



A pesquisa em
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

3

Desafios atuais e perspectivas futuras

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

Atena
Editora
Ano 2021



A pesquisa em
CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS:

Desafios atuais e perspectivas futuras

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

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

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

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

A pesquisa em ciências biológicas: desafios atuais e perspectivas futuras 3

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Bruno Oliveira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Alana Maria Cerqueira de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P474 A pesquisa em ciências biológicas: desafios atuais e perspectivas futuras 3 / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-742-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.427210612>

1. Ciências biológicas. I. Oliveira, Alana Maria Cerqueira 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 Obra “A pesquisa em ciências biológicas: Desafios atuais e perspectivas futuras 3”, traz ao leitor vinte artigos de relevada importância na área de ciências biológicas. O Foco principal desta obra é a discussão e divulgação científica de pesquisas nacionais, englobando as diferentes áreas de atuação da biologia.

É indubitavelmente evidente o avanço científico nesta área, o que aumenta a importância e a necessidade de atualização e consolidação de conceitos, técnicas, procedimentos e temas.

As pesquisas estão divulgadas na forma de artigos originais e de revisões nos diferentes campos dentro das Ciências Biológicas suas subdivisões ou conexões. Portanto, englobando a: Genética, Biologia molecular, Microbiologia, Parasitologia, Virologia, Patologia e Ecologia. Produzindo assim uma obra transversal que vai do atendimento ao paciente a pesquisa básica.

A obra foi elaborada primordialmente com foco nos profissionais, pesquisadores e estudantes pertencentes às Ciências Biológicas e suas interfaces ou áreas afins. Entretanto, é uma leitura interessante para todos aqueles que de alguma forma se interessam pela área.

Cada capítulo foi elaborado com o propósito de transmitir a informação científica de maneira clara e efetiva, em português, linguagem acessível, concisa e didática, atraindo a atenção do leitor, independente se seu interesse é acadêmico ou profissional.

O livro “A pesquisa em ciências biológicas: Desafios atuais e perspectivas futuras 3”, traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propicia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Alana Maria Cerqueira de Oliveira

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

O PAPEL DO FATOR-1 INDUZÍVEL POR HIPÓXIA NA METÁSTASE


Túlio César Ferreira
Kelly Cristina Porcena Fortes
Thiago Sousa da Silva
Alexandre Pereira dos Santos
Eduardo Gomes de Mendonça
Elane Priscila Maciel
Beatriz Camargo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106121>

CAPÍTULO 2..... 22

DOENÇA PERIODONTAL NA COVID-19

Roberta Maria Pimenta Chadú
Ana Gabriela Aguiar Caetano Rezende
Juliana Barbosa de Faria
Taíssa Cássia de Souza Furtado
Sanívia Aparecida de Lima Pereira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106122>

CAPÍTULO 3..... 34

TESTES PARA AVALIAR RESISTÊNCIA DE UNIÃO EM ODONTOLOGIA: REVISÃO DE LITERATURA


Renata Vasconcelos Monteiro
Rodrigo Barros Esteves Lins
Vitor Schweigert Bona
Daniela Micheline dos Santos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106123>

CAPÍTULO 4..... 45

QUALIDADE DE VIDA E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE PACIENTES ONCOLÓGICOS EM QUIMIOTERAPIA

Dalton Luiz Schiessel
Eduarda Kaczuk Refosco
Gabriela Datsch Bennemann
Angélica Rocha de Freitas Melhem
Caryna Eurich Mazur
Mariana Abe Vicente Cavagnari

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106124>

CAPÍTULO 5..... 56

TESTE DO PEZINHO AMPLIADO NO SUS – EXAME PASSARÁ A RASTREAR MAIS DE 50 DOENÇAS RARAS

Fernanda Borgmann Reppetto
Sílvia Muller de Moura Sarmento


Rafael Tamborena Malheiros
Pietra de Vargas Minuzzi
Gênifer Erminda Schreiner
Guilherme de Freitas Teodósio
Laura Smolski dos Santos
Elizandra Gomes Schmitt
Gabriela Escalante Brites
Luana Tamires Maders
Mariana Larré da Silveira
Ilson Dias das Silveira
Vinicius Tejada Nunes
Vanusa Manfredini

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106125>

CAPÍTULO 6..... 70

IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ASSISTÊNCIA AO PACIENTE CRÔNICO DE ALTA DEPENDÊNCIA


Maria Helane Rocha Batista Gonçalves
Christian Raphael Fernandes Almeida
Jonisvaldo Pereira Albuquerque
Kelly Barros Marques
Cinara Franco de Sá Nascimento Abreu
Fernanda Colares de Borba Netto

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106126>

CAPÍTULO 7..... 83

INFECÇÃO URINÁRIA CAUSADA PELA BACTÉRIA OPORTUNISTA *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA


Camila Costa Mendes
Camila Santiago Pinheiro da Silva
Adayran Raposo Lacerda
Olnivânia Mayara Cardozo Almeida
Mari Silma Maia da Silva
Domingos Magno Santos Pereira
Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106127>

CAPÍTULO 8..... 92

RINITE ALÉRGICA E FUNÇÃO PULMONAR POR OSCILOMETRIA DE IMPULSO EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES


Décio Medeiros
Meyrian Luana Teles de Sousa Luz Soares
Marco Aurélio de Valois Correia Junior
Pedro Henrique Teotônio Medeiros Peixoto
Rita de Cássia da Silva Costa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106128>

CAPÍTULO 9..... 101

DENSIDADE DE INCIDÊNCIA DE *Enterobacteriales* MULTIRRESISTENTES NA UNIDADE NEONATAL DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL, DE 2010 A 2020

Felipe Crepaldi Duarte
Gerusa Luciana Gomes Magalhães
Thilara Alessandra de Oliveira
Alisson Santana da Silva
Gabrielle Feijó de Araújo
Tiago Danelli
Anna Paula Silva Olak
Marsileni Pelisson
Gilselena Kerbauy Lopes
Jaqueline Dario Capobiango
Eliana Carolina Vespero
Márcia Regina Eches Perugini

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4272106129>

CAPÍTULO 10..... 111

A INFLUÊNCIA DA ORIENTAÇÃO NUTRICIONAL NA DIETA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN


Ingrid da Silva Santos
Amanda Daniel
Natália Tonon Domingues
Lídia Raquel de Carvalho
Alice Yamashita Prearo
Cristina Helena Lima Delambert
Cátia Regina Branco da Fonseca

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061210>

CAPÍTULO 11..... 127

POTENCIAL PATOGÊNICO E TIPAGEM MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES ISOLADAS EM VÁRIOS PAÍSES

André Pitondo da Silva
Mariana de Oliveira-Silva
Rafael Nakamura da Silva
Miguel Augusto de Moraes
Rafael da Silva Goulart
Amanda Kamyla Ferreira da Silva
Gisele Peirano
Johann DD Pitout

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061211>

CAPÍTULO 12..... 147

DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS HOSPITALARES DE *Staphylococcus aureus*

