchu/. Acesso em: 10/01/2016.

ITAIPU BINACIONAL. **Relatório de Sustentabilidade 2014**. Disponível em: https://www.unglobalcompact.org/system/attachments/cop_2015/168621/original/RS2014_COP.pdf?1434630194. Acesso em 03/01/2016.

Jornal Itaipu Eletrônico – **JIE Horto Medicinal Ervanário** – Refúgio Bela Vista – Itaipu-PR. Disponível em: <http://jje.itaipu.gov.br/node/43616>. Acesso em: 03/04/2016

MALDONADO, Carlos (2010). **O Turismo Rural Comunitário na América Latina: gêneses, características e políticas.** In: BARTHOLO, Roberto; SANSOLO, Davis e BURSZTYN, Ivan (Org.). Turismo de Base Comunitária: diversidade de olhares e experiências brasileiras. Letra e Imagem. RJ.

MARAPANIM. Câmara Municipal de Marapanim. **Lei 1869/2019 de 25 de abril de 2019.** Autoriza a criação do Programa Municipal de Fitoterapia e demais Práticas Integrativas e Complementares em Saúde de Marapanim/PA. Profitic., 2019

MIELKS E PEGAS (2013). **Turismo de Base Comunitária no Brasil.** Insustentabilidade é uma Questão de Gestão. Revista Turismo em Análise. USP. São Paulo, n. 1, v. 24.

MONTEIRO, Maurícia; SOUZA, Antônio e BARBOSA, Wagner. **Etnofarmácia: saberes e gênero.** Curitiba: Editora CVR, 2012.

PARÁ. (2012). Secretaria de Estado de Turismo. **Plano Ver-o-Pará: plano estratégico de turismo do estado do Pará – 2012-2020 – Relatório Executivo.** Paratur/Setur. Belém,

SANCHO E MALTA (2015). **Pesquisa de Demanda para Turismo de Base Comunitária: desafios à promoção do encontro entre comunidade de viajantes.** Disponível em: http://www.revistas.usp.br/rta/article/view/89160/pdf_28. Acesso em 10/05/2019.

SILVA, Cleber et al (2016). **Desenvolvimento Local Sustentável como Liberdade: planejamento estratégico de organização comunitária.** In: Revista do Núcleo de Meio Ambiente da UFPA. v.1, Ano 1, n. 1, dez. Disponível em: <http://reumam.net/index.php/revista/issue/view/1>. Acesso em: 01/09/2019.

SILVA, Islaine; MANÉ, Alessandra e FERREIRA, Lissa. **Turismo de bem estar: conceitos e fundamento de wellness.** Disponível em: http://arquivos.info.ufrn.br/arquivos/2016224149b5052997347a424f0e42c7b/SPAs_ANPTURAcesso em: 12/09/2019.

VASCONCELOS, Mário (2013) **Notas Introdutórias sobre Desenvolvimento e Desenvolvimento Territorial.** In: MITSCHHEIN, Thomas et al. Desenvolvimento local e direito à cidade na floresta amazônica/ – Belém: NUMA/UFPA.

CAPÍTULO 10

PRÁCTICA DE RECOLECCIÓN DE LIANA “CIPÓ-TITICA” EN EL ESTADO DE AMAPÁ, BRASIL

Data de aceite: 25/10/2021

Luciano Araujo Pereira

Universidade do Estado do Amapá - UEAP,
Colegiado de Licenciatura em Ciências
Naturais - Habilitação em Biologia, Macapá-AP
<https://orcid.org/0000-0002-2203-8574>

Patrick de Castro Cantuária

Instituto de Pesquisas Científicas e
Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA
<https://orcid.org/0000-0003-4104-5611>

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue identificar las prácticas de manejo que realizan los recolectores de liana “cipó-titica” en Amapá y su importancia en los ingresos y la organización familiar. Se entrevistaron a 18 agrorecolectores y 43 recolectores a lo largo de la carretera Perimetral Norte (BR 210), entre los municipios de Porto Grande y Pedra Branca do Amapari, en el estado de Amapá. Para el 89% de los encuestados, la liana titica juega un papel importante en la supervivencia de sus familias. En las diferentes manifestaciones de recolección, se observó que muchos agrorecolectores prefirieron comenzar a recolectar la liana “cipó-titica” una a una, sosteniendo su parte inferior pegada al suelo y, con la mano derecha, pasando la parte superior de la vid por detrás del espalda, en para forzarlo hacia abajo y hacia atrás. De esta manera, con el forzamiento del cuerpo, hay menos posibilidad de que las raíces gramiformes sean arrancadas junto con la planta madre. Los agrorecolectores

han demostrado que tienen algunos criterios en la cosecha, ya que solo retiran las lianas clasificadas como “maduras”, esta práctica incluso facilita su beneficio final, ya que las lianas inicialmente se pelan con un cuchillo. Otra forma de seleccionar si la vid está “en punta” es su diámetro (unos 3 cm de circunferencia). En cuanto a la frecuencia de recolección, los agrorecolectores manifestaron que el tiempo de barbecho varía de dos a cuatro años, modificado según el número de lianas en la zona, volumen de lianas recolectadas, entre otros factores. Esta práctica de recolección es un conocimiento acumulado durante al menos cien años en la región, un bagaje que se transmite de generación en generación, lo que permite vislumbrar las diferencias en la forma de recolecta de los entrevistados.

PALABRAS CLAVE: Agroextractivismo. Araceae. Conocimiento local. Lianas.

PRÁTICA DE COLETA DE CIPÓ-TITICA NO ESTADO DO AMAPÁ, BRASIL

RESUMO: O objetivo deste estudo foi identificar as práticas de manejo realizadas pelos catadores de cipó-titica no Amapá e sua importância na renda e na organização familiar. Foram entrevistados 18 agroextratores e 43 extratores ao longo da Rota do Perímetro Norte (BR 210), entre os municípios de Porto Grande e Pedra Branca do Amapari, no estado do Amapá. Para 89% dos entrevistados, o cipó-titica desempenha um papel importante na sobrevivência de suas famílias. Nas diferentes manifestações de coleta, observou-se que muitos agroextratores preferiram iniciar a coleta do cipó um a um,

segurando sua parte inferior rente ao solo e, com a mão direita, passando a parte superior do cipó atrás das costas, com o objetivo de forçá-lo para baixo e para trás. Desse modo, com o forçamento do corpo, há menos possibilidade de que as raízes grampiformes sejam arrancadas junto com a planta-mãe. Os agroextratores demonstraram ter alguns critérios na colheita, visto que apenas retiram as lianas classificadas como “maduras”, tal prática facilita até seu benefício final, já que o descasque das lianas é feito inicialmente com faca. Outra forma de selecionar para saber se o cipó está “no ponto” é o seu diâmetro (tendo cerca de 3 cm de circunferência). Em relação à periodicidade de coleta, os agroextratores afirmaram que o tempo de pousio varia de dois a quatro anos, modificado de acordo com o número de cipós na área, volume de cipós coletados, entre outros fatores. Essa prática de coleta é um conhecimento acumulado há pelo menos cem anos na região, uma bagagem passada de geração em geração, permitindo vislumbrar as diferenças entre a forma de coleta dos entrevistados.

PALAVRAS - CHAVE: Agroextrativismo. Araceae. Conhecimento local. Lianas.

1 | INTRODUCCIÓN

En la Amazonía brasileña, la extracción de lianas por comunidades tradicionales se realiza hace siglos (QUEIROZ et al. 2000). Actualmente, se ha intensificado la recolección a gran escala para fines comerciales.

Esto puede amenazar la sostenibilidad de varias especies. Actualmente, el tema de recolección vegetal es un asunto importante en el contexto del desarrollo regional, pero no puede ser considerado como una solución general para la pobreza, sino una alternativa para los habitantes de la región tener otra alternativa de ingresos entre otras actividades agrícolas. Económicamente es una complementación en la renta de diversas familias amazónicas (FERREIRA; BENTES-GAMA, 2005). Es muy usada para complementar los ingresos de los moradores de la región estudiada (PEREIRA; VIEIRA; REIS, 2006).

El taxón más utilizado localmente en la confección de artesanías es *Heteropsis flexuosa* (Kunth) G.S.Bunting (PEREIRA; CESARINO; CARVALHO, 2000). Sin embargo, otras especies de la familia Araceae tienen raíces fibrosas que también pueden usarse para la producción de utensilios para diversos usos. El nombre *cipó-títica* se asigna a varias lianas usadas en la región amazónica. Generalmente recogido de forma tradicional, con técnicas transmitidas de generación en generación (FERREIRA BENTES, 2011; PEREIRA, 2004; PEREIRA; VIEIRA; REIS, 2003).

La extracción de la liana, cipó-títica en Amapá se lleva a cabo desde por lo menos cien años atrás, pero en las últimas décadas ha producido un aumento significativo de recolección, lo que ha desencadenado una escasez de lianas en los antiguos puntos de extracción (estados de Pará y Maranhão), “convirtiendo a Amapá en una especie de mina de oro”, debido principalmente a la dificultad de fiscalización en las áreas forestales y fronterizas del estado (QUEIROZ et al., 2000). Esto ha facilitado el flujo de las lianas de forma clandestina, sin el pago lícito de impuestos.

Para este trabajo, se considera recolectores (extractores) como trabajadores que son contratados exclusivamente para recolectar lianas en grandes cantidades. Mientras que los agorecolectores son personas que, además de recolectar lianas, tienen como actividad la agricultura la mayor escala, ya que son dueños de la tierra donde recolectan las lianas.

El objetivo del presente estudio fue identificar las prácticas de manejo efectuadas por colectores de la liana “cipó-títica” en el estado de Amapá y su importancia en la renta y organización familiar.

2 | MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección de datos fue realizada entre febrero y septiembre de 2014 y la investigación se realizó en la región sudeste del estado de Amapá (Brasil). En las comunidades en los márgenes de la carretera Perimetral Norte, municipio de Pedra Branca do Amapari, estado de Amapá, Brasil (Fig. 1).

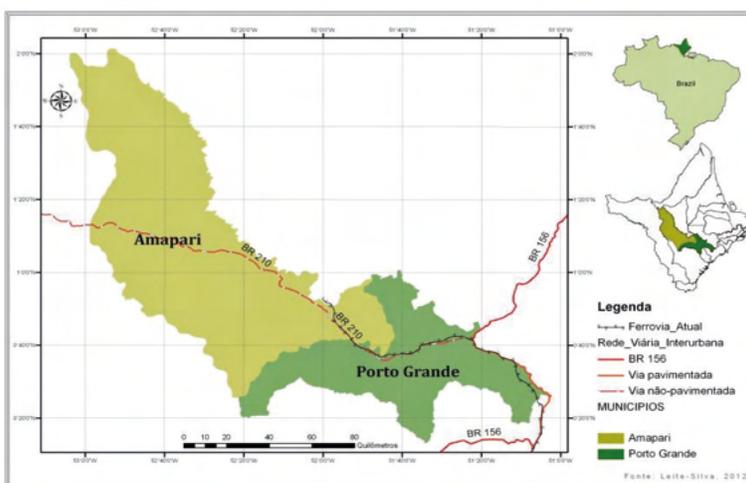


Figura 1 - Región de la carretera Perimetral Norte, municipio de Pedra Branca do Amapari, estado de Amapá, Brasil.

Se efectuó la solicitud de licencia al Consejo de Ética Nacional de Brasil para la realización de las entrevistas. Se realizó una observación participante (MINAYO, 2001) y entrevistas semiestructuradas (ALBUQUERQUE; LUCENA, 2008) por medio de formularios, grabador digital con 18 agorecolectores y 43 recolectores en dos municipios (Porto Grande y Pedra Branca do Amapari) en el estado de Amapá.

3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nombre “cipó-títica” se asigna a varias lianas usadas en la región, en especial a *Heteropsis flexuosa* (Kunth) G.S.Bunting, taxón más utilizado localmente en la confección de artesanías (Fig.2).



Figura 2 - Figura 2 - Planta “cipó-títica” listada en un herbario, destacando la morfología de la planta y las raíces *in natura*.

Para los recolectores: la liana “cipó-títica” tiene una gran influencia en la renta de sus familias, pues el 52% de ellos indicó que más de la mitad de sus ingresos provienen de la recolección de lianas. Afirmaron no poseer propiedades rurales para plantar, dado que dependen de los precios de las lianas, y se ven obligados a diversificar constantemente sus actividades en pequeños empleos.

Para el 43% de los recolectores de lianas, en esta actividad participa toda la familia, sin ser una labor exclusiva del hombre o de la mujer. Por otra parte, esta actividad no se aprende exclusivamente con los padres, sino en el día a día con vecinos (62%), parientes (12%) o resultado del aprendizaje local (17%).

A pesar de que las lianas del Amapá son consideradas materia prima de primera en el mercado brasileño, el precio pagado es de R\$ 0,90 / kg en Amapá y hasta R\$ 20,00 / kg en São Paulo. Para el 42% de los recolectores, la liana “cipó-títica” aumenta la renta familiar y estos resultados concuerdan con los recogidos en la región por Pereira, Vieira y Reis (2007).

La extracción se evidencia en la forma de recolectar las lianas, pues afirmaron recoger todos los tipos, interesándose en la cantidad de lianas, y al momento de formar los manojos descartan las lianas consideradas fuera del normal (no estándar), estropean una

cantidad significativa de lianas, causando un impacto sin precedentes en el bosque.

En las demostraciones de las recolecciones efectuadas por los extractores, se verificó que se recogen varias lianas al mismo tiempo, tirando de ellas o cortando con machete. Debido a esto, generalmente perecen las lianas en el árbol, pues la planta madre tendrá dificultades para fijarse en otro árbol.