Tiago Danelli
Felipe Crepaldi Duarte

Thilara Alessandra de Oliveira
Ana Paula Dier
Maria Alice Galvão Ribeiro
Stefani Lino Cardim
Gerusa Luciana Gomes Magalhães
Guilherme Bartolomeu Gonçalves
Marsileni Pelisson
Eliana Carolina Vespero
Sueli Fumie Yamada-Ogatta
Márcia Regina Eches Perugini

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061212>

CAPÍTULO 13..... 157

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Kielmeyera coriacea* MART. & ZUCC. NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* L


Carla Spiller
Maria de Fatima Barbosa Coelho
Elisangela Clarete Camili
Ludmila Porto Piton
Sharmely Hilares Vargas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061213>

CAPÍTULO 14..... 168

RELATOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANA


Eduardo Henrique Santos Guedes
André Leonardo dos Santos
Andréia Ibiapina
Camila Mariane da Silva Soares
Aynaran Oliveira de Aguiar
Patrícia Oliveira Vellano
Lucas Samuel Soares dos Santos
Gessiel Newton Scheidt
Marcos Giongo
Aloísio Freitas Chagas Junior

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061214>

CAPÍTULO 15..... 185

ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS: ESTRATÉGIA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA EM PODCAST DE SCIENCETELLING E EDUTRETENIMENTO

Juliana Galvão de Carvalho Argento
Waldiney Mello


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061215>

CAPÍTULO 16..... 196

EFEITOS DOS NEONICOTINOIDES EM *Apis mellifera* E IMPACTOS SOBRE A

POLINIZAÇÃO


Daiani Rodrigues Moreira
Adriana Aparecida Sinópolis Giglioli
Cinthia Leão Figueira
Douglas Galhardo
Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061216>

CAPÍTULO 17..... 211

BURITI (*Mauritia flexuosa* L): IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E OS IMPACTOS DA AÇÃO HUMANA SOBRE A POPULAÇÃO DE BURITIZEIROS EM CIDADES DA REGIÃO LESTE MARANHENSE


Milton de Sousa Falcão
Francisca das Chagas Oliveira
Glaziane Soares Alvarenga
Claudio Wesley Diniz do Carmo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061217>

CAPÍTULO 18..... 218

GRUPOS FUNCIONAIS DO FITOPLÂNCTON COMO INDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO PONTE DE PEDRA (MT/MS, BRAZIL)


Camila Silva Favretto
Simoni Maria Loverde-Oliveira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061218>

CAPÍTULO 19..... 233

NOVO USO PARA O FILTRO EM PROFUNDIDADE CLARISOLVE® EM SUBSTITUIÇÃO À CENTRIFUGAÇÃO CLÁSSICA NA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO SELETIVA


Mirian Nakamura Gouvea
Bruna de Almeida Rocha
Alexandre Bimbo
Juliana Roquetti dos Santos
Elisabeth Christina Nunes Tenório
Victor Gabriel Abramant de Sousa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061219>

CAPÍTULO 20..... 245

VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS: TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA FARINHEIRA

Ágata Silva Cabral
Mariane Daniella da Silva
Crispin Humberto Garcia-Cruz

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.42721061220>

SOBRE A ORGANIZADORA.....	258
ÍNDICE REMISSIVO.....	259

O PAPEL DO FATOR-1 INDUZÍVEL POR HIPÓXIA NA METÁSTASE

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 16/09/2021

Túlio César Ferreira

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

<http://lattes.cnpq.br/8973534977251583>

Kelly Cristina Porcena Fortes

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

Thiago Sousa da Silva

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

Alexandre Pereira dos Santos

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

<http://lattes.cnpq.br/2750971103839625>

Eduardo Gomes de Mendonça

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

<http://lattes.cnpq.br/8989382342757236>

Elane Priscila Maciel

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

<http://lattes.cnpq.br/1441611405331165>

Beatriz Camargo

Centro Universitário ICESP
Brasília – DF

<http://lattes.cnpq.br/7668346609920675>

RESUMO: O câncer é um crescimento descontrolado das células onde ocorre um conjunto de várias falhas acumuladas ao longo de anos levando um descontrole do ciclo celular. O desenvolvimento do câncer fornece as células mutantes vantagens proliferativas e de sobrevivência. Uma das características mais marcantes do tumor sólido é a hipóxia, que atua como um selecionador de células mutantes para melhor adaptação em um ambiente inóspito. Neste cenário de hipóxia, tumores malignos secretam sinais ativando uma potente proteína heterodimérica, o Fator-1 Induzido por Hipóxia (HIF-1), responsável por controlar esse *feedback* celular em frente à hipóxia. Portanto, as células cancerígenas utilizam o HIF-1 como mecanismo de sobrevivência à hipóxia e a falta de nutrientes. O propósito deste trabalho é investigar qual o papel do HIF-1 nos tumores sólidos e qual a sua relação com a metástase, pois no câncer de tumor sólido o HIF -1 é regulado, principalmente, pela hipóxia tumoral, que levará a estabilização dessa proteína, fazendo com que seja expressa e ativada, para assim poder atuar. Conforme a necessidade, poderá vir a regular e a mediar diversos genes para sobrevivência, crescimento e, por fim, possa sofrer metástase. Levando a concluir que o HIF-1 medeia o crescimento tumoral, levando-os a alcançar os vasos sanguíneos de tecidos próximos, por meio da angiogênese, atingindo a circulação, e assim ocorra a metástase. E por estar envolvido coordenando diversos genes da cadeia metastática, o HIF-1 vem se tornando atrativo para novas estratégias terapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: Genes alvos; Hipóxia;

Alvos terapêuticos; Tumor; Efeito de Warburg.

THE ROLE OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 IN METASTASIS

ABSTRACT: Cancer is an uncontrolled growth of cells wherein a set of several failures accumulated over the years that occurs leading to a loss of the cell cycle control. The development of cancer cells provides mutant proliferative and survival advantages. One of the most striking features of solid tumor is hypoxia, which acts as a selector of mutant cells for better adaptation in an inhospitable environment. In this scenario of hypoxia, malignant tumors secrete signals that activate a potent heterodimeric protein, the Hypoxia Induced Factor-1 (HIF-1), responsible for controlling this cellular feedback in front of hypoxia, however, the cancer cells use HIF-1 as a mechanism of survival to hypoxia and lack of nutrients. The purpose of this work is to investigate the role of HIF-1 in solid tumors and its relation to metastasis, because in solid tumor cancer, HIF-1 is mainly regulated by tumor hypoxia, which will lead to the stabilization of this protein, and it is expressed and activated, in order to be able to act. As needed, it may regulate and mediate several genes for survival, growth, and ultimately, metastasis. In conclusion, HIF-1 mediates tumors growth, leading them to reach the blood vessels of nearby tissues, through angiogenesis, reaching the circulation, and thus metastasis. And because it is involved by coordinating several genes in the metastatic chain, HIF-1 has become attractive for new therapeutic strategies.