Para los agrotecnicos, la recolección de lianas es una actividad hecha por toda la familia, como indicaron el 39% de los entrevistados. Para el 94% de ellos no existe un período definido como “más adecuado” para la recolección, pudiendo realizarse tanto en el período lluvioso, como en la intensa sequía. Para el 89% de los agrotecnicos la liana “cipó-titica” desempeña un papel importante en la supervivencia de sus familias, pues con la venta es posible comprar bienes de subsistencia y utilizar el dinero muchas veces para pagar jornaleros en sus propiedades. Estos datos también concuerdan con los publicados por Pereira, Vieira y Reis (2007, 2005) en la región en estudio.

En las diferentes demostraciones de recolecciones, se observó que muchos agrotecnicos preferían arrancar la liana-titica una a una, sosteniendo su parte inferior cerca del suelo y, con la mano derecha, pasando la parte superior de liana detrás de la espalda, con el propósito de forzarla hacia abajo y hacia atrás.

De este modo, con el forzamiento del cuerpo, hay menor posibilidad de que las raíces grampiformes sean arrancadas junto con la planta madre. Los agrotecnicos demostraron tener algunos criterios en la recolección, pues cosechan solo las lianas clasificados como “maduras”. Tal práctica facilita incluso su beneficio final, pues al descascarar las lianas se realiza inicialmente con un cuchillo.

Otra forma de selección para saber si la liana está “en el punto” es su diámetro (poseer cerca de 3 cm de circunferencia). Por último, se toma en consideración la distancia de los internos, buscando recolectar solamente los que poseen una cantidad mínima de internos, dando preferencia a aquellos con una longitud de por lo menos 1,5 metros de largo. Por debajo de esta medida, sólo sirve para hacer escobas o para suplir diversas actividades domésticas (atar hamacas, corrales y cercas, tejer sillas, entre otras).

En cuanto a la periodicidad de recolección, los agrotecnicos afirmaron que el tiempo de barbecho varía de dos a cuatro años, modificado conforme a la cantidad de lianas en el área, volumen de lianas recolectadas, entre otros factores.

De manera general, cuando se efectúa la práctica de recolección a pequeña escala, puede ser considerada tradicional y sostenible, sin embargo, a gran escala, difícilmente se respeta la dinámica ecológica de la planta, debido a que la recolección se realiza en un período estacional inadecuado, propendiendo la retirada de todas las raíces, lo que acelera la disminución de las lianas y el riesgo de extinción de la planta.

Finalmente, en cuanto a la periodicidad de recolección, los recolectores afirmaron que el tiempo de recolección varía de dos a cuatro años, modificado conforme a la cantidad de lianas en el área y al volumen de lianas recolectadas, entre otros factores.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hay una diferencia significativa entre la técnica de recolección efectuada por los agrorecolectores, de los recolectores, pues fue posible notar que existe un conocimiento acumulado de cómo identificar la calidad de las lianas, la mejor época para realizar la recolección, la forma como descascarar y cómo debe ser hecho el almacenamiento de los mismos. Mientras que los recolectores (extractores) contratados para realizar recolecciones a gran escala no observan estos detalles para retirar las lianas, ya que solo piensan en la cantidad de lianas a vender.

Esta práctica de recolección es un conocimiento acumulado desde hace al menos cien años en la región, un bagaje transmitido de generación en generación, permitiendo vislumbrar las diferencias entre la forma de recolectar de los agrorecolectores de la efectuada por recolectores contratados por las grandes empresas de lianas en el estado de Amapá.

AGRADECIMENTOS

Los autores agradecen a los residentes de la región por la valiosa información brindada; a los ingenieros forestales Jackson Rodrigo de Lima Barbosa y Kézia Pereira da Silva por sus contribuciones a la recopilación de datos y la Dra. Nora Oleas por su revisión del texto.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P. Métodos e técnicas para coleta de dados. In: Albuquerque U. P. (org.) **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**. Recife, Editora NUPEEA. p. 37-55. 2008.

MINAYO, M. C. S. (org.). **Pesquisa Social**. Teoria, método e criatividade. 18 ed. Petrópolis: Vozes, 2001.

FERREIRA, M. G. R.; BENTES-GAMA, M. M. Ecologia e formas de aproveitamento econômico do cipó-títica (*Heteropsis flexuosa* (H.B.K.) G.S. Bunting). Porto Velho: Embrapa Rondônia, p. 21. (Embrapa Rondônia. **Séries Documentos**, 95). 2005.

PEREIRA, L. A. **Etnoecologia do cipó-títica [*Heteropsis flexuosa* (H.B.K) G.S.Bunting] e a sua relação com os sistemas produtivos do Amapá**. 2004. 123 f. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PEREIRA, L. A.; VIEIRA, A. R. R.; REIS, M. J. O conhecimento tradicional dos agroextratores de cipó-títica do Amapá: uma abordagem etnoecológica. **Rev. Bras. de Agroecologia**, Cruz Alta, v.2, n.1, p. 1385-1389, 2007.

PEREIRA, L. A.; VIEIRA, A. R. R.; REIS, M. J. Agroextrativismo de cipó-títica no Amapá: uma complementação de renda para a agricultura ou uma subsistência para os agricultores desassistidos? In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v. 1 n. 1, p. 981-986, 2006.

PEREIRA, L. A. VIEIRA, A. R. R.; REIS, M. J. A importância do Agroextrativismo de cipó-titica – *Heteropsis flexuosa* (Araceae) e dos instrumentos legais no controle do desmatamento no Amapá. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2005, Florianópolis/ SC. **Anais...** Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2005. (sn).

PEREIRA, L. A.; VIEIRA, A. R. R.; REIS, M. J. Agroextrativismo de cipó-titica no Amapá: uma complementação de renda para a agricultura ou uma subsistência para os agricultores desassistido? In: IV seminário internacional sobre agroecologia. 2003, Porto Alegre/RS. **Anais...** I CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2003. (sn).

QUEIROZ, J. A. L.; GONÇALVES, E. G.; RABELO, B. V.; CARVALHO, A. C. A.; FREITAS, J. L.; PEREIRA, L. A.; CESARINO, F. Cipó-titica (*Heteropsis flexuosa* (H.B.K.) G.S.Bunting): diagnóstico e sugestões para o uso sustentável no Amapá. **Documentos** Nº 17, Macapá, p. 1-18. 2000.

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEJU/PPG PARA ENCAPSULAÇÃO DE DICLOFENACO DE SÓDIO

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 05/08/2021

Cassio Nazareno Silva da Silva

Universidade Federal de Goiás, Instituto de ciências biológicas IV
Goiânia - Goiás
ORCID 0000-0002-9228-0489

Karla de Aleluia Batista

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia Oeste
Goiânia - Goiás
ORCID 0000-0003-4396-032X

RESUMO: Os Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos amplamente utilizados por suas propriedades anti-inflamatória, antipirética e analgésica. No entanto, sua administração na forma convencional apresenta alguns problemas como baixa biodistribuição e distribuição inespecífica no corpo. Frente a isso, as nanopartículas poliméricas (NPPs) se mostram como uma alternativa promissora capaz de proteger o princípio ativo da rápida degradação e depuração, além de aumentar a concentração do fármaco na biofase. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi produzir nanopartículas à base de polissacarídeo de goma do cajueiro (PEJU) e polipropilenoglicol (PPG) para a encapsulação de diclofenaco de sódio. As nanopartículas foram produzidas utilizando-se planejamento composto central (CCRD) 2³ e os materiais obtidos foram caracterizados quanto ao seu raio hidrodinâmico,

índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta. A otimização da produção das nanopartículas foi realizada empregando-se a função matemática de desejabilidade, sendo preditos como valores ótimos a produção de nanopartículas com 10 mg de PEJU, 10 µL de PPG e homogeneização a 22000 rpm por 15 min. Nessas condições, as partículas apresentaram raio de 137 nm, PDI de 0,342 e potencial Zeta -5,98 mV, com eficiência de aprisionamento de 95,6%. Desse modo, os resultados evidenciaram que as nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco são promissoras para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos tipo anti-inflamatórios.

PALAVRAS-CHAVE: PEJU; PPG; diclofenaco de sódio; encapsulação; CCRD.

DEVELOPMENT OF CGP/PPG NANOPARTICLES FOR ENTRAPMENT OF DICLOFENAC SODIUM

ABSTRACT: This work highlights the development and optimization of nanoparticles based on cashew gum polysaccharide (CGP) nanoparticles and polypropylene glycol (PPG) as carriers for diclofenac sodium (GGP-PPG@diclofenac). For optimization of the nanoparticles composition, a central composite rotatable design (CCRD) was used and results demonstrated that the best formulation was achieved when 10 mg of CGP were mixed with 10 µL of PPG and homogenized at 22,000 rpm for 15 min. Using these parameters of production, the produced CGP-PPG@nanoparticles showed a hydrodynamic radius around 137nm, PDI

of 0.342, Zeta potential of -5.98 and entrapment efficiency of 95.6%. The release studies evidenced a sustained release profile of diclofenac up to 68 h. The results showed that CGP-PPG nanoparticles can be considered as a drug carrier for diclofenac sodium.

KEYWORDS: CGP; PPG; diclofenac sodium; entrapment; CCRD.

1 | INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso nanoestruturas poliméricas têm despertado interesse do campo científico e comercial devido à possibilidade de se controlar de forma eficiente a liberação e direcionamento de fármacos, evitando a degradação e depuração dos ativos (ANSARI; SADATI; MOZAFARI; ASHRAFI *et al.*, 2020; NELEMANS; GUREVICH, 2020). Nesse contexto, o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (PEJU) destaca-se como um polímero promissor para ser utilizado como nanocarreador de fármacos devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, representando uma fonte renovável de fonte vegetal (LEITE; COSTA; COSTA; MACIEL *et al.*, 2017). Outro polímero que se apresenta como um promissor candidato a ser utilizado em nanoestruturas é o polipropilenoglicol (PPG). O PPG é utilizado principalmente como biomaterial para fabricação de dispositivos biomédicos, apresentando alta estabilidade química, propriedades mucoadesivas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (RAJAN; PRAPHA KAR; GOVINDARAJ; ARULSELVAN *et al.*, 2017).

Considerando as características químicas destes dois polímeros, neste trabalho foi testado a eficiência de produção de nanopartículas automontáveis utilizando PEJU e PPG para liberação controlada de diclofenaco de sódio. O diclofenaco de sódio é um potente anti-inflamatório não esteroideal (AINE) com propriedades analgésicas, sendo utilizado no tratamento da dor aguda e em uma ampla variedade de processos inflamatórios. Apesar da sua atividade eficiente, o diclofenaco apresenta algumas desvantagens, como tempo de meia-vida curto, alta porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas e um metabolismo pré-sistêmico alto (YAHIA; GARCÍA-VILLÉN; DJELAD; BELAROU I *et al.*, 2019).

Outro problema do diclofenaco é a sua baixa solubilidade em água e fluidos aquosos, o que limita a sua absorção, dificultando assim a sua administração (CHUASUWAN; BINJESOH; POLLI; ZHANG *et al.*, 2009). Frente a todos esses problemas de administração oral do diclofenaco de sódio, e sua alta atividade como analgésico e anti-inflamatório, esse fármaco apresenta-se como um ótimo candidato para a entrega controlada, com o objetivo de alcançar uma melhor eficácia terapêutica e adesão do paciente (CHEIKH; GARCÍA-VILLÉN; MAJDOUB; VISERAS *et al.*, 2019).

Para otimização da composição das nanopartículas foi utilizado um planejamento experimental composto central (CCRD) 2³ e as nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco produzidas foram caracterizadas e o comportamento de liberação do fármaco foi avaliado *in vitro*.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Polissacarídeo de Goma De Cajueiro

A obtenção do polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2016). A goma foi fragmentada e dispersa em água destilada numa proporção de 1:5 (m/v) e mantida à temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h, sob agitação. A dispersão coloidal foi filtrada em nylon para a remoção de impurezas e precipitada com etanol na proporção de 1:3 (v/v). O polissacarídeo da goma de cajueiro (PEJU) precipitado foi então separado por centrifugação (5000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e seco à temperatura ambiente. Após a secagem o material foi moído e armazenado.

2.2 Produção das Nanopartículas de PEJU/PPG Contendo Diclofenaco de Sódio

Visando obter a formulação com menor diâmetro e maior aprisionamento de diclofenaco de sódio, as nanopartículas foram produzidas por emulsificação espontânea utilizando planejamento experimental composto central (CCRD) 2³, com pontos estrela rotacionados ao redor do ponto central. O planejamento foi implementado utilizando o programa Statistica 10.0 (Stasoft Inc. Tulsa, OK, USA). As variáveis independentes utilizadas foram: massa de PEJU (5 mg; 10 mg; 15 mg), volume de PPG (5 µL; 7,5 µL; 10 µL) e velocidade de agitação (14000 rpm; 18000 rpm; 22000 rpm).

Para a produção das partículas a fase etanólica (fármaco + PPG) foi gotejada sobre a fase aquosa (PEJU), e o sistema ficou sob agitação mecânica (Ultraturrax® T25) por 15 min. A fase etanólica foi preparada pela mistura de diclofenaco de sódio (3,5 mg) e PPG em 1 mL de etanol. A fase aquosa foi composta por uma mistura de PEJU em 60 mL de água. Após a homogeneização, a mistura contendo as nanopartículas foi submetida a evaporação do solvente em concentrador a vácuo (Concentrator Plus™ Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e a nanoemulsão produzida foi armazenada à 4° C até posterior análise.