Keywords: Target genes; Hypoxia; Target therapeutic; Tumor; Warburg effect

1 | INTRODUÇÃO

Os organismos aeróbios precisam adequadamente de oxigênio (O_2) para a sobrevivência, pois é um gás de extrema importância, principalmente, para respiração celular (WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016). As células têm mecanismos extras e intracelulares que monitoram a homeostase de O_2 , pois, para a maioria dessas células ele é necessário para a produção adequada de ATP e, dessa forma, fazerem corretamente as suas funções metabólicas. Alterações nos níveis de O_2 , a privação (hipóxia) ou excesso (hiperóxia), podem acarretar danos irreparáveis (ZIELLO; JOUIN e HUANG, 2007; FERREIRA, 2006). Mas nem sempre a hipóxia é maléfica, possuindo função de suma importância, sendo benéfica na fisiologia e no desenvolvimento de mamíferos (CASTRO, 2014; ZIELLO; JOUIN e HUANG, 2007), visto que é considerado hipóxia, apenas quando a quantidade de O_2 encontra-se a patamares críticos de disponibilidade (CASTRO, 2014; FRAGA, RIBEIRO e MEDEIROS, 2009).

Entretanto, há um fator que regula o *feedback* celular em frente à hipóxia e, também, da homeostase do O_2 , o fator-1 de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1), que vai ativar genes que possuem o intuito de aumentar a acessibilidade e a ajustar o metabolismo em frente à privação de oxigênio (FRAGA, RIBEIRO e MEDEIROS, 2009). Trata-se de proteína heterodimérica, composta por duas subunidades, a subunidade beta (HIF-1beta) e a alfa (HIF-1alfa), que é altamente expressa apenas em estado de hipóxia (CASTRO, 2014; SEMENZA, 2010). Todavia, variados fatores podem regular e inativar o HIF-1 (CASTRO,

2014; FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009). O principal regulador é o oxigênio, também os oncogenes podem estabilizar ou degradá-la. Outro fator de regulação é a hipóxia tumoral (FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009), as quais para sobreviverem induzem a angiogênese, por possuírem uma grande demanda energética (ZIELLO; JOUIN e HUANG, 2007), formando vasos sanguíneos desorganizados e com uma inadequada estrutura. Há estudos que propõe a relação de angiogênese/metástase, o que leva a acreditar que existe uma correlação com a superexpressão do HIF-1 (FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009), pois, é o principal indutor da angiogênese (ZIELLO; JOUIN e HUANG, 2007).

Além de tudo, o HIF-1 encontrar-se, ainda envolvido em diversas etapas do processo metastático, a principal causa de morte relacionada ao câncer e a superexpressão do HIF-1 foi associada à dificuldade no tratamento e na queda da sobrevida (WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016). Por isso o objetivo deste trabalho, é abordar qual o papel do HIF-1 nos tumores sólidos e a qual a sua relação nas metástases.

2 | METODOLOGIA

Foi feito uma revisão bibliográfica de artigos pesquisados em bancos de dados online PUBMED, LILACS, MEDLINE, entre os períodos de 2008 à 2018, salvo os de importância científica, utilizando como palavras-chave: *hipoxia inducible-factor 1; hif-1 and metastases; target genes e metabolism*. Também foram utilizados alguns livros e tese de doutorado.

3 | REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

O câncer é um crescimento descontrolado das células, um conjunto de várias falhas acumuladas ao longo dos anos, e que não obedecem aos controles do ciclo celular genético (LODISH *et al.*, 2005, p. 933). Com o passar dos anos, na vida adulta, a regulação gênica desde o nascimento, crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular, perdem gradativamente esse mecanismo de regulação (SANTOS, 2013, p. 23). O desenvolvimento do câncer é um resultado de células com mutações que fornecem sobrevivência e vantagens proliferativas (FEITELSON *et al.*, 2015).

As neoplasias (novo crescimento) são classificadas como benignas ou malignas (INCA, 2011, p. 19; LODISH *et al.*, 2005, p. 935). Neoplasias benignas ou tumores benignos assemelham-se as células normais em termos de funcionalidade, crescimento lento e organizado. Podem formar uma capa fibrosa delimitando sua extensão, tornando-se um bom alvo para cirurgia. Porém, seu tamanho pode interferir na função normal de algum órgão (LODISH *et al.*, 2005, p. 935).

Em contraste, neoplasias malignas ou tumores malignos, são mais agressivos, crescem de maneira descontrolada e se dividem mais rapidamente (LODISH, *et*

al. 2005, p. 935). Duas habilidades cruciais para o câncer maligno é a imortalidade celular, produzindo inúmeros descendentes e a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos (SCHULTZ, 2011, p. 1040). Quando esses tumores crescem, podem alcançar outros tecidos próximos, principalmente o sistema circulatório, criando a metástase, que é uma proliferação secundária (LODISH *et al.* 2005, p. 935).

3.2 Câncer e hipóxia

A formação do tumor e a distância dos vasos sanguíneos que transportam oxigênio e nutrientes criam um ambiente inadequado para sobrevivência das células mutantes (IKEMORI e SAITO, 2013, p. 142). Em um cenário de hipóxia (baixa concentração de oxigênio), os tumores malignos, secretam sinais angiogênicos, ativando uma potente proteína, o fator-1 induzível por hipóxia (HIF-1alfa), que por sua vez, ativa a transcrição de genes pró-angiogênicos como o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) (ALBERTS *et al.*, 2010, p. 1210-1211), Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (BFGF), Fator de Crescimento Tumoral alfa (TGF α) (LODISH *et al.*, 2005, p. 936) (Figura 1).

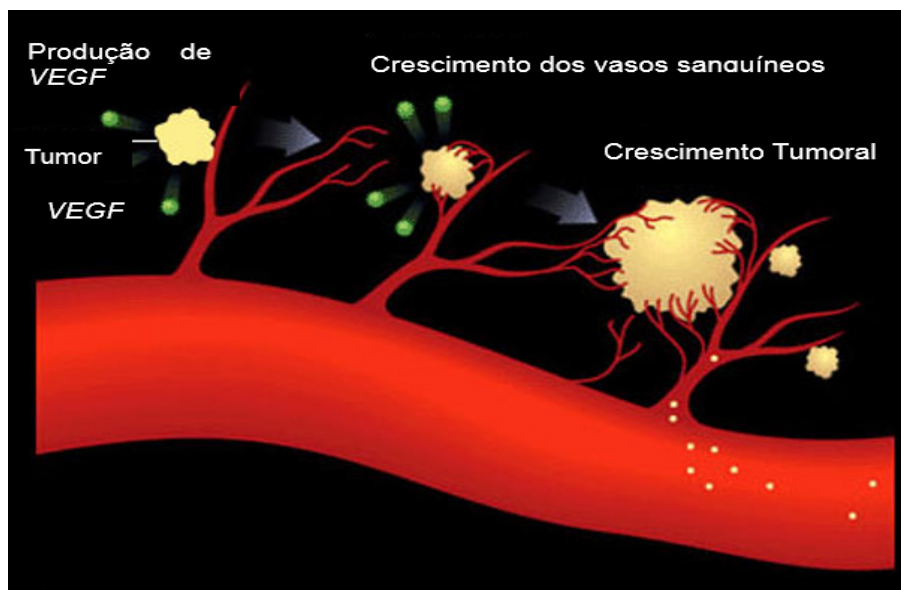


Figura 1. Mecanismo de ativação tumoral pela secreção do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) promovendo o crescimento de novos vasos sanguíneos permitindo a progressão do crescimento tumoral. Fonte: Rampling *et al.* (1994).

A hipóxia atua como um selecionador de células mutantes que poderão se adaptar melhor em um ambiente inóspito (ALBERTS *et al.*, 2010, p. 1210). A condição de hipóxia no microambiente tumoral cria um pH baixo atingindo valores iguais a 5,8, sendo a média

igual 7, comparando com o tecido normal que é de 7,5. O pH baixo é uma consequência da produção de lactato, fruto do metabolismo anaeróbico, que acidifica o ambiente, uma característica de tumores malignos, importante para metástase e ruim para o tratamento com quimioterapia e radioterapia (MACHADO e CHAMMAS, 2013, p. 161-162). Por isso a primeira mudança diferenciadora entre células neoplásicas e normais é a taxa de proliferação de células elevada e a diminuição da morte celular, por causa da elevação da expressão dos fatores de sobrevivência e crescimento (SONI e PADWARD, 2017).

4 | FATOR-1 INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF)

4.1 Estrutura

O fator-1 induzido por hipóxia (HIF) é uma proteína heterodimérica que foi descoberta no ano de 1991 por Wang e Semenza (SEMENZA *et al.*, 1991) quando se estudava a hipóxia induzida pela eritropoiese (KOYASU *et al.*, 2018; HUBBI e SEMENZA, 2015; MASOUND e LI, 2015). O HIF-1 regula a hipóxia (PALAZON *et al.*, 2014), atuando como um fator de transcrição, detectando e respondendo à baixa nos níveis de oxigênio tecidual (WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016), além de regular a homeostase do oxigênio (SAMANTA *et al.*, 2014). Composto-se de duas subunidades: uma subunidade alfa (HIF-1alfa) e outra beta (HIF-1beta) (Figura 2). Observa-se que ambas as proteínas possuem domínios importantes para formar o heterodímero e permitir a ligação do HIF-1 em regiões específicas dos genes alvos (bHLH-PAS-A/B). Outro domínio pode ser encontrado tanto na subunidade alfa como na beta, o qual está relacionado com a regulação da sua estabilidade pós-traducional e transativação, o domínio TAD (domínio de transativação), entretanto, a subunidade HIF-1beta possui apenas um, o domínio C-TAD (ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007). Os outros têm somente na subunidade alfa: o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) (região onde ocorre o controle da sua estabilização na ausência de oxigênio), dois domínios de transativação (TAD) (região importante onde se ligam proteínas acessórias na transcrição de genes-alvos) e domínios de sinalização nuclear (NSL- localizado nas regiões C-TAD e N-TAD; região necessária para direcionar o HIF-1 para a região nuclear após a sua síntese) (SONI e PADWARD, 2017) e domínio inibitório (ID ou IH) e regula negativamente os domínios de transativação (SONI e PADWARD, 2017; PAWLUS *et al.*, 2013).

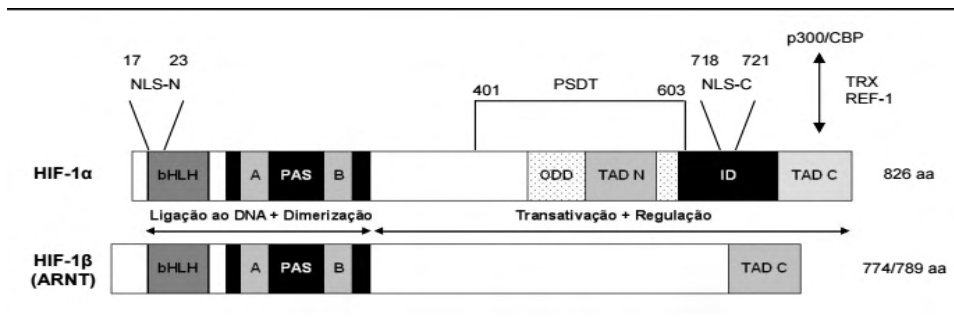


Figura 2. Representação esquemática das proteínas que constituem as duas subunidades do HIF-1 humano (FERREIRA, 2006).

A subunidade alfa é sensível ao oxigênio, enquanto que a subunidade beta é onipresente e constitutivamente expressa. A subunidade beta (HIF-1beta) é também conhecida como ARNT (sigla em inglês para translocador nuclear do receptor de aril hidrocarboneto) (WIGERUP, PAHLMAN e BEXELL, 2016; CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016).

A subunidade HIF-1beta é uma proteína nuclear, enquanto que a subunidade HIF-1 alfa é transportada do citoplasma para núcleo somente em condições de hipóxia (LATHA e SADDALA, 2017).

A heterodimerização da subunidade HIF-1 alfa e HIF-1 beta se dá através dos domínios HLH e PAS, de ambos. O HIF-1 ativo reconhece e se liga aos elementos de resposta à hipóxia (HRE) presentes em centenas de genes (MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010). Além do mais, o bHLH-PAS são essenciais para permitir que haja a heterodimerização (MASOUND e LI, 2015), portanto, o que regula essa dimerização entre as subunidades são essa interação entre os domínios bHLH de ambos (FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009).

O domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) da subunidade HIF-1 alfa, fica dentro do qual se encontram localizados os domínios de transativação (TADs) (WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016). O ODD trata-se de um domínio contendo os aminoácidos serina e prolina, que são importantes na estabilização da proteína, sendo que o N-TAD é responsável por estabilizar e o C-TAD modular a transcrição de genes alvos (SONI e PADWARD, 2017) em condições de hipóxia (YU; TANG e SUN, 2017).

Atualmente já existe um melhor conhecimento sobre a família dos fatores de transcrição, visto que há três isoformas da subunidade alfa: o HIF-1 alfa, HIF-2 alfa e HIF-3 alfa (SALLAIS *et al.*, 2017; SPIRINA *et al.*, 2017; CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016). (Figura 3). O HIF-1 alfa é expresso em todas as células, porém, as outras (HIF-2 alfa e 3 alfa) são expressos em apenas em alguns tecidos, visto que a subunidade HIF-3 alfa é a menos estudada (MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010; CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016). O HIF-1 alfa e 2 alfa possuem um domínio de transativação

N-terminal e outro C-terminal (N-TAD e C-TAD) e ambos atuam como reguladores positivos da transcrição enquanto o HIF-3alfa só possui o N-TAD (YU; TANG e SUN, 2017).

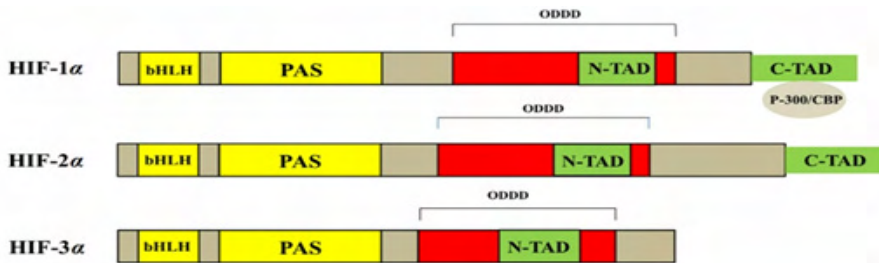


Figura 3. Representação esquemática das isoformas do HIF-alfa e os domínios funcionais (bHLH, PAS, TAD). HIF 1 α e HIF-2 α compartilham alto grau de semelhança de sequência de aminoácidos e ambos têm dois domínios de transativação (TADs) distintos (C-TAD e N-TAD), que são importantes para a interação com co-ativadores da transcrição. Em contraste, o HIF-3 α tem apenas N-TAD (MASOUND e LI, 2015).