2.3 Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas de PEJU/PPG contendo diclofenaco de sódio foi avaliada segundo Cheikh e colaboradores (2019), utilizando uma curva analítica de diclofenaco de sódio ($r^2=0,996$) no comprimento de onda de máxima absorção (280 nm). Para a quantificação do conteúdo de fármaco retido nas partículas, o sobrenadante das formulações foi quantificado em espectrofotômetro UV/VIS (BEL photonics 2000 UV) no comprimento de onda de 280 nm. As quantificações foram realizadas em triplicada, e a eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%EE)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \cdot 100$$

onde, W_i é a concentração de diclofenaco ofertada na produção das NPPs e é a concentração do fármaco no sobrenadante das NPPs formadas.

2.4 Caracterização das Nanopartículas

As partículas foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial Zeta e o índice de polidispersão por meio de dispersão de luz dinâmica (DLS) utilizando um analisador ZetaSizer Nano (ZEN 1600, Malvern).

2.5 Cinética de Liberação

O estudo de liberação foi realizado em célula de difusão vertical do tipo Franz segundo Kim e colaboradores (2010). O compartimento receptor foi preenchido com solução salina 0,9% tamponada (pH 6,8), e mantido a 37 °C com agitação de 300 rpm. No compartimento doador foi colocado 5 mL de solução contendo a nanopartícula de PEJU-PPG@diclofenaco, e entre o compartimento doador e receptor foi colocada uma membrana de nitrocelulose. O perfil de liberação foi acompanhado por 72 h, sendo coletadas alíquotas de 1 mL em intervalos regulares de tempo e a quantidade de diclofenaco liberado foi quantificada por espectrofotometria.

2.6 Análise Estatística

Todos os testes foram realizados em triplicada, com repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação entre médias utilizando o programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), com nível de significância de 95%.

Os dados obtidos no planejamento composto central foram analisados utilizando-se o programa Statistica 10.0 e os resultados experimentais ajustados através de análise de regressão de modelo quadrático, de acordo com a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = \alpha_0 + \sum_i \alpha_i X_i + \sum_{ii} \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{ij} \alpha_{ij} X_i X_j$$

onde, Y representa a resposta obtida, α_0 corresponde ao intercepto, α_i representa o coeficiente linear (efeito) de cada fator, α_{ii} representa o coeficiente quadrático de cada fator, α_{ij} representa a interação entre dois fatores, X_i e X_j representam os fatores avaliados. O modelo foi simplificado por ANOVA e os termos que não foram estatisticamente significativos foram automaticamente excluídos da equação de regressão ($p > 0,05$).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da produção das partículas de PEJU-PPG@diclofenaco

A análise por CCRD apresentou 16 formulações, e os resultados de raio hidrodinâmico e eficiência de aprisionamento do fármaco são mostrados na Tabela 1. Como pode ser observado, as partículas produzidas apresentaram raio hidrodinâmico entre 272 nm e 5,04 μm .

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
	X ₁ PEJU (mg)	X ₂ PPG (μL)	X ₃ Velocidade (rpm)	Raio hidrodinâmico (nm)	Eficiência de encapsulação (%)
1	5	5	14000	448	93,5
2	5	5	22000	604,5	87,9
3	5	7,5	18000	471	78,3
4	5	10	14000	2254	77,6
5	5	10	22000	330	78,2
6	10	5	18000	1585	96,6
7	10	7,5	14000	1048,5	91,7
8 (c)	10	7,5	18000	348	90,6
9	10	7,5	22000	272	91,6
10	10	10	18000	318	90,5
11	15	5	14000	5040	92,4
12	15	5	22000	968	91,2
13	15	7,5	18000	1354	89,8
14	15	10	14000	5000	90,3
15	15	10	22000	526	89,9
16 (c)	10	7,5	18000	321	90,5

Resultados expressos como médias de 6 repetições.

Tabela 1. Resultados obtidos no planejamento 2³ para raio hidrodinâmico, e eficiência de aprisionamento de diclofenaco de sódio das nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco.

Os resultados da análise multivariada evidenciaram que todas as variáveis independentes influenciaram significativamente os valores de raio hidrodinâmico ($p < 0,05$). Como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 1), o efeito linear (X_1) e quadrático (X_1^2) da concentração de PEJU e o efeito quadrático do volume de PPG (X_2^2) causaram um aumento significativo no raio das partículas. Por outro lado, todos os efeitos de interação (X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3) proporcionaram uma redução no raio hidrodinâmico das nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco.

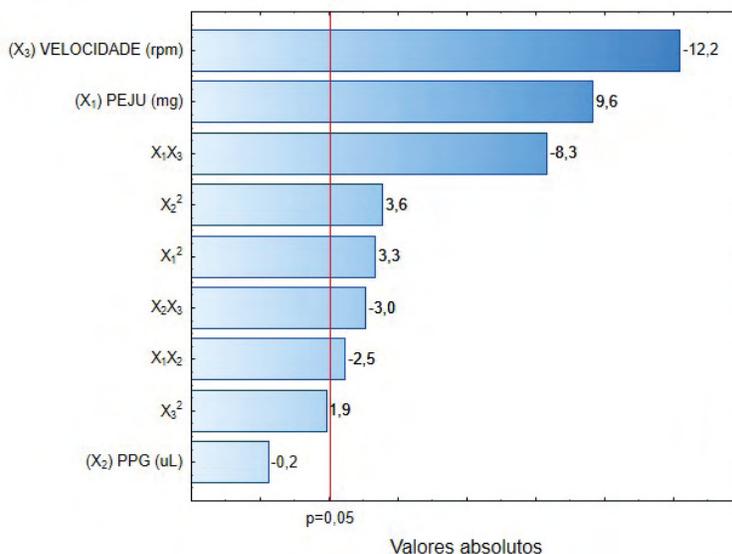


Figura 1. Diagrama de Pareto representando os efeitos da massa de PEJU (X_1), volume de PPG (X_2) e velocidade de agitação (X_3) no raio hidrodinâmico.

De modo geral, o raio hidrodinâmico das partículas foi fortemente afetado pela massa de PEJU, uma vez que a estrutura ramificada e o caráter hidrofílico do polissacarídeo aumentam a interação química da partícula com o ambiente aquoso, e consequentemente aumentam o raio hidrodinâmico do material no meio. Por outro lado, o raio diminui à medida que a velocidade de agitação é aumentada, efeito que pode ser explicado pela relação direta entre a velocidade de rotação e a força de cisalhamento sobre as moléculas (BURCHARD, 2008). O aumento da velocidade origina forças de cisalhamento e empuxo extremamente fortes, aumentando a turbulência entre o rotor e o estator (*gap* de cisalhamento), o que aumenta a taxa de colisão entre os polímeros e leva à redução do tamanho das nanopartículas formadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Bhadra e colaboradores (2016), Burapapadh e colaboradores (2016) e Zhang e colaboradores (2019), que evidenciaram a eficácia do uso de homogeneização baseada em cisalhamento com o objetivo de reduzir o tamanho de nanopartículas.

Os resultados de análise multivariada também indicaram que os dados experimentais apresentaram encaixe com um modelo quadrático e a análise de regressão demonstrou que o raio hidrodinâmico se relaciona com o teor dos polímeros e a velocidade de rotação por uma função de segunda ordem, levando-se em consideração os fatores estatisticamente significativos. Desse modo, o modelo matemático para a predição dos valores do raio hidrodinâmico em função das variáveis testadas pode ser representado pela seguinte equação ($r^2=0,91$):

$$\text{Raio hidrodinâmico (nm): } 329,52 + 1756,13X_1 + 1185,38X_1^2 + 1262,90X_2^2 - 2217,87X_3 - 503,41X_1X_2 - 1694X_1X_3 - 620,65X_2X_3$$

Onde X_1 refere-se à massa de PEJU, X_2 representa o volume de PPG e X_3 representa a velocidade de agitação.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade das partículas de PEJU-PPG em atuarem como carreadores de diclofenaco de sódio, o efeito da concentração dos polímeros e da velocidade de agitação foram avaliados e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, independentemente da composição das nanopartículas, a eficiência de aprisionamento foi superior a 70% em todas as formulações, o que evidencia que as partículas de PEJU-PPG são promissoras como carreadoras de fármacos.

Os resultados da análise multivariada indicaram que os dados experimentais apresentaram enquadramento no modelo quadrático e o modelo matemático para a predição dos valores da eficiência de encapsulação em função das variáveis testadas pode ser representado pela seguinte equação ($r^2=0,97$):

$$EE (\%) = 145.40 + 4.10X_1 - 0.27X_1^2 - 11.90X_2 + 0.4X_2^2 - 3.1X_3 + 0.06X_3^2 + 0.02X_1X_2 + 0.08X_2X_3$$

Onde X_1 refere-se a massa de PEJU, X_2 representa o volume de PPG e X_3 refere-se à velocidade de agitação.

A avaliação da relação entre as variáveis dependentes e independentes mostra que o efeito linear positivo do PEJU é o que mais influenciou na resposta (Figura 2). Além disso, os efeitos quadráticos do volume de PPG (X_2^2) e velocidade de agitação (X_3^2) e os fatores de interação X_1X_2 e X_2X_3 também tiveram efeito positivo na resposta, contribuindo para o aumento do conteúdo de diclofenaco aprisionado nas nanopartículas. Por outro lado, os termos lineares do volume de PPG (X_2) e velocidade de agitação (X_3) e o termo quadrático da massa de PEJU (X_1^2) afetaram negativamente a eficiência de encapsulação (Figura 2).

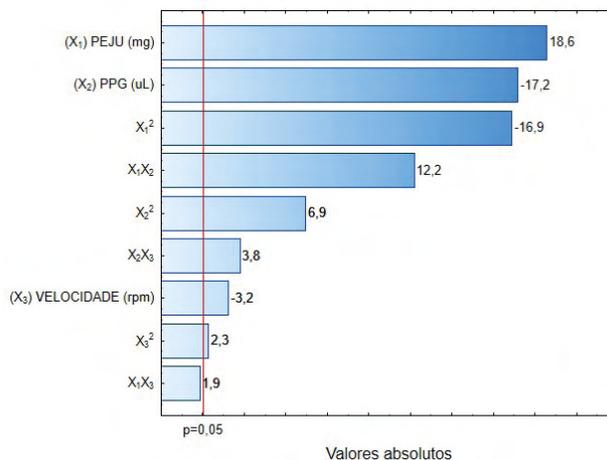


Figura 2. Diagrama de Pareto representando os efeitos da massa de PEJU (X_1), volume de PPG (X_2) e velocidade de agitação (X_3) na eficiência de encapsulação.

A eficiência de aprisionamento do fármaco depende fortemente da solubilidade do fármaco no estado sólido da matriz polimérica, ao peso molecular do princípio ativo, da interação fármaco-polímeros e da presença de grupos funcionais. Nesse caso, é possível que as interações dipolo-dipolo entre o diclofenaco e as moléculas de PEJU favoreçam encapsulação do fármaco. Essa atração entre a região parcialmente positiva do PEJU (δ^+ : hidrogênio dos grupos hidroxila) e a região parcialmente negativa do diclofenaco (δ^- : cloro e oxigênio carboxílico) pode causar mudanças na estrutura interna da nanopartícula polimérica, acarretando uma penetração profunda do diclofenaco na cadeia polimérica de PEJU (MIKHAILOV; AMOSKOV; DARINSKII; BIRSHTEIN, 2020).

Por outro lado, quanto maior o conteúdo de PPG, menor é a porcentagem de aprisionamento do fármaco (Figura 2). Esse efeito provavelmente está relacionado ao processo de automontagem da nanopartícula, e não às características intrínsecas do PPG. É provável que o PPG atue de forma a causar um impedimento estérico que reduz as forças de atração entre o diclofenaco de sódio e o PEJU, reduzindo os locais disponíveis para a interação fármaco-PEJU, e conseqüentemente, seu aprisionamento.

Por fim, a otimização dos parâmetros de produção das nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco foi realizado utilizando-se a função de desejabilidade, sendo matematicamente determinado como parâmetros ótimos 10 mg de PEJU, 10 μ L de PPG e velocidade de agitação de 22.000 rpm ($d=0,95$). Nessas condições, as nanopartículas produzidas deveriam ter raio hidrodinâmico em torno de 150 nm. O modelo foi validado experimentalmente para confirmar a previsão matemática, e as nanopartículas produzidas apresentaram raio de 137 nm, valor próximo ao calculado pelo modelo de desejabilidade. Além disso, o índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação para a formulação otimizada foram avaliados. As nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco apresentaram PDI de 0,342, sugerindo que o sistema é moderadamente polidisperso (BHATTACHARJEE, 2016; DANAEI; DEGHANKHOLD; ATAEI; HASANZADEH DAVARANI *et al.*, 2018). A carga superficial das nanopartículas foi negativa, com um potencial zeta de -5,98, e a eficiência de encapsulação de 95,6%.

3.2 Perfil de liberação do diclofenaco de sódio encapsulado

Com o objetivo de avaliar o potencial das nanopartículas de PEJU-PPG para liberação controlada do diclofenaco de sódio, o sistema PEJU-PPG@diclofenaco foi avaliado quanto ao perfil de liberação do fármaco ao longo de 68 h. O experimento foi realizado em condições intestinais simuladas (pH 6,8), uma vez que é o local onde majoritariamente ocorre a absorção dos fármacos administrado por via oral. Como pode observado na Figura 3, a liberação lenta e gradual do diclofenaco de sódio ocorreu até 50 h de ensaio, sendo observado uma liberação cumulativa de 41%. Após esse ponto, foi observado um platô de liberação sustentada até 68 h. Esse perfil de liberação controlada e prolongada de diclofenaco é uma alternativa interessante para evitar os problemas de efeitos de pico/vale

comumente associados à administração oral convencional deste fármaco. Desse modo, a possibilidade de liberação controlada e prolongada do diclofenaco encapsulado contribuiria para o aumentando da eficiência do tratamento, reduzindo os efeitos adversos comumente associados ao uso do diclofenaco de sódio.

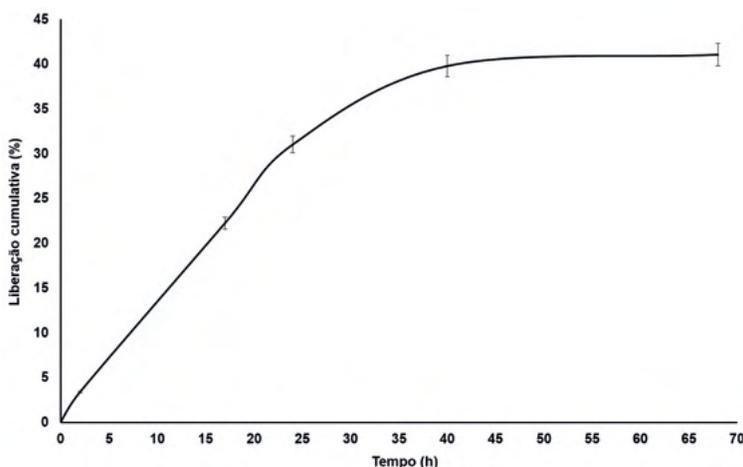


Figura 3. Perfil de liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio encapsulado em nanopartículas de PEJU-PPG (n= 6 ensaios).

Perfis de liberação semelhantes foram observados por Dias e colaboradores (2016), onde foi observado uma liberação lenta de diclofenaco dietilamina encapsulado em nanopartículas de goma de cajueiro acetilada. Outros sistemas de liberação poliméricos com diclofenaco apresentaram desempenho semelhante (DUARTE JUNIOR; TAVARES; ALVES; DE MOURA *et al.*, 2017; YAHIA; GARCÍA-VILLÉN; DJELAD; BELAROUÏ *et al.*, 2019; YOUSEFI; TARHRIZ; EYVAZI; DILMAGHANI, 2020) sendo observado uma liberação eficaz do diclofenaco.

4 | CONCLUSÕES

A utilização do planejamento experimental composto central 2^3 se mostrou eficiente para a otimização dos parâmetros de produção das nanopartículas de PEJU-PPG@diclofenaco. Os resultados evidenciaram que o aumento da velocidade de agitação e a interação entre os polímeros contribuíram para a produção de nanopartículas com menor raio hidrodinâmico e maior eficiência de encapsulação. As partículas de PEJU-PPG@diclofenaco otimizadas apresentaram EE de 95,6%, raio hidrodinâmico de 137 nm, PDI de 0,342 e potencial zeta de -5,98 mV. Por fim, os resultados de liberação evidenciaram que as nanopartículas são materiais promissores para o carreamento e liberação controlada e prolongada do diclofenaco de sódio, contribuindo para evitar problemas de pico/vale e rápida depuração associados à administração convencional desse medicamento.

REFERÊNCIAS

- ANSARI, R.; SADATI, S. M.; MOZAFARI, N.; ASHRAFI, H. *et al.* **Carbohydrate polymer-based nanoparticle application in drug delivery for CNS-related disorders.** European Polymer Journal, 128, p. 109607, 2020.
- BHADRA, S.; PRAJAPATI, A. B.; BHADRA, D. **Development of pH sensitive polymeric nanoparticles of erythromycin stearate.** J Pharm Bioallied Sci, 8, n. 2, p. 135-140, Apr-Jun 2016.
- BHATTACHARJEE, S. **DLS and zeta potential – What they are and what they are not?** Journal of Controlled Release, 235, p. 337-351, 2016/08/10/ 2016.
- BURAPAPADH, K.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. **Development of pectin nanoparticles through mechanical homogenization for dissolution enhancement of itraconazole.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 11, n. 3, p. 365-375, 2016/06/01/ 2016.
- BURCHARD, W. Light Scattering from Polysaccharides as Soft Materials. *In*: BORSALI, R. e PECORA, R. (Ed.). **Soft Matter Characterization.** Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 463-603.
- CHEIKH, D.; GARCÍA-VILLÉN, F.; MAJDOUB, H.; VISERAS, C. *et al.* **Chitosan/beidellite nanocomposite as diclofenac carrier.** International Journal of Biological Macromolecules, 126, p. 44-53, 2019/04/01/ 2019.
- CHUASUWAN, B.; BINJESOH, V.; POLLI, J. E.; ZHANG, H. *et al.* **Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium.** J Pharm Sci, 98, n. 4, p. 1206-1219, Apr 2009.
- DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAIEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F. *et al.* **Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems.** Pharmaceutics, 10, n. 2, May 18 2018.
- DIAS, S. F. L.; NOGUEIRA, S. S.; DE FRANÇA DOURADO, F.; GUIMARÃES, M. A. *et al.* **Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine.** Carbohydrate Polymers, 143, p. 254-261, 2016/06/05/ 2016.
- DUARTE JUNIOR, A. P.; TAVARES, E. J. M.; ALVES, T. V. G.; DE MOURA, M. R. *et al.* **Chitosan nanoparticles as a modified diclofenac drug release system.** Journal of Nanoparticle Research, 19, n. 8, p. 274, 2017/08/04 2017.
- KIM, J.-K.; PARK, J.-S.; KIM, C.-K. **Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release.** International Journal of Pharmaceutics, 383, n. 1, p. 209-215, 2010/01/04/ 2010.
- LEITE, Á. J.; COSTA, R. R.; COSTA, A. M. S.; MACIEL, J. S. *et al.* **The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films.** Carbohydrate Polymers, 174, p. 849-857, 2017/10/15/ 2017.
- MIKHAILOV, I. V.; AMOSKOV, V. M.; DARINSKII, A. A.; BIRSHTEIN, T. M. **The Structure of Dipolar Polymer Brushes and Their Interaction in the Melt. Impact of Chain Stiffness.** Polymers (Basel), 12, n. 12, Dec 2 2020.

NELEMANS, L. C.; GUREVICH, L. **Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers-Cellular Uptake Mechanisms**. *Materials* (Basel), 13, n. 2, Jan 13 2020.

RAJAN, M.; PRAPHA KAR, R. A.; GOVINDARAJ, D.; ARULSELVAN, P. *et al.* **Cytotoxicity assessment of palbociclib-loaded chitosan-polypropylene glycol nano vehicles for cancer chemotherapy**. *Materials Today Chemistry*, 6, p. 26-33, 2017/12/01/ 2017.

YAHIA, Y.; GARCÍA-VILLÉN, F.; DJELAD, A.; BELAROUJ, L. S. *et al.* **Crosslinked polygorskite-chitosan beads as diclofenac carriers**. *Applied Clay Science*, 180, p. 105169, 2019/11/01/ 2019.

YOUSEFI, V.; TARHRIZ, V.; EYVAZI, S.; DILMAGHANI, A. **Synthesis and application of magnetic@layered double hydroxide as an anti-inflammatory drugs nanocarrier**. *J Nanobiotechnology*, 18, n. 1, p. 155, Oct 29 2020.

ZHANG, X.; NIU, J.; WU, J.-Y. **Development and characterization of novel and stable silicon nanoparticles-embedded PCM-in-water emulsions for thermal energy storage**. *Applied Energy*, 238, p. 1407-1416, 2019/03/15/ 2019.

CAPÍTULO 12

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SURURU (*MYTELLA FALCATA*) APERTIZADO EM SALMOURA ORIUNDO DA BAÍA DE SEPETIBA, RIO DE JANEIRO, BRASIL

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 06/08/2021

Karoline Ribeiro Palmeira Schmalz

Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, Brasil

Flávia Aline Andrade Calixto

Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)

Ronaldo Hertel

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Luiz Antonio Moura Keller

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Renata Torrezan

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rio de Janeiro, Brasil

Maria Carmela Kasnowski

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Eliana de Fátima Marques de Mesquita

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO: O processamento do pescado, para aumentar a variedade dos produtos e o tempo de comercialização, vem crescendo e tem sido de grande importância para o mercado mundial. Durante as etapas de processamento ocorrem

alterações nas características do pescado, principalmente quando são adotados tratamentos térmicos na produção de produtos enlatados. Objetivou-se no presente estudo avaliar a qualidade microbiológica durante a apertização do sururu, assim como inocuidade. A avaliação microbiológica foi realizada adotando-se o teste de esterilização comercial como preconizado em legislação. Inicialmente observou-se que o produto não estava seguro para o consumo, uma vez que foi identificada a presença de *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp nas amostras analisadas, porém quando introduzidos outros tratamentos durante o processamento, o produto apresentou-se inócuo.

PALAVRAS - CHAVE: molusco, enlatamento, segurança alimentar, Baía de Sepetiba.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SURURU (*MYTELLA FALCATA*) PROCESSED BY APPERTIZATION IN BRINE FROM SEPETIBA BAY, RIO DE JANEIRO, BRAZIL

ABSTRACT: The processing of fish, to increase the variety of products and time for commercialization, has been growing and has been of great importance to the world market. During the processing stages, changes occur in the characteristics of the fish, especially when heat treatments are adopted in the production of canned products. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality during the tightening of the sururu, as well as its safety. The microbiological evaluation was carried out using the commercial sterilization test as recommended

by law. Initially, it was observed that the product was not safe for consumption, since the presence of *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp in the analyzed samples, but when other treatments were introduced during processing, the product was innocuous.

KEYWORDS: mollusk, canning, food security, Sepetiba Bay.

INTRODUÇÃO

O cultivo de moluscos filtradores em águas brasileiras é incentivado devido à existência de locais apropriados, como as baías (FRANCO et al., 2006). A costa brasileira possui características favoráveis para produção de moluscos bivalves, fato creditado às condições ambientais (MARENZI e BRANCO, 2005) e sociais, sendo meio de subsistência para as comunidades de maricultores (FRANCO et al., 2006). O sururu é uma das espécies de molusco bivalve extraído em toda costa brasileira, muito tradicional no nordeste.

O sururu, como todo molusco bivalve, é um organismo filtrador que torna-se bioacumulador de poluentes. Em estudos com moluscos bivalves ressalta-se que a origem ambiental é fator preponderante para a qualidade. Neste contexto, destaca-se a qualidade microbiológica utilizada para avaliar as possíveis fontes de contaminação e inclusive a presença de agentes etiológicos causadores de doenças de origem alimentar (SANTOS NETO et al., 2016).

As alterações microbianas do pescado devem-se a fatores intrínsecos do próprio alimento, ou seja, os fatores físico, químico e bioquímico, e aos extrínsecos, quais sejam, os fatores do meio ambiente, e as outras condições que podem estar presentes (HUSS, 1997). Aliado a isso, o sururu é beneficiado pela própria população ribeirinha do Estado do Rio de Janeiro em péssimas condições higiênico-sanitárias, sendo necessárias aplicações de tecnologias de conservação mais potentes para garantir a segurança do alimento.

A contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos é um sério problema pois pode levar a altos índices de morbidade. Observa-se então a necessidade de desenvolvimento de alternativas de conservação dos alimentos, para que aliadas às tecnologias existentes, seja possível disponibilizar para população produtos de qualidade e inócuos sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico (JAY, 2000). O processamento térmico do pescado propicia a conservação, promove o aumento da validade comercial, regulariza o fornecimento durante todo ano e facilita a comercialização, o manuseio e o transporte. Porém, é essencial a adaptação do processamento para o pescado visando a obtenção de produtos de acordo com as características de cada espécie. A qualidade está estreitamente relacionada ao efeito que o tratamento térmico pode provocar na composição e nas características sensoriais em relação à textura, sabor, cor e aroma (TORREZAN et al., 2013).

Os alimentos enlatados podem ser classificados de acordo com o pH em muito ácidos (pH <4,6) e de baixa acidez (pH >4,6). O pH da matriz alimentícia é um fator

que influencia no crescimento de determinados microrganismos que possam causar a deterioração da conserva, em consequência disso, interfere na intensidade do tratamento térmico que deverá ser aplicado. As conservas de pescado são produtos de baixa acidez, sendo, portanto, passíveis de contaminação pelo grupo termofílico “flat sour” (*Bacillus stearothermophilus*, *B. coagulans*). Deterioração e produção de toxinas podem ocorrer devido à presença de linhagens proteolíticas de *Clostridium botulinum* (JAY, 2000). Os alimentos envolvidos nos casos de botulismo, geralmente passaram por algum tratamento destinado à preservação do produto, como conservas, apertização ou defumação, mas que não conseguiu destruir os esporos de *C. botulinum*. Quando o tratamento de conservação pretendido é inadequado e é seguido de armazenamento em condições que permitem germinação e crescimento de *C. botulinum*, o ambiente torna-se propício a formação de uma das toxinas microbianas mais letais (DALLASTRA et al., 2018).

Em produtos enlatados, as principais razões para a ocorrência de deterioração microbiana são os sub-processamentos, resfriamentos inadequados, falhas na recravação dos recipientes metálicos, tratamentos térmicos insuficientes e contaminação proveniente de pré-processamento. A matéria-prima utilizada para a elaboração de conservas deve ser de qualidade, uma vez que o processo de conservação dos alimentos não reverte a deterioração, apenas a retarda (SILVA JUNIOR, 2007).