4.2 HIF-1: Regulação e Expressão

Os mecanismos reguladores que possuem o maior impacto sobre a atividade do HIF-1 alfa, são aqueles que ocorrem por meio de modificações pós-traducionais da proteína HIF-1 alfa (KOYASU *et al.*, 2018). Entre os principais mecanismos reguladores pós-traducionais da estabilidade da subunidade HIF-1 alfa a disponibilidade de oxigênio e é considerada a crucial (PALAZON *et al.*, 2014; SEMENZA, 2012). A regulação acontece em níveis múltiplos, porém, o mais influente mecanismo é aquele mediado pela dependência de enzimas dioxigenase e pelo sistema mediado pela via ubiquitina-proteassoma, os quais levam à degradação da subunidade HIF-1 alfa quando há a disponibilidade de oxigênio no tecido (KOYASU *et al.*, 2018). Todavia, geralmente, o HIF-alfa encontra-se em altos níveis de expressão em situações de hipóxia (DEVINE *et al.*, 2017), pressupondo que há diferenças nos mecanismos de regulação e expressão da subunidade alfa em relação ambientes hipóxico e normóxico.

A normóxia é responsável pela regulação negativa do HIF-alfa (MASOUND e LI, 2015). Sob essa condição o HIF-1 alfa possui uma meia-vida curta, logo é degradado rapidamente (HUBBI e SEMENZA, 2015; MASOUND e LI, 2015) pelo sistema proteassômico. O tempo de meia-vida é em torno de 5-10 minutos (MASOUND *et al.*, 2015), ocorrendo a degradação do HIF-1 alfa antes mesmo da sua translocação para o núcleo (PARK *et al.*, 2017). Um grupo de proteínas dioxigenases (MASOUND e LI, 2015; BROCATO; CHERVOSA e COSTA, 2014), conhecidas como prolil hidroxilases (PHD 1, PHD 2 e PHD 3) estão ativadas em condições de normóxia e fazem a hidroxilação do HIF-1 alfa, em resíduos específicos de prolina (posições 402 e 564) presentes no domínio de degradação dependente (ODD) do HIF-1 alfa. Após à hidroxilação do HIF-1 alfa a proteína supressora de tumor von Hippel-Lindau (VHL), a qual faz parte de um complexo de ubiquitinação, liga-se a estes resíduos de prolinas hidroxilados e

mediará a degradação pela via proteossômica, (KOYASU *et al.*, 2018; SALLAIS *et al.*, 2017; CHEN e LOU, 2017).

As enzimas dioxigenases usam o 2-oxoglutarato (2-OG) e o oxigênio como substratos para hidroxilarem os resíduos de prolina do HIF-1alfa, além de requerem co-fatores como ferro (2+) e ascorbato (CHEN e LOU, 2017; MASOUND e LI, 2015; BROCATO; CHERVOSA e COSTA, 2014). Por isso, para haver a hidroxilação de resíduos de prolina é preciso de níveis suficiente de oxigênio (MASOUND e LI, 2015), e, além do mais, a hidroxilação servirá como forma de sinalizador para pVHL, o qual marcará a subunidade alfa para ser degradada (WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016).

Outra hidroxilase que possui um papel importante na inativação do HIF-alfa em condições de normóxia é o Fator Inibidor do HIF-1 (FIH1) (KOYASU *et al.*, 2018; SALLAIS *et al.*, 2017; CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016) ou asparaginil hidroxilase (MASOUND e LI, 2015). Esse fator regula a atividade transcricional do HIF-alfa. O resíduo de asparagina (posição 803) que é hidroxilado pelo FIH1 se localiza no domínio C-TAD do HIF-1alfa, que quando hidroxilado impede sua ligação com o seu co-ativador transcricional, o p300/CBP (SALLAIS *et al.*, 2017; PALAZON *et al.*, 2014). O FIH1 atua principalmente na região nuclear regulando o complexo de transcrição do HIF-1 (impede formação do complexo HIF-1 e coativadores p300/CBP), enquanto que as PHDs atuam na região citoplasmática regulando a sua estabilidade (LIANG *et al.*, 2015). Em resumo a via de regulação dependente do oxigênio têm uma série de modificações pós-traducionais, a via que envolve o pVHL que regula a estabilidade da subunidade alfa, e a via que independe de pVHL, via do FIH-1, a qual regula a transativação do HIF-1 (MASOUND e LI, 2015).

Sob hipóxia as PHDs são inativadas (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016; HUBBI e SEMENZA, 2015) e o FIH1 é inibido (SALLAIS *et al.*, 2017), ou seja, haverá uma diminuição na hidroxilação dependente dessas proteínas (PALAZON *et al.*, 2014), deixando o HIF-alfa livre para ser transcionalmente ativo (SALLAIS *et al.*, 2017). Isto levará a estabilização da proteína HIF-1 alfa, além de adquirir características de transativação (KOYASU *et al.*, 2018), ou seja, haverá o transporte da subunidade HIF-alfa para dentro do núcleo (YANG, N. *et al.*, 2016; ZEPEDA *et al.*, 2014). Desta forma, ocorrerá um acúmulo da subunidade HIF-1alfa (BURROUGHS *et al.*, 2014) e o mesmo irá interagir com a subunidade HIF-1beta, formando o heterodímero HIF-1 ativo (CASTRO, 2014; MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010).

Um complexo de transcrição será formado no núcleo; é a junção do HIF heterodímero com os co-ativadores (p300/CBP) (BURROUGHS *et al.*, 2014), que irá se ligar ao DNA em locais específicos contendo uma sequência de nucleotídeos 5'-RCGT-3' (R= purina, A ou G) dentro dos Elementos Responsivos à Hipóxia (HREs) (HU *et al.*, 2014; BURROUGHS *et al.*, 2014), que são regiões promotoras dos genes alvos (SALLAIS *et al.*, 2017; WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL, 2016; HU *et al.*, 2014) localizado ao redor ou nas regiões promotoras de cada gene (KOYASU *et al.*, 2018) e assim ativa a transcrição de centenas de genes alvos

com o intuito de coordenar a resposta à hipóxia (SALLAIS *et al.*, 2017; HUBBI e SEMENZA, 2015; PAWLUS *et al.*, 2013). Portanto, são nas células e tecidos submetidos às condições de hipóxia em que se pode encontrar um alto nível de expressão do HIF-1 alfa e detectar seus genes alvos (KOYASU *et al.*, 2018).

Além das vias já citadas, outras vias podem regular os HIF-1 alfa que não dependem de hipóxia (ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007), como fatores de crescimento, citocinas (MASOUND e LI, 2015; TANG e YU, 2012; ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007) e outras vias de sinalização como a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a via Proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) (TANG e YU, 2012; ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007).

5 | METABOLISMO

O oxigênio é um elemento essencial para que ocorra a produção adequada de ATP na mitocôndria das células aeróbias para que assim atividades metabólicas possam ser realizadas de forma eficiente (ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007).

Quando o oxigênio é acessível, a célula produz a maior parte de ATP pela via da fosforilação oxidativa, porém, no ambiente hipóxico ocorre uma mudança para o metabolismo anaeróbico, possibilitando a produção de energia. Porquanto, o HIF-1 é o principal coordenador dessa mudança, através da indução de várias enzimas glicolíticas e dos Transportadores de Glicose (*GLUTs*) (MASOUND e LI, 2015; BURROUGHS *et al.*, 2014; SEMENZA, 2012; ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007). Segundo Semenza (2012), o HIF-1 medeia a transição do metabolismo oxidativo para o glicolítico através da regulação de quatro fatores; PDK1, LDH-A, BNIP3 e BNIP3L. O PDK1 codifica a Piruvato Desidrogenase Quinase 1 que fosforila e inativa a enzima Piruvato Desidrogenase (PDH), inibindo assim a conversão de Piruvato em Acetil-Coenzima A para entrada no ciclo TCA (ácido tricarbóxico). O *LDHA* codifica Lactato Desidrogenase A que converte o piruvato em lactato, e a *BNIP3* e *BNIP3L* medeiam a autofagia seletiva mitocondrial (DAI *et al.*, 2017; ZIELLO; JOVIN e HUANG, 2007).

Como resultados da glicólise anaeróbica temos a diminuição da produção de EROs (espécies reativas de oxigênio), gerada pela fosforilação oxidativa e o acúmulo do lactato, que se não for evitada poderá levar a acidose hipóxica, acarretando na diminuição do pH intracelular, em dano celular e a morte. No entanto, o HIF-1 ativa a síntese de transportadores de monocarboxilato (por exemplo, MCT) que expulsa o lactato para o espaço extracelular (DAI *et al.*, 2017; BURROUGHS *et al.*, 2014) e CA-9 e -12, (enzimas anidrases carbônicas 9 e 12), que usam o gás carbono (CO_2) para gerar bicarbonato (HCO_3^-) para minimizar os efeitos da acidose e aumentar sobrevivência celular (BURROUGHS *et al.*, 2014).

6 | EFEITO WARBURG

As células tumorais mesmo na presença de ambientes em condições normais de tensão de oxigênio utilizam preferencialmente a via glicolítica como via geradora de energia, fenômeno conhecido como efeito Warburg, e o HIF-1 α possui um papel central nessa mudança no metabolismo, da fosforilação oxidativa de glicose para a glicolítica (MASOUND e LI, 2015), que, contudo, é menos eficiente (DAI *et al.*, 2017; MASOUND e LI, 2015). A glicólise ocorre no citosol, produzindo duas moléculas de ATP, contra 38 produzidas a partir da oxidação da glicose na mitocôndria (DAI *et al.*, 2017). Além disso, o HIF, influencia as várias vias chaves do metabolismo do tumor e são elas as vias das pentoses fosfatos (PPP), lipídios, ácidos nucleicos e metabolismo dos aminoácidos (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016; MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010).

No início da década de 1920, Otto Warburg descreveu pela primeira vez um fenômeno chamado de glicólise aeróbica ou efeito Warburg (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016; LU; TAN e CAI, 2015), propondo a ideia em que há uma diferença no metabolismo tumoral e metabolismo de uma célula normal, que depende de glicólise para produção de energia, mesmo havendo oxigênio (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016; PAVLIDES *et al.*, 2009). Definindo, o efeito Warburg é um fenômeno onde a maioria das células cancerosas usa uma alta taxa de glicose para produção de energia, mas não através da fosforilação oxidativa, mesmo que haja disponibilidade de oxigênio. Do qual, é considerado uma assinatura característica das células tumorais (LEE, S. *et al.*, 2017; BAN *et al.*, 2017) (Figura 4)

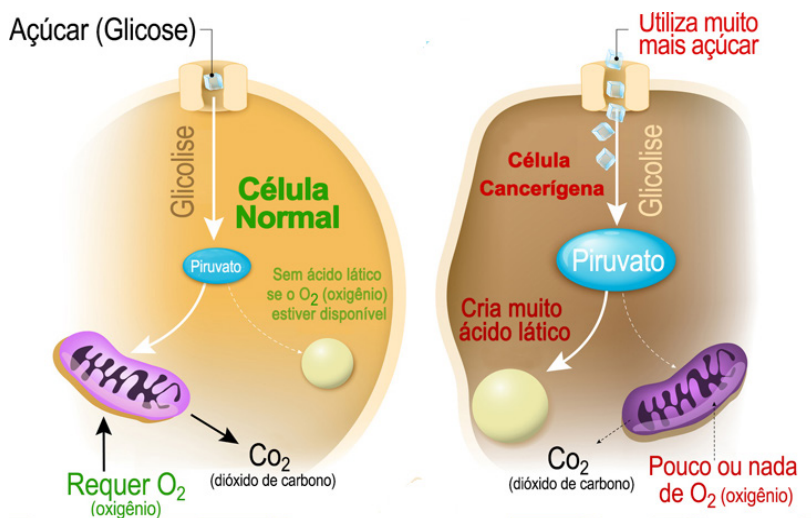


Figura 4. Diferenças metabólicas entre uma célula normal e uma célula cancerígena. Quando há uma disponibilidade de oxigênio, em uma célula normal a glicose gera energia principalmente pela fosforilação oxidativa na mitocôndria, enquanto em uma célula cancerígena ocorre a glicólise aeróbica no citosol. Fonte: GeneWei.com.

Havia uma ideia em que as células usam glicose apenas para produzir ATP quando não há oxigênio disponível. Porém, houve uma mudança quanto a isto, pois, já se sabe que as células mudam o metabolismo oxidativo para glicolítico antes mesmo de ocorrer a limitação da disponibilidade de oxigênio, ou seja, não é somente para produção de energia, mas para evitar a produção de radicais livres de oxigênio (ROS), os quais em níveis elevados levam a disfunção e morte celular, manter a homeostase redox e, assim, garantir sobrevivência celular (SEMENZA, 2017).

O HIF-1 é um importante mediador do efeito Warburg, pois, estimula a expressão e ativação das isoformas das enzimas glicolíticas, as quais são diferentes das encontradas em células normais, como, por exemplo, PKM2 (Piruvato Quinase Isoforma M2) que é determinante na glicólise (SONI e PADWARD, 2017). A glicólise permite que as células cancerígenas possam evitar a produção excessiva de ERO, que é gerado pela oxidação da glicose, portanto, sendo uma vantagem adaptativa de sobrevivência (LU; TAN e CAI, 2015).