O teste de esterilidade comercial para alimentos de baixa acidez ($\text{pH} \geq 4,6$) é utilizado para verificar a eficácia do processamento térmico aplicado. A associação da adoção do tratamento térmico e da técnica de branqueamento favorece a redução da carga microbiana inicial do produto, sendo indicado quando a matéria prima é considerada de qualidade insatisfatória, além de ser empregado no processo de apertização com os objetivos de remover gases dos tecidos de alimentos e pré-aquecer o produto, diminuindo o tempo de uso da autoclave durante o processamento (CORREIA et al., 2008).

Os ácidos orgânicos são classificados como conservadores ou como acidulantes na legislação brasileira no Decreto nº 55.871 de 23/06/1965 (BRASIL, 1965), definidos como substâncias adicionadas aos alimentos com vista a impedir ou retardar a ação microbiana ou enzimática, protegendo o alimento contra a degradação. Os ácidos orgânicos têm maior eficiência como inibidores bacterianos em condições de baixa temperatura, e maior efeito bactericida com o aumento da temperatura, bem como maior eficiência em condições anaeróbias do que aeróbias (CHICHISTER & TANNER, 1972). Os ácidos acético, cítrico e láctico, empregados como acidulantes, também exercem efeito conservador. Entre eles, o ácido acético é o mais eficiente (FRANCO & LANDGRAF, 2001).

Objetivou-se no presente trabalho elaborar uma conserva de sururu como alternativa de comercialização da matriz alimentícia, avaliar a eficácia do processo de esterilização comercial do produto final quanto a qualidade microbiológica, garantindo um alimento seguro ao consumidor e uma fonte de renda as comunidades ribeirinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sururu, bivalve mitilídeo, espécie *Mytella charruana*, foram coletadas na praia do Cardo, Baía de Sepetiba, no Estado do Rio de Janeiro (Latitude 22°52'00"S, longitude 43°52'00"W), onde existe uma comunidade tradicional de catadoras de sururu que sobrevive exclusivamente da pesca e beneficiamento do mesmo. As condições higiênico-sanitárias desta comunidade e de seu ofício estão aquém do preconizado.

O sururu *in natura*, utilizado como matéria prima, foi analisado quanto a qualidade microbiológica realizando-se a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM), pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, enumeração de *Enterococcus* spp. e de coliformes a 45°C, segundo a IN 62 (BRASIL, 2003).

No processamento, na etapa de enlatamento foram adotados dois tratamentos distintos. No primeiro (lotes 1 e 2) foi realizado o branqueamento como forma de tratamento; e no segundo (lotes 3 e 4), além do branqueamento, associou-se a acidificação do meio com adição de ácido acético. Ambos os tratamentos foram realizados como forma de reduzir a carga microbiana inicial da matéria prima que era alta. Foram realizadas três repetições dos processos e os resultados obtidos correspondem a média dos valores encontrados nas análises.

Foram coletados oito quilos de sururu *in natura* na primeira etapa e seis quilos na segunda etapa, posteriormente foi transportado em caixa isotérmica com gelo potável para o Laboratório de Processamento de Pescado na Embrapa Agroindústria de Alimentos. Na planta de processamento de enlatados, o sururu foi limpo, “desembigado”, lavado com água potável sob pressão e então cozido em água fervente por dois minutos para desconchamento. Na primeira etapa, o molusco foi imerso em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 20 ppm durante 10 minutos, com finalidade de reduzir a carga microbiana. Após este tempo, a matéria-prima foi colocada em salmoura a 3%, por 40 minutos. Neste momento, a amostra foi dividida em dois lotes para o enlatamento: o primeiro (lote 1) sofreu branqueamento em água fervente por 2 minutos e o segundo (lote 2) foi encaminhado diretamente para o enlatamento, onde foi colocado em salmoura a 2% de sal, a quente (80°C).

Na segunda etapa, após o desconchamento, o sururu foi dividido em dois lotes (lotes 3 e 4) e imerso em solução de hipoclorito de sódio por 10 minutos, sendo o lote 3 em concentração de 50ppm e o lote 4 em 100ppm. Em seguida todos os lotes foram colocados em salmoura a 3% de sal refinado, por 40 minutos, sendo a seguir removidos da salmoura e branqueados em água fervente por dois minutos. Por último, os lotes foram acidificados com a adição de vinagre de frutas (ácido acético) na proporção de 33% do total.

Os quatro lotes então, passaram pelo túnel de exaustão sendo a seguir recravados e submetidos a tratamento térmico em autoclave por sete minutos à 120°C, seguido de

resfriamento até 40°C. O cálculo do processo de esterilização envolveu alguns conceitos básicos relacionados ao tempo de destruição térmica, tais como razão letal (D), valor z e valor F (LANDGRAF, 1996). As latas foram esterilizadas em autoclave utilizando-se um tratamento térmico capaz de produzir um F0 de pelo menos 6 minutos. Todas as etapas realizadas na planta piloto preconizaram as boas práticas de fabricação.

Após o processamento, as amostras foram encaminhadas para realização das análises microbiológicas. O produto foi transportado para o laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense, para ser avaliado quanto ao teste de esterilidade comercial, conforme preconizado na Resolução RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001) e na Portaria SDA nº 62 (BRASIL, 2003). No laboratório as latas foram higienizadas, desinfetadas com álcool 70%, identificadas e incubadas invertidas sobre papel filtro em estufas bacteriológicas a 35-37°C/10 dias e 55°C/ 5 dias, objetivando a detecção de crescimento bacteriano de mesófilos e termófilos, respectivamente, com formação de gás e estufamento, assim como possíveis vazamentos. Findado o período de incubação foi realizada a semeadura da amostra para análise de microrganismos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Pesaram-se alíquotas de dois gramas das amostras e semeou-se em tubos contendo caldo de carne cozida e caldo glicose triptona. Após inoculação das amostras, foi adicionado assepticamente aos tubos de caldo de carne cozida uma camada de óleo mineral esterilizado para proporcionar ambiente de anaerobiose. Dois tubos de cada meio com amostra inoculada foram incubados em estufas a 35-37°C e 55°C por cinco dias para posterior observação de alterações nos meios que indiquem crescimento bacteriano como a turvação. Os tubos com crescimento positivo e suspeitos foram repicados em placas com ágar BHI, incubadas a 35-37°C e 55°C por 48h em aerobiose e anaerobiose. Após observação de crescimento foram realizadas a prova bioquímica da catalase (com peróxido de hidrogênio), confecção de esfregaço corado pelo método de GRAM e estudo da característica morfotintorial em microscopia de imersão. No caso de verificação de bastonetes Gram positivos a prova da catalase era necessária para a diferenciação da suspeita dos gêneros *Bacillus* (catalase positiva) e *Clostridium* (catalase negativa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da matéria prima observou-se contagem média de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas de $2,5 \times 10^5$ UFC/g, sendo indicativa de condições higiênicas sanitárias insatisfatórias. Também foi observada a presença de *Salmonella* spp em 25 g de amostra analisada e médias $1,7 \times 10^2$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva; $4,3 \times 10$ NMP/g de *Enterococcus* spp. e $3,0 \times 10^5$ NMP/g de coliformes a 45°C, resultado que compromete a inocuidade do produto.

Após o processamento, na análise visual do produto final observou-se aparência

e coloração satisfatórias, além de não serem detectadas falhas de recravação no exame externo da embalagem. Após o período de incubação das amostras enlatadas em estufas, também não foram observados vazamento, estufamento ou qualquer outro tipo de alteração visível nas latas. Entretanto, optou-se pela realização das análises microbiológicas do produto final devido a qualidade insatisfatória da matéria prima utilizada e visto que é extremamente importante o conhecimento das características microbiológicas dos moluscos bivalves por serem microrganismos filtradores e facilmente ultrapassarem os padrões de qualidade preconizados na legislação (LIZÁRRAGA-PARTIDA e CÁRDENAS, 1996). Ademais, SOLIC et al. (1999) e PEREIRA et al. (2004) alertaram que a contaminação inicial dos moluscos resulta também em produtos contaminados, mesmo quando submetidos aos processos de conservação. Essa contaminação, muitas vezes, não é eliminada por simples processos de conservação (MANOUSARIDIS et al., 2005).

Os resultados das análises bacteriológicas do teste de esterilidade das amostras enlatadas na primeira etapa estão descritos na Tabela 1.

Análises Microbiológicas	Lote 1	Lote 2
Teste de esterilidade no Caldo carne	Alterações: caldo Turvo, carne com aspecto digerido	Alterações: caldo Turvo, carne com aspecto digerido
Teste de esterilidade no Caldo Glicose Triptona	Sem alterações	Sem alterações
Prova da Catalase	+	-
Análise do Esfregaço	Bacilos GRAM +	Bastões GRAM + e esporos

+ = resultado positivo; - = resultado negativo.

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas (teste de esterilidade) dos enlatados de sururu, lote 1 (com branqueamento) e lote 2 (sem branqueamento).

O crescimento bacteriano foi observado tanto nas amostras incubadas a 35°C quanto a 55°C em caldo de carne cozida, o que indica crescimento de microrganismos anaeróbios mesófilos e termófilos. A identificação de bacilos Gram + e catalase positiva nas amostras do lote 1 é sugestivo da presença de microrganismos do gênero *Bacillus* spp. Por sua vez, nas amostras do lote 2 observou-se crescimento de microrganismos GRAM +, esporulados e catalase negativa, sendo sugestivo do gênero *Clostridium* spp. O resultado obtido é relevante uma vez que microrganismos pertencentes a esses gêneros podem crescer sem ocasionar alterações visíveis na embalagem, apresentar patogenicidade e

serem veiculados por alimentos ocasionando enfermidades ao consumidor. Neste contexto, ressaltam-se os casos de óbitos descritos em literatura como os relatados por Eadie et al. (1963) ocorridos no Estado de Michigan, nos Estados Unidos da América, devido a contaminação por *Clostridium botulinum* causados pelo consumo de atum que foi enlatado de forma inadequada. Caso semelhante foi citado por Hayes (1982), onde um defeito no enlatamento de salmão do Alasca causou a doença e morte na Bélgica por ingestão de toxina oriunda do *C. botulinum*.

Por outro lado, em estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2013), a conserva de anchoita (*Engraulis anchoita*) em dois meios de cobertura, sendo um molho de tomate e outro o óleo de girassol, estava em conformidade com a legislação da ANVISA (BRASIL, 2001). López e colaboradores (2014) realizaram a apertização de caracóis (*Helix aspersa*) e não constataram presença de *Clostridium* sp. após 30 e 90 dias, mostrando assim que os produtos apertizados a 95°C por 15 minutos, estavam comercialmente estéreis e poderiam ser comercializados sem sofrer qualquer alteração de origem microbiana, resultado semelhante ao encontrado por Pizato e colaboradores (2012) ao enlatarem tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e realizarem tratamento térmico após enlatamento por 15 e 30 minutos.

Ao contrário do que ocorreu nas amostras dos lotes 1 e 2, ao analisar as amostras dos lotes 3 e 4 não foi observada nenhuma alteração nas análises microbiológicas realizadas nas mesmas condições da primeira etapa que indicassem crescimento bacteriano.

Os resultados observados nos lotes 3 e 4 devem estar associados a adição de ácido acético na conserva, largamente utilizado, uma vez que o mesmo e seus sais são muito eficientes e usados como acidulantes e conservantes em alimentos.

O resultado encontrado no presente trabalho ratifica a teoria das barreiras adotada no processamento tecnológico de alimentos visando a constituição de obstáculos para impedir o desenvolvimento microbiano favorecendo a manutenção da qualidade e inocuidade do produto (FRANCO e LANDGRAF, 2001).

O presente trabalho corrobora com citações na literatura de autores que de maneira similar utilizaram ácido acético objetivando melhor conservação dos produtos analisados, como Pizato e colaboradores (2012) que ao avaliarem a qualidade de tilápia do Nilo enlatada, com tratamento com solução de ácido acético antes da imersão no líquido de cobertura, observaram que não houve crescimento microbiano em nenhuma das análises realizadas para a conserva de tilápia. Resultados semelhantes também foram descritos por Gonçalves e Prentice-Hernández (1998) ao avaliarem os efeitos da defumação líquida de anchova (*Pomatomus saltatrix*) nas propriedades microbiológicas, associado a outros compostos como o ácido acético, observando-se ausência de Clostrídios sulfito redutores, de *Proteus vulgaris*, de *Bacillus subtilis* e baixa contagem microbiana, ressaltando o sucesso do efeito bacteriostático da fumaça líquida em pescado associado as propriedades antimicrobianas do ácido.

Não foi possível a comparação dos resultados obtidos com dados publicados na literatura, no que diz respeito às amostras enlatadas, com ou sem branqueamento e acidificadas, visto que não foram encontrados artigos disponíveis sobre o assunto.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a produção de sururu enlatado é viável, constituindo-se em alternativa de renda para comunidades ribeirinhas, desde que no processamento adotem-se barreiras ao crescimento microbiano além do tratamento térmico como o branqueamento, a adição de salmoura e a acidificação da matriz alimentícia, destacando-se a eficiência da adição de ácido acético. No entanto, apenas a adoção do branqueamento associado ao tratamento térmico não foi eficiente para garantir a inocuidade do produto final provavelmente pela qualidade precária da matéria prima.

REFERÊNCIAS

BRASIL. ANVISA. Nota técnica conjunta nº 001/2011. Secretaria de Vigilância em saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Contaminação de Alimento pela Toxina Botulínica. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União. Brasília, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040/61 referente às Normas Reguladoras de Emprego de Aditivos em Alimentos, alterado pelo Decreto nº 691/62. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Rio de Janeiro, 09 de abril de 1965, retificado pelo de 20 de abril de 1965.

CARVALHO, A.P.O.; CORTEZIA, D.; ESPIRITO SANTO, M.L.P. **Parâmetros de qualidade da anchoita (*Engraulis anchoita*) enlatada**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 72, n. 1, 2013.

CHICHIKSTER, D. F.; TANNER, F. W. **Antimicrobial food additives**, In: Handbook of Food additives. CRC Press, Cleaveland, 1972. 192 p

CORREIA, L.F.M., FARAONI, A.S., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. **Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas**. Alim. Nutr. v.19, n.1, p. 83-95, 2008.

DALLASTRA, E. D. G., BARBOSA, M. C., SILVA, F. M. P. DA, & SILVA, J. F. M. **Botulismo, uma doença letal**. Desafios - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins, v.5, n. 3, p.142-150, 2018.

EADIE, G. A., J. G. MOLNER, R. J. SOLOMON, AND R. D. AACH. **Type E botulism-Report of an outbreak in Michigan**. J. Amer. Med. Ass. v. 187, p:496-499, 1964.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 192p.

FRANCO, J. L.; TRIVELLA, D. B. B.; TREVISAN, R.; DINSLAKEN, D. F.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. C.; DAFRE, A. L. **Antioxidant status and stress proteins in the gills of the Brown mussel *Perna perna* exposed to zinc**. *Chemico-Biological Interactions*, v.160, p.232-240, 2006

GONÇALVES, A.A.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Defumação líquida de anchova (*Pomatomus saltatrix*); Efeito do processamento nas propriedades químicas e microbiológicas**. *Food Science and Technology*, Volume 18, Number 4, 1998, pp. 438-443(6).

HAYES, A. H. **The Food and Drug Administration's role in the canned salmon recalls of 1982**. *Public Health Rep.* v. 98, p:412-415, 1983.

HUSS, H.H. **Garantia da qualidade do produto de pesca**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 176 p., 1997.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620p.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 109-148.

LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.L.; CÁRDENAS, G.V. **Influence of water circulation on marine and faecal bacteria in a mussel-growing area**. *Marine Pollution Bulletin*, V. 32, n. 2, p. 196-201, 1996.

LÓPEZ, N.L.; RECABAL, G.M., CARRASCO, C.A. **Preparation and evaluation of appertized from snail (*Helix aspersa*)** M. *Acta Agronómica*, v. 64, p 1-10, 2015.

MANOUSARIDIS, G. NERANTZAKI, A. PALEOLOGOS, E.K., TSIOTSIAS, A. SAVVAIDIS, I.N KONTOMINAS, M.G. **Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels**, *Food Microbiology*, v. 22, n.1, p: 1-9, 2005.

MARENZI, A.W.C.; BRANCO, J.O. **O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (*Bivalvia*, *Mytilidae*) em cultivo na Armação do Itapocoroy, Santa Catarina, Brasil**. *Rev. Bras. Zool.* v.22 n.2, 2005.

PEREIRA, C.S., POSSAS, C.A., VIANA, C.M., RODRIGUES, D.P. ***Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ**. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p: 562-566, 2004.

PIZATO, S.; KRAIESKI, J.; SARMENTO, C.; PRENTICE, C. **Avaliação da qualidade tecnológica apresentada por tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) enlatada**. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 2, p. 667-674, 2012.

SANTOS NETO, J.P., MIRANDA, C.E.P., COMARELLA, L. **Análise do risco sanitário de alimentos: Qualidade microbiológica do molusco sururu (*Mytella* sp.)**. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, vol. 10, n.5, 2016.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 623 p.

ŠOLIĆ, M. KRSTULOVIĆ, N., JOZIĆ, S. CURAĆ, D. **The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions.** Environment International, v. 25, n. 8, P. 991-1000, 1999.

TORREZAN, R., LOBO, C. D. O., PONTES, S., FURTADO, A., PENTEADO, A., de FREITAS, S. C., & MÁRSICO, E. **Processamento de filé de cachapinta em conserva.** Embrapa Agroindústria de Alimentos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2013.

QUESTÕES DE BIOLOGIA NO ENEM (2009-2019) E SUAS ABORDAGENS EM LIVROS DIDÁTICOS

Data de aceite: 25/10/2021

Data de submissão: 07/10/2021

Vagner Dias Raimundo

Universidade Federal de Viçosa – UFV
Viçosa - Minas Gerais
<https://orcid.org/0000-0003-2471-8239>

Orcione Aparecida Vieira Pereira

Universidade do Estado de Minas Gerais –
UEMG
Ubá - Minas Gerais
<https://orcid.org/0000-0001-7961-0490>

Filipe Brum Machado

Universidade do Estado de Minas Gerais –
UEMG
Ubá - Minas Gerais
<https://orcid.org/0000-0002-1412-6080>

RESUMO: O presente estudo buscou verificar como os conteúdos da disciplina de Biologia foram abordados nas edições do Exame Nacional do Ensino Médio (ENEM) dos anos de 2009 a 2019. Trata-se de uma pesquisa descritiva e foram analisadas 363 questões. Constatou-se a distribuição não homogênea dos temas no exame e o predomínio de questões inseridas nas unidades “Biosfera e Poluição” (19,3%), “Ecologia” (14,6%) e “Célula: unidade da vida” (12,7%) de acordo com a coleção de livros analisada. A Biologia esteve presente em 36,6% das questões da área de Ciências da Natureza e suas Tecnologias, sendo que 48,2% dessas questões exigiam conhecimentos de assuntos

geralmente versados no 3º ano do Ensino Médio e 8,0% tinham perfil interdisciplinar. Dessa forma, ao mostrar os conteúdos de Biologia mais recorrentes nas provas do ENEM, espera-se contribuir para que professores e estudantes busquem estratégias de ensino e aprendizagem, considerando as competências e os conhecimentos exigidos pelo exame.

PALAVRAS - CHAVE: recursos didáticos; conteúdos disciplinares; aprendizagem.

BIOLOGY QUESTIONS AT ENEM (2009-2019) AND THEIR APPROACHES IN TEXTBOOKS

ABSTRACT: This study sought to verify how the contents of the discipline of Biology were addressed in the editions of the National Secondary Education Examination (ENEM) from 2009 to 2019. This is a descriptive research and 363 questions were analyzed. It was found that the distribution of themes in the exam does not follow a homogeneous pattern and the predominance of questions inserted in the units “Biosphere and Pollution” (19.3%), “Ecology” (14.6%) and “Cell: unit of life” (12.7%) according to the analyzed book collection. Biology was present in 36.6% of the questions in the area of Natural Sciences and its technologies, with 48.2% of these questions requiring knowledge of subjects generally covered in the 3rd year of high school and 8.0% had an interdisciplinary profile. Thus, by showing the most recurrent Biology contents in the ENEM tests, it is expected to help teachers and students to seek teaching and learning strategies, considering the skills and knowledge required by the exam.

KEYWORDS: didactic resources; interdisciplinarity; disciplinary contents; learning.

1 | INTRODUÇÃO

O Exame Nacional do Ensino Médio (ENEM) é uma prova criada pelo Ministério da Educação (MEC) cuja função principal é avaliar o aprendizado dos estudantes que concluíram o Ensino Médio, e dentre as diversas áreas do conhecimento abordadas está a Biologia. Esta prova também é um requisito para o ingresso em diversas universidades.

A Biologia é uma das disciplinas abordadas em livros didáticos e é ministrada durante os três anos do Ensino Médio, sendo considerada complexa e abrangente por seu caráter específico e, também, muitas vezes interdisciplinar. Por estas razões, observam-se muitas dificuldades relacionadas à resolução de questões de determinados conteúdos, como Genética e Biologia Celular (TONETE, 2018).

No entanto, o ensino de Biologia é essencial, pois favorece o desenvolvimento de competências que capacitam o estudante a elaborar suas próprias conclusões e tomar decisões com o intuito de que lhe seja possibilitado entender o mundo e sua maneira de nele agir de forma autônoma, as relações dos seres humanos entre si, e destes com o meio e o conhecimento (BRASIL, 2000), bem como instrumenta o estudante na educação científica que é fundamental para a compreensão de muitos fenômenos da atualidade.

Para a elaboração da prova do ENEM, professores de várias universidades se reúnem para desenvolver questões concernentes às quatro grandes áreas de conhecimento abordadas na prova: Ciências Humanas e suas Tecnologias; Ciências da Natureza e suas Tecnologias; Linguagens, Códigos e suas Tecnologias; Matemática e suas Tecnologias. A prova apresenta 45 questões de cada uma dessas áreas de conhecimento e as questões de Biologia se encontram inseridas na área de Ciências da Natureza e suas Tecnologias junto com as questões de Química e Física (CAMPOS, 2015).

A prova possui uma Matriz de Referência própria que busca avaliar várias competências e dentro da área de Ciências da Natureza e suas Tecnologias destaca-se: “[...] apropriar-se de conhecimentos da biologia para, em situações-problema, interpretar, avaliar ou planejar intervenções científico-tecnológicas” (BRASIL, 2009).

Segundo a Matriz de Referência, a Biologia é uma área de conhecimento muito abrangente, pois compreende várias subáreas desde a identificação dos seres vivos (Zoologia, Botânica, Microbiologia), células e suas particularidades (Citologia), a temáticas mais complexas como a clonagem, a Biotecnologia.

Os conhecimentos de Biologia nos Parâmetros Curriculares Nacionais (PCNs) para o Ensino Médio também apontam que seu aprendizado disciplinar está intrinsecamente ligado às demais ciências, uma vez que para o conhecimento da biosfera, por exemplo, é necessária a compreensão de situações geológicas predominantes nos primórdios da vida no planeta (BRASIL, 2000).

Para resolver exercícios ou até mesmo argumentar durante debates cotidianos, determinadas questões exigem que o aluno não apenas domine um conteúdo específico, necessitando, muitas vezes, de conhecimentos relativos a outras disciplinas. A interação entre duas ou mais áreas do conhecimento recebe o nome de interdisciplinaridade, cujo conceito pode ser entendido como diferentes enfoques que abarcam um mesmo fenômeno estudado por outras disciplinas, no qual ocorre uma integração em torno de um entendimento específico (MAZON; TREVIZAN, 2001) e, que segundo os PCNs, pressupõe “um eixo integrador, que pode ser o objeto de conhecimento, um projeto de investigação, um plano de intervenção” (BRASIL, 2000, p. 76).

No estudo da Biologia, outras áreas do conhecimento, tais como Química e Física, por exemplo, podem se apresentar como elementos interdisciplinares indispensáveis para a compreensão de assuntos dentro da Bioquímica e Biofísica, respectivamente. Miranda *et al.* (2011) defendem que a interdisciplinaridade e a contextualização dos conteúdos na educação devem fazer parte da aprendizagem do aluno e ocorrer mediante a valorização dos diversos saberes provenientes de outras áreas de conhecimento. A proposta metodológica do ENEM, por exemplo, busca a integração interdisciplinar de diversas formas de conhecimentos presentes nos PCNs.

Durante toda a sua trajetória escolar, o estudante tem como um dos materiais de estudo o livro didático que é bastante utilizado nas escolas públicas e particulares, e aborda vários conteúdos dentro de disciplinas específicas por meio de uma linguagem científica. Ele deve ser utilizado de forma sistemática no processo de ensino-aprendizagem de um determinado campo de conhecimento, e nesse caso, das disciplinas escolares.

O livro didático tem uma estrutura básica que compreende uma divisão em unidades e capítulos que trazem textos, fórmulas, explicações ilustrativas, figuras, tabelas, exemplos demonstrativos e atividades de fixação da aprendizagem de determinada disciplina, sendo de grande importância para a aprendizagem formal dos alunos (LAJOLO, 1996).

Ao pesquisar literatura sobre a abordagem dos conteúdos disciplinares das questões da disciplina de Biologia nas provas do ENEM, foram encontradas poucas pesquisas (BUCK, 2009; BARNI, 2010; SANTOS; CORTALAZZO, 2013; SODRÉ NETO; MEDEIROS, 2018) que tratam dessa temática e, mesmo assim, os autores enfatizaram, às vezes, conteúdos específicos da disciplina, mas não todos como foram apresentados neste estudo. Assim, espera-se contribuir para enriquecer esta lacuna verificada.

Desta forma, foi possível verificar o perfil de questões de Biologia nas edições do ENEM dos anos de 2009 a 2019, mensurar a frequência da abordagem dos conteúdos, observar como eles se encontram distribuídos em uma coleção de livros didáticos e constatar se há ou não questões com caráter interdisciplinar.

2 | METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa descritiva e utilizou-se o método de Análise de Conteúdo (FRANCO, 2005) para categorizar as informações obtidas a partir das questões do ENEM em Unidades de Contexto e Unidades de Registro.

As provas do ENEM aplicadas nos anos de 2009 a 2019 foram obtidas no endereço eletrônico do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (Inep)¹; em seguida, buscou-se realizar a separação e a análise detalhada das questões, a fim de se obter a frequência dos temas de maior e menor recorrência.

Posteriormente, estes temas foram reagrupados nas Unidades de Contexto e de Registro considerando o conteúdo dos livros didáticos dos três anos do Ensino Médio. Inicialmente, foram analisadas as coleções de livros de Biologia para o 1º, 2º e 3º ano do Ensino Médio listadas no Guia Digital do Programa Nacional do Livro Didático (PNLD) 2018² que atualmente é o responsável pela distribuição dos livros didáticos pelo país.