A complexa rede que leva ao fenômeno de Warburg incluem alterações mitocôndrias, elevada taxa de limitação das enzimas na glicólise envolvendo isoformas específicas como a PKM2 e Hexoquinase 2 (HK2), regulação intracelular do pH e mudança induzida por hipóxia para metabolismo anaeróbio (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016). A PKM2 irá estimular a atividade do HIF-1, ao unir-se a ele (SONI e PADWARD, 2017). Há relatos do HIF-1 ativando a transcrição de PKM2, que é a responsável por aumentar a ligação do HIF-1 aos motivos HREs dos genes alvos, recrutamento da *p300* e transativação de genes alvos (BROCATO; CHERVONA e COSTA, 2014). E este aumento no consumo de glicose que fornece um suporte anabólico para proliferação e aumentar a capacidade antioxidante, o desvio do destino do piruvato para longe da oxidação mitocondrial fazendo com que as células evitem a produção excessiva de ROS, são benefícios que o efeito de Warburg traz para as células tumorais (LU; TAN e CAI, 2015). Então os níveis ROS vão estar reduzidos, a produção dos metabólitos intermediários vai estar alta para a biossíntese macromolecular e acidificação do microambiente extracelular devido à excreção do lactato (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016) e é, exatamente, por isso que as células cancerígenas estão melhor preparadas para tolerar o estresse oxidativo, sendo o metabolismo oxidativo um antagonista da metástase (LU; TAN e CAI, 2015).

Nas células normais a degradação da glicose é para que haja quase que uma produção máxima de energia e de forma exclusiva, privando as células das biossínteses dos blocos de construção. Diferentemente das células cancerosas, onde o consumo de glicose é, principalmente, para fornecer constantemente intermediários glicolíticos (produtos da quebra da glicose) para que as necessidades anabólicas sejam supridas possibilite uma alta divisão celular. Por isso os intermediários glicolíticos demonstram ser mais importantes que o piruvato, que é o seu produto final. E é exatamente por isso que as células cancerígenas utilizam diversos métodos para retardar a última fase da glicólise pela Piruvato Quinase (PKM), para que ocorra o acúmulo de intermediário glicolíticos para a biossíntese. Além do

mais, os metabólitos intermediários são precursores que podem ser desviados para outras vias anabólicas, como a via das pentoses fosfatos (PPP), vias séricas e triacilglicerol para síntese de aminoácido, nucleotídeos e lipídios (LU; TAN e CAI, 2015).

71 METÁSTASE

A expansão e a progressão, seguida por adaptações e alterações genéticas são características que compõe o desenvolvimento do tumor (CUYAR *et al.*, 2009, p. 134). Após as transformações neoplásicas, que primeiramente precisa impedir os mecanismos que impedem a proliferação desenfreada como a apoptose (morte celular programada) ou sinalização de *feedback* negativo (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016), para que haja o crescimento de células malignas, estas irão passar por diversas etapas: sofre uma proliferação sustentada, logo após uma evasão de superexpressão do crescimento, resistência a morte celular; uma imortalidade replicativa; evasão da destruição imunológica; inflamação do tumor; ativação da invasão e da metástase; indução da angiogênese; instabilidade genômica e alterações do metabolismo (LEE *et al.*, 2017; CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016).

A característica mais marcante do tumor sólido com rápido crescimento é a hipóxia (LEE *et al.*, 2017; LU; TAN e CAI, 2015), quase que de forma universal (LU; TAN e CAI, 2015). Os tumores sólidos, frequentemente, têm níveis altíssimos do acúmulo de HIF-1alfa (MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010). O aumento na proliferação das células cancerosas, com produção de alta celularidade tumoral e aumento no consumo de oxigênio (JU *et al.*, 2017; JOHNSON *et al.*, 2017), mas como o fluxo sanguíneo é, frequentemente, comprometido em tumores sólidos, faz com que haja regiões intratumorais em que as tensões de oxigênio encontram-se baixos (JOHNSON, SOWDER e GIACCIA, 2017; RANKIN e GIACCIA, 2016). Essas variações do oxigênio surgem de vasos sanguíneos anormais, estrutural e funcionalmente (JOHNSON, SOWDER e GIACCIA, 2017; SEMENZA, 2012), resultando na incapacidade de oxigenação e nutrição do tumor (TSAI *et al.*, 2018), por isso o tumor é incapaz de progredir sem a angiogênese (FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009), que se trata da formação de vasos a partir de vasos preexistentes (YANG, T. *et al.*, 2016).

Como as células tumorais crescem rapidamente, seu microambiente torna-se cada vez mais hipóxico, dado que mesmo tumores pequenos podem demonstrar sinais de hipóxia e, portanto, dependerem também, da angiogênese (WANG *et al.*, 2017). Isso indica que o ambiente impulsiona a agressividade do tumor em crescimento (SONI e PADWARD, 2017). Portanto, as células cancerígenas tornam-se hipóxicas seguindo uma simples relação entre a diminuição da distribuição e difusão do oxigênio, com o aumento do consumo de oxigênio (SONI e PADWARD, 2017; MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010).

Muitos tumores malignos e agressivos tem resistência às terapias convencionais (radioterapia e quimioterapia) por causa do microambiente hipóxico (LU *et al.*, 2016), pois,

são mais geneticamente instáveis, resistentes a apoptose e tem mais potencial metastático (BURROUGHS *et al.*, 2014), sendo por isso a hipóxia um fator prognóstico negativo (LU; TAN e CAI, 2015). E dentro de todas as características já citadas do câncer, a metástase é o maior obstáculo (LEE *et al.*, 2017), além de ser o maior determinante da morbidade em relação ao câncer (HIELSCHER e GERECHT, 2015).

O HIF-1 possui um papel-chave na adaptação tumoral em condições de hipóxia (DAI *et al.*, 2017; JING; WANG e XU, 2017), pois, desempenha uma função importante na recorrência, disseminação e na resistência à rádio e quimioterapia (PANG *et al.*, 2017). A hipóxia intratumoral induz a expressão do HIF-1alfa, que está associado ao risco de metástase, recaída e mortalidade clínica (JU *et al.*, 2017). Níveis elevados de HIF-1alfa, também, estão relacionados com o fenótipo proliferativo para invasivo (LOFTUS *et al.*, 2018; RANKIN e GIACCIA, 2016) e há relatos que a sua maior expressão está de fato relacionado com pior prognóstico (LIN *et al.*, 2017; LU; TAN e CAI, 2015). Portanto, a hipóxia e a ativação da sinalização do HIF-1 influenciam várias etapas dentro da cascata metastática (RANKIN e GIACCIA, 2016).

As mudanças adaptativas são mediadas, primeiro, pelo HIF, regulador mestre para equilibrar a oferta e a demanda de oxigênio (LU; TAN e CAI, 2015). Regulando muitos genes envolvidos à angiogênese, metabolismo, proliferação, sobrevivência, regulação do pH, migração celular (PARK *et al.*, 2016) e invasão (PARK *et al.*, 2017), uma vez que as células tumorais, promovem a transcrição para se adaptarem (PARK *et al.*, 2016; SONI e PADWARD, 2017). Ou seja, o microambiente hipóxico promove a metástase através da ativação de vários genes responsivos ao HIF, que unidos regulam todos os estágios de propagação cancerígena (MAJMUNDAR; WONG e SIMON, 2010).