Dentre as dez coleções analisadas, seis apresentaram distribuição idêntica de conteúdos entre cada ano do Ensino Médio: Biologia Celular e Bioquímica no volume para primeiro ano do Ensino Médio; o volume do segundo ano apresentava conteúdos acerca dos Seres Vivos e o volume para o terceiro ano apresentava basicamente os conteúdos de Genética, Evolução e Ecologia.

As quatro coleções restantes destoavam do padrão destas seis, uma vez que abordavam os mesmos conteúdos, porém eram apresentados em ordens diferentes nos livros, como, por exemplo, conteúdos trabalhados no primeiro ano do Ensino Médio eram abordados em livros do terceiro ano e vice-versa.

Por haver similaridade entre os conteúdos dos livros de seis coleções, realizou-se um sorteio entre elas e a coleção de livros Biologia Hoje (LINHARES; GEWANDSZNAJDER; PACCA, 2016) foi selecionada e utilizada como base para a distribuição dos conteúdos das questões de Biologia apresentadas nas avaliações do ENEM.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas as edições do ENEM compreendidas entre os anos de 2009 e 2019, considerando-se as aplicações regulares e as aplicações para Pessoas Privadas de Liberdade (PPL). De todas as questões da área “Ciências da Natureza e Suas Tecnologias” que envolvem as disciplinas Biologia, Física e Química, obteve-se um total de 363 questões com conteúdos de Biologia.

As questões foram selecionadas de acordo com os enunciados em busca de termos próprios da Biologia. As provas de Braille e Libras, quando aplicadas, também foram analisadas. No entanto, ao se constatar que as questões eram as mesmas das provas

1 Disponível em: <http://portal.inep.gov.br/provas-e-gabaritos>. Acesso em: 05 out. 2020.

2 Disponível em: <http://www.fnnde.gov.br/pnld-2018/>. Acesso em: 03 out. 2020.

regulares, elas não foram contabilizadas.

A Tabela 1 apresenta o número de questões e a porcentagem do total de questões de Biologia nas edições do ENEM de 2009 a 2019 distribuídas conforme as unidades temáticas dos livros didáticos selecionados.

Foram observadas as maiores frequências de questões sobre conteúdos dentro das unidades temáticas de “Célula: unidade da vida” do Volume 1 (12,67%) e das unidades “Ecologia” (14,60%) e “Biosfera e Poluição” (19,28%) do Volume 3, o que mostra a não homogeneidade dos conhecimentos de Biologia cobrados no exame, em relação ao que é abordado nos livros didáticos (Tabela 1). As outras questões do ENEM se enquadraram nas demais unidades dos livros didáticos dos três anos do Ensino Médio.

Unidades	Questões	
	n	%
1º ano do Ensino Médio (Volume 1)		
A química da vida	23	6,33
Célula: unidade da vida	46	12,67
Reprodução, desenvolvimento e tecidos	15	4,13
2º ano do Ensino Médio (Volume 2)		
Vírus e seres de organização mais simples	22	6,06
Plantas	25	6,9
Animais	30	8,26
Anatomia e fisiologia humanas	27	7,43
3º ano do Ensino Médio (Volume 3)		
Genética ³	31	8,53
Evolução	21	5,79
Ecologia	53	14,6
Biosfera e Poluição	70	19,3
Total	363	100

Tabela 1 - Distribuição das questões do ENEM com base nas unidades dos livros didáticos da coleção Biologia Hoje.

Fonte: Provas do ENEM (2009-2019); Coleção Biologia Hoje, Volumes 1, 2 e 3 (2016).

O Quadro 1 apresenta as unidades do livro didático Biologia Hoje, Volume 1, as Unidades de Contexto, nas quais foram considerados os capítulos dos livros, e as Unidades de Registro que são os conteúdos disciplinares das questões das provas do ENEM.

A Biologia Celular é um exemplo de conteúdo com grande relevância para o entendimento de como se processa a vida. Além de proporcionar a compreensão da

³ No referido livro, o título da unidade não está escrito literalmente desta forma. Neste caso, houve um agrupamento de duas Unidades literais (“Unidade 1 - Genética: o trabalho de Mendel” e “Unidade 2 - A genética depois de Mendel”) por apresentarem um conteúdo central comum: a Genética.

organização das unidades internas e básicas que compõem os seres vivos, é um conteúdo relevante para a formação do egresso do Ensino Médio (SANTOS; CORTELAZZO, 2013).

Título das unidades do livro	Unidade de Contexto	Unidade de Registro
A química da vida	<ul style="list-style-type: none"> • A água e os sais minerais • Carboidratos e lipídios • Proteínas e vitaminas 	“correlação entre nutriente e carência” “vias metabólicas” “enzimas”
Célula: unidade da vida	<ul style="list-style-type: none"> • Uma visão geral da célula • Membrana plasmática e citoplasma • - Respiração celular e fermentação • Fotossíntese e quimiossíntese • Núcleo, ácidos nucleicos e clonagem • Cromatina, cromossomos e a divisão celular 	“núcleo” “mitocôndria” “diferenciação celular” “ciclo celular” “meiose” “fotossíntese”
Reprodução, desenvolvimento e tecidos	<ul style="list-style-type: none"> • Reprodução assexuada e sexuada • Desenvolvimento embrionário • - Tecidos: epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso 	“pílula anticoncepcional” “formação de gêmeos” “tecidos animais” “tecidos do organismo”

Quadro 1 - Relação das questões do ENEM com as unidades do livro didático Biologia Hoje, Volume 1.

Fonte: Provas do ENEM (2009-2019); Coleção Biologia Hoje, Volume 1 (2016).

As inúmeras informações sobre atualizações científicas referentes às áreas de Biologia Molecular e Genética têm alcançado tanto a população acadêmica quanto o público em geral por meio de descobertas anunciadas em veículos de comunicação em massa e revistas científicas (PEDRANCINI *et al.*, 2007).

O Quadro 2 mostra a relação dos conteúdos das questões de Biologia das provas do ENEM de acordo com as unidades e os capítulos do Volume 2 do livro didático Biologia Hoje. No que se refere ao conteúdo que envolve os termos relacionados às unidades intituladas Plantas e Animais, Silva (2011) realizou um estudo sobre a percepção de estudantes a respeito da Matriz Curricular do ENEM e mostrou como resultados que, apesar de ser importante para formação dos alunos, o estudo da Botânica e Zoologia é algo complexo e abstrato, levando em consideração a classificação de plantas e animais em seus níveis de organização, e revelou ainda que não há muitos recursos didáticos que auxiliem uma melhor compreensão do conteúdo, sendo o livro didático muitas vezes o único à disposição.

Título das unidades do livro	Unidade de Contexto	Unidade de Registro
Vírus e seres de organização mais simples	<ul style="list-style-type: none"> • Patogenia e patologia relacionadas à interação parasito- hospedeiro • Nematódeos • Nutrição e cultivo de microrganismos • Metabolismo microbiano • Utilização de energia • Controle de microrganismos • Microrganismos de importância para saúde humana 	“doenças virais” “arbovírus” “protozoários” “unicelular e procarionte” “doenças bacterianas” “teoria da geração espontânea” “filamentos do fungo”
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Briófitas e pteridófitas • Gimnospermas e angiospermas • Morfologia das angiospermas • Fisiologia vegetal 	“grão de pólen” “ciclo de vida de angiospermas” “polinização” “características de raízes” “gemas apicais”
Animais	<ul style="list-style-type: none"> • Poríferos e cnidários • Platemintos e nematódeos • Moluscos e anelídeos • Artrópodes • Equinodermos e primeiros cordados • Peixes • Anfíbios e répteis • Aves e mamíferos 	“roedores” “aves” “artrópodes” “filo Chordata” “nematódeos” “molusco” “fisiologia de anfíbios” “mamíferos”
Anatomia e fisiologia humanas	<ul style="list-style-type: none"> • Nutrição • Respiração • Circulação • Sistema urinário • Sistema endócrino • Sistemas nervoso e sensorial 	“circulação sanguínea” “sistema somatossensorial” “sistema excretor” “função das vilosidades intestinais” “sistema nervoso”

Quadro 2 - Relação das questões do ENEM com as unidades do livro didático Biologia Hoje, Volume 2.

Fonte: Provas do ENEM (2009-2019); Coleção Biologia Hoje, Volume 2 (2016).

Em relação à unidade “Anatomia e fisiologia humanas”, as questões do ENEM analisadas apresentam termos referentes ao funcionamento dos sistemas do corpo humano, o que é abordado também nos capítulos do livro didático analisado. Os PCNs para o Ensino Médio ressaltam a importância de focalizar “as relações que se estabelecem entre os diferentes aparelhos e sistemas e entre o corpo e o ambiente, conferindo integridade ao corpo humano, preservando o equilíbrio dinâmico que caracteriza o estado de saúde” (BRASIL, 2000, p. 18).

As Unidades de Registro relacionadas aos capítulos e unidades do livro didático

Biologia Hoje, Volume 3, estão expostas no Quadro 3.

Título das unidades do livro	Unidade de Contexto	Unidade de Registro
Genética e extensões do mendelismo	<ul style="list-style-type: none"> • Primeira lei de Mendel • Segunda lei de Mendel • Grupos sanguíneos e polialelia • Interação gênica e pleiotropia • Ligação gênica • Sexo e herança genética • As aplicações da genética molecular 	<p>“Leis de Mendel” “investigação de paternidade” “fenótipo” “genótipo” “heredograma” “tipo de herança da doença” “inativação de genes” “código genético”</p>
Evolução	<ul style="list-style-type: none"> • Teorias sobre a origem da vida • Teoria sintética da evolução • Mecanismos evolutivos • Base genética da mudança evolutiva • Teoria da seleção natural • Especiação • Adaptação e seleção natural 	<p>“Teoria da recapitulação” “Origem das Espécies” “desaparecimento dos dinossauros” “conceito biológico de espécie” “especiação” “adaptação biológica” “deriva gênica” “seleção natural, artificial e sexual” “evolução de aves e vertebrados”</p>
Ecologia	<ul style="list-style-type: none"> • O campo de estudo da Ecologia • Cadeias e teias alimentares • Populações • Relações entre os seres vivos • Sucessão ecológica 	<p>“competição interespecífica” “predação” “cadeia alimentar” “nível trófico”</p>
Biosfera e Poluição	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclos biogeoquímicos • Distribuição dos organismos • Poluição 	<p>“efeito estufa” “aquecimento global” “poluição ambiental” “ciclo do nitrogênio”</p>

Quadro 3 - Relação das questões do ENEM com as unidades do livro didático Biologia Hoje, Volume 3.

Fonte: Provas do ENEM (2009-2019); Coleção Biologia Hoje, Volume 3 (2016).

De maneira geral, verificou-se o maior número de questões (48,22%) relacionadas a conteúdos abordados no 3º ano do Ensino Médio. Isso pode ter acontecido porque o 3º ano constitui a última etapa do Ensino Médio e ela costuma ser direcionada quase que exclusivamente para a preparação dos alunos para os processos seletivos e posterior ingresso nas instituições de ensino superior. É evidente a relevância social de temas atuais a respeito do meio ambiente, manipulação genética, aquecimento global, efeito estufa, bem como a relação entre o ser humano e a natureza, o que talvez justifique a grande quantidade de questões que abordam estas temáticas.

De acordo com Barni (2010), o ensino de Genética se faz necessário, pois ela é

reconhecida como um dos principais assuntos dentro da Biologia escolar, e abrange temas como hereditariedade, dinâmica do material genético quanto à sua transmissão, alterações e interações. Também é muitas vezes relatado como um conteúdo de difícil assimilação por apresentar vários conceitos complexos.

A problemática envolvendo temas relacionados a clonagem, emprego de células-tronco e organismos geneticamente modificados é discutida dentro e fora do ambiente escolar, levando as pessoas a apresentarem além de certo conhecimento, uma opinião formada sobre o assunto, por meio de uma reflexão sobre benefícios e malefícios e implicações éticas e sociais (PEDRANCINI *et al.*, 2007).

No caso da Ecologia, por se tratar de um conteúdo voltado para o meio ambiente, há de se esperar que exista certa preocupação para que os alunos não apenas a aprendam de forma teórica, mas que também possam associá-la ao contexto em que se encontram inseridos, ajudando na preservação da natureza. Segundo Mariani Júnior (2008), dominar a Ecologia permite que o aluno amplie sua visão sobre o mundo vivo, bem como a capacidade de interação com o meio ambiente, em comparação com outros seres vivos.

Alguns conteúdos, no entanto, sempre ganham destaque na mídia, principalmente por tratarem de problemas atuais, tais como a intervenção antrópica nos ecossistemas do mundo, problemas relacionados à poluição, o efeito estufa e o consequente aquecimento global. Conforme um estudo realizado por Buck (2009), os temas relacionados a impactos ambientais são os mais presentes nas provas do ENEM, com uma frequência mais alta do que todos os outros conteúdos, o que também pode ser verificado na Tabela 1. Depreende-se que as questões do ENEM que envolvem essa temática têm o propósito de levar o aluno a estabelecer relações entre o conhecimento e o mundo que o cerca, a fim de poder se posicionar criticamente frente ao problema.

Acerca da presença da interdisciplinaridade no período analisado, foram identificadas poucas ocorrências de questões com este perfil para o ENEM, sendo 29 (8,0%) entre as 363 questões. Isso vai ao encontro do que Sodré Neto e Medeiros (2018) verificaram em seu trabalho que, ao analisarem a abordagem de Microbiologia no ENEM entre os anos de 2009 a 2015, chegaram à conclusão de que as interações existentes foram mais expressivas entre assuntos dentro da Biologia, e não entre Biologia e outras disciplinas como Física e Química, por exemplo. Stadler e Hussein (2017), ao avaliarem a interdisciplinaridade entre os anos de 2009 a 2014, enfatizam a característica pouco interdisciplinar da prova, indicando que a contextualização é suficiente para a resolução da prova pelos estudantes. Essa baixa ocorrência de questões com caráter interdisciplinar vai de encontro ao que preconizam os Parâmetros Curriculares Nacionais para o Ensino Médio (BRASIL, 2000).

Considerando a complexidade do conceito de interdisciplinaridade, recomenda-se que os professores busquem promover atividades com o intuito de mostrar aos alunos situações cotidianas, a partir das quais eles sejam capazes de analisá-las de forma contextualizada e relacionar conteúdos de disciplinas de diferentes áreas do conhecimento

(OLIVEIRA *et al.*, 2020). Assim, será oportunizado aos estudantes uma formação mais abrangente que também atende aos objetivos do ENEM em sua maneira de avaliar competências e conhecimentos.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se inicialmente que, do total de 990 questões averiguadas em 22 provas analisadas, cada uma com 45 questões de Ciências da Natureza e suas Tecnologias, nas edições do ENEM no período de 2009 a 2019, pouco mais de um terço (36,6%) tratava sobre conteúdos de Biologia, o que é um valor esperado dentro da distribuição equitativa das três grandes áreas abordadas em Ciências da Natureza.

Sobre os conteúdos de Biologia mais recorrentes nas edições do ENEM, tais como “Biosfera e Poluição” (19,28%), “Ecologia” (14,60%) e “Célula: unidade da vida” (12,67%), ressalta-se que são assuntos de interesse à aprendizagem do aluno, pois envolvem temas que abordam a organização da vida desde um sistema mais simples até o mais complexo e tratam principalmente das consequências dos atos do ser humano sobre um ambiente ecologicamente equilibrado.

Sobre a coleção de livros didáticos utilizada, considera-se que foi de grande importância para a categorização dos temas abordados nas questões, pois contribuíram para a organização dos conteúdos disciplinares da disciplina de Biologia nos três anos do Ensino Médio e a compreensão dessa distribuição.

É importante destacar que no ano de 2018 foi homologada a Base Nacional Comum Curricular (BNCC) que é um documento que direciona o currículo de toda a Educação Básica, que compreende a Educação Infantil, o Ensino Fundamental e o Ensino Médio. Considerando as mudanças educacionais e curriculares propostas por este documento, é esperado que o Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (Inep) também altere a forma de trabalhar as habilidades e competências requeridas no ENEM, já que tanto o ENEM quanto a BNCC são de responsabilidade do Ministério da Educação (MEC).

Além de apresentar uma análise do conteúdo das questões da disciplina de Biologia do ENEM em comparação com uma coleção de livros didáticos do Ensino Médio, este artigo pode contribuir como auxílio a estudantes que irão prestar o exame ao, também, mostrar os conteúdos de maior ocorrência e sinalizar para que não fiquem atrelados somente ao que esse recurso didático explora, considerando competências e conhecimentos contextualizados exigidos pelo exame.

REFERÊNCIAS

BARNI, Graziela dos Santos. **A importância e o sentido de estudar genética para estudantes do terceiro ano do Ensino Médio em uma escola da Rede Estadual de Ensino em Gaspar (SC)**. 2010. 184f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Matemática) - Universidade Regional de Blumenau, Programa de Pós-graduação, Blumenau. 2010.

BRASIL. **Ministério da Educação. Parâmetros Curriculares Nacionais (Ensino Médio)**. Brasília, DF: Ministério da Educação. Assunto: matriz curricular do Ensino Médio, 2000.

BRASIL. **Matriz de referência do ENEM 2009**. Brasília. Disponível em: http://portal.mec.gov.br/dmdocuments/matriz_referencia_novoenem.pdf. Acesso em: 21 ago. 2020.

BUCK, Nick Kantorowicz. **A temática ambiental no Exame Nacional do Ensino Médio (ENEM)**. 2009. 65f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro. 2009.

CAMPOS, Raul Bueno Lins. **Análise técnica da matriz de referência do ENEM e dos itens de matemática das edições de 2012 a 2014**. 2015. 86f. Dissertação (Mestrado em Matemática) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

FRANCO, Maria Laura Puglisi Barbosa. **Análise de conteúdo**. 2. ed. Brasília: Liber Livro, 2005.

LAJOLO, Marisa. Livro didático: um (quase) manual de usuário. **Em Aberto**, Brasília, v.16, n. 69, p.3-9. 1996.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F.; PACCA, H. **Biologia Hoje**. 1 ed. São Paulo: Ática, 2016.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F.; PACCA, H. **Biologia Hoje**. 2 ed. São Paulo: Ática, 2016.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F.; PACCA, H. **Biologia Hoje**. 3 ed. São Paulo: Ática, 2016.

MARIANI JÚNIOR, Rafael. **O estudo de Ecologia no Ensino Médio: uma proposta metodológica alternativa**, 2008. 167f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências e Matemática) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MAZON, Luciano; TREVIZAN, Maria Auxiliadora. Fecundando o processo da interdisciplinaridade na iniciação científica. **Revista Latino-americana de Enfermagem** [online], v. 9, n. 4, p. 83-87, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-11692001000400014>. Acesso em: 10 ago. 2020.

MIRANDA, Elisângela Matias *et al.* ENEM 2009: articulações entre CTS, interdisciplinaridade e contextualização evidenciadas nas questões das Ciências da Natureza. In: VIII Encontro Nacional De Pesquisa em Educação em Ciências, 2011. Campinas. Anais eletrônicos... Campinas: Unicamp, 2011. Disponível em: http://abrapecnet.org.br/atas_enpec/viii/enpec/resumos/R0292-1.pdf. Acesso em: 06 ago. 2020.

OLIVEIRA, Leandro *et al.* Contextualização no ensino de Química: conexões estabelecidas por um professor ao discutir uma questão do ENEM em sala de aula. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 26, e20062, 2020.

PEDRANCINI, Vanessa Daiana *et al.* Ensino e aprendizagem de Biologia no Ensino Médio e a apropriação do saber científico e biotecnológico. **Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias**, Vigo, Espanha, v. 6, n. 2, p. 299-309. 2007. Disponível em: http://reec.uvigo.es/volumenes/volumen6/ART5_Vol6_N2.pdf. Acesso em: 19 ago. 2020.

SANTOS, Júlio Sérgio; CORTELAZZO, Ângelo Luiz Os conteúdos de biologia celular no Exame Nacional do Ensino Médio-ENEM. **Revista da Avaliação da Educação Superior**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 591-612, 2013.

SILVA, Cristiane Brandão da. **Percepções sobre a matriz curricular do ENEM para a disciplina de Biologia nas escolas de Santa Maria**, 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SODRÉ NETO, Luiz; MEDEIROS, Ariane Dantas de. Considerações sobre contextualização e interdisciplinaridade na abordagem da Microbiologia no novo Exame Nacional do Ensino Médio (ENEM). **Revista Ciências & Ideias**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 88-100, 2018.

STADLER, João Paulo; HUSSEIN, Fabiana Roberta Gonçalves e Silva. O perfil das questões de ciências naturais do novo Enem: interdisciplinaridade ou contextualização? **Ciência & Educação**, Bauru, n. 23, v. 2, p. 391-402, 2017.

TONETE, Débora Carvalho. **Análise do ensino-aprendizagem de biologia nos anos finais da educação básica, uma perspectiva dos conteúdos de Genética, Bioquímica, Fisiologia e Biologia Celular**. 2018. 41f. Monografia (Pós-Graduação em Educação: Métodos e Técnicas de Ensino). Universidade Federal Tecnológica do Paraná.

SOBRE O ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente é professora e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf-UFPI). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Agroextractivismo 123
Amazônia Paraense 106, 107, 112
Aprendizagem 151, 153, 160, 162
Araceae 123, 124, 129
Áreas de preservação ambiental 33
Atlantic Forest 75

B

Baía de Sepetiba 6, 141, 144
Botânica 1, 2, 5, 18, 83, 87, 88, 91, 92, 94, 152, 156

C

Cadeia Produtiva Local 106, 107
Citotoxicidade 44, 63

D

Diclofenaco de sódio 6, 130, 131, 132, 134, 136, 137, 138

E

Encapsulação 6, 130, 132, 134, 136, 137, 138
Enlatamento 141, 144, 147
Ensaio do cometa 63
Espécies reativas de oxigênio 46, 48, 63

F

Fibroblastos 47, 48, 96
Forest Inventory 75

H

História das Ciências 1

I

Império do Brasil 4, 1, 2, 18, 19

J

Joaquim Monteiro Caminhoá 4, 1, 3, 18, 19
Julocrotina 63

L

Leishmaniose 63

Lianas 74, 78, 79, 86, 87, 89, 90, 123, 124, 125, 126, 127, 128

M

Microscopia eletrônica de varredura 96

Molusco 141, 142, 144, 149, 157

N

Nanolubrificantes 20, 21, 28, 29, 30

Nanopartículas de celulose 4, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30

Nanossegurança 44

Nanotoxicidade 44, 45, 46

P

Pinus 33, 34, 35, 40, 41, 42

Plantas invasoras 33, 41

Plantas Medicinais 106, 107, 108, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120

Polipropilenoglicol 130, 131

Polissacarídeo de goma do cajueiro 130

S

Segurança Alimentar 141

Semi deciduous seasonal forest 75

Sensoriamento Remoto 33, 34, 41, 42

Surface charge of particles 51, 59

T

Taxa de desgaste 20, 23, 24, 27, 28, 29, 30

Técnicas de secagem e pós-fixação 96



www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

@atenaeditora 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

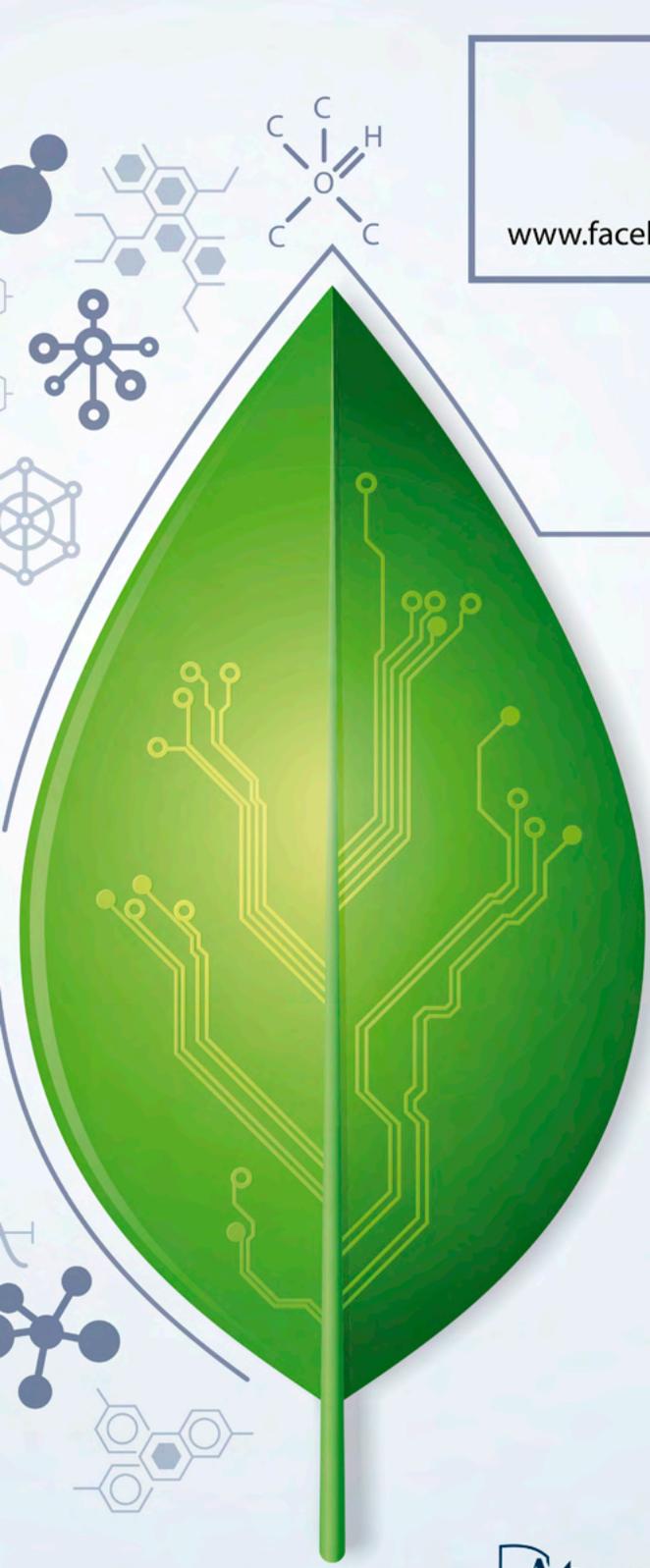
AGENDA GLOBAL

DE PESQUISA

EM CIÊNCIAS

BIOLÓGICAS

 **Atena**
Editora
Ano 2021



www.atenaeditora.com.br 
contato@atenaeditora.com.br 
[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 
www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

AGENDA GLOBAL

DE PESQUISA

EM CIÊNCIAS

BIOLÓGICAS