Em condições de hipóxia o HIF-1alfa acumula-se e ativa centenas de genes alvos (SHAN *et al.*, 2018; JING; WANG e XU, 2017; BURROUGHS *et al.*, 2014), como fatores angiogênicos, proliferantes, transportadores de glicose e metaloproteínas. (SHAN *et al.*, 2018). Estes genes estão associados ao crescimento, metabolismo, invasão e a metástase do tumor (JING; WANG e XU, 2017). O HIF-1alfa liga-se ao HRE e aumenta a expressão de genes que são regulados pela hipóxia e que geram mudanças para que as células tumorais possam sobreviver (SHAN *et al.*, 2018). Estes genes alvos medeiam a invasividade e a cascata metastática durante a progressão do tumor (DAI *et al.*, 2017). A elevação do HIF-1alfa é proporcional ao aumento do tumor (ZIELLO; JOUIN e HUANG, 2007).

Por isso nos estágios iniciais da metástase, as células tumorais obtêm características invasivas e migratórias, fazendo com que elas saiam da massa tumoral primária e penetrem no hospedeiro vizinho e em distantes tecidos, valendo-se de estratégias individuais e coletivas de migração. Nos estágios finais da metástase, as células são guiadas pela capacidade de as células tumorais disseminadas de colonizarem, sobreviverem e crescerem no microambiente distante (RANKIN e GIACCIA, 2016). E neste estágio final e longínquo, o HIF-1 promove a angiogênese, pois, diferentemente dos tumores primários, a metástase precisa de

angiogênese para suportar o seu crescimento (LIN *et al.*, 2017; RANKIN e GIACCIA, 2016). E curiosamente, células tumorais podem ter níveis altos de HIF-1alfa sob normóxia, o que é conhecido como pseudo-hipóxia (CASTELLARNAU; ATAURI e CASCANTI, 2016).

8 | GENES-ALVOS DO HIF-1

O HIF-1 vem sendo relacionado à regulação de vários genes envolvidos nas várias etapas de invasão tumoral e metástase (MA *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2017) (Tabela 1). Muitos desses genes são centrais no controle, progressão tumoral, vias metabólicas, incluindo angiogênese, proliferação e invasão, colonização de sítios distantes do foco original (SONI e PADWARD, 2017). O maior grupo funcional associado com a angiogênese é o Fator Endotelial Vascular- A (*VEGF- A*), no metabolismo, o Transportador de Glicose 1 (*GLUT-1*) e na apoptose e sobrevivência celular, o *BCL2* e *E1B*. Dois fatores identificados são indispensáveis para a indução do gene alvo de HIF-1 durante a hipóxia, os fatores de transcrições *STAT3* (Transdutor de sinal e Ativador de Transcrição 3) e o *USF2* (*Upstream Stimulatory*), sendo que as proteínas parceiras de transcrição do HIF-1 contribuem para a especificidade do gene alvo (PAWLUS *et al.*, 2013).

Efeitos na progressão do câncer	Genes ativados pelo Fator Induzido por Hipóxia 1
Angiogênese	<i>ANGPT2, C-MET, ID2, LEP, NOS, PDGF, SCF, SDF-1, VEGF</i>
Resistencia a drogas	<i>MDR1</i>
Eritropoiese	<i>EPO</i>
Instabilidade genética	<i>DEC1, DEC2, MSH2, MSH6</i>
Metabolismo da glicose	<i>GLUT1, GPI, HK1, HK2, LDH, MCT1, PGK1, PKM2</i>
Imortalização	<i>TERT</i>
Evasão imune	<i>NT5E</i>
Invasão	<i>C-MET, EDN-1, FN-1, MMP-2, MMP-14, SDF-1</i>
Metástase	<i>C-MET, CXCR4, LOX, TWIST1, ZEB1</i>
Regulação do pH	<i>CA-9, CA-12</i>
Proliferação	<i>C-MYC, ID2, IGF-2, NOS,</i>
Manutenção das células-tronco	<i>ABCG2, JARID1B, OCT4, NANOG, Sox2, KLF4, c-myc, miR302</i>

Tabela 1. Genes alvos selecionados do Fator Induzido Por Hipóxia (HIF) 1 e seu efeito sobre o câncer.

Fonte: Burroughs *et al.* (2014).

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*VEGF*) aumenta o tamanho do tumor *in vivo* e a vascularização (BURROUGHS *et al.*, 2014). É conhecido por ser induzido por vários

ativadores, tais como estímulos ambientais, fatores de crescimento, citocinas, hormônios e oncogenes (LEE, M. *et al.*, 2017). Trata-se de um gene alvo do HIF que medeia o papel do HIF na tumorigênese, alveologênese (MACCLENDON *et al.*, 2017), angiogênese (LEE *et al.*, 2017; MACCLENDON *et al.*, 2017) e vasculogênese, por meio da regulação positiva de *VEGF* e *CXCL 12* (LEE, M. *et al.*, 2017).

A forma do tubo de células endoteliais é um dos principais passos da angiogênese (YANG, T. *et al.*, 2016). O *VEGF* desempenha um papel essencial na angiogênese, pois, ao ocorrer a ligação do HIF-1 ao HRE (BURROUGHS *et al.*, 2014; YANG, T. *et al.*, 2016), o HIF-1 ativa diretamente a transcrição do receptor de *VEGF* (*VEGFR-1*) e do *VEGF*. As células tumorais respondem a hipóxia e a privação de nutricional produzindo e liberando *VEGF* (YANG, T. *et al.*, 2016), que por sua vez irá estimular a formação de novos vasos e promover o crescimento e a disseminação do tumor (TOTH e WARFEL, 2017; YANG, T. *et al.*, 2016). Pois, como foi demonstrado, no câncer de mama o *VEGF* mostrou estimular essa proliferação e migração das células tumorais (YANG, T. *et al.*, 2016).

Muitos outros genes alvos do HIF-1alfa também são pró-angiogênicos como a Angiopoitina (TOTH e WARFEL, 2017), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*PDGF-b*), Angiopoitina 2 (*ANGPT- 2*) e, também o Fator Derivado de Estroma 1 alfa (*SDF-1 a*) (ZENG *et al.*, 2017; WIGERUP; PAHLMAN e BEXELL; 2016). O HIF-1 também estimula a produção de fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Transformante (*TGF*), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 2 (*IGF-2*), interleucinas 6 e 8 (*IL- 6 e IL 8*), Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (*MIF*), Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) resultando, assim, em uma sinalização contínua de proliferação (FEITELSON *et al.*, 2015).

9 | ALVOS TERAPÊUTICOS

Em análises de imuno-histoquímica de biópsias de tumores humanos, tem sido considerada uma elevação da proteína HIF-1alfa em vários tipos de tumores malignos sólidos como, câncer de mama, cólon, estômago, pulmão, de pele e carcinoma de rins (BRAICU *et al.*, 2014). O aumento do HIF-1alfa e a associação com as mutações de genes supressores inativados como VHL, p53, PTEN e a amplificação dos oncogenes Akt, RAS, ERK1/2 tem sido observado com frequência em pacientes com câncer. Essas alterações estão associadas ao crescimento tumoral, invasão e metástase (FRAGA; RIBEIRO e MEDEIROS, 2009)

Considerando as várias formas de atuação ou caminhos do HIF-1alfa, no câncer tumoral e na metástase, tem surgido um grande interesse no desenvolvimento de inibidores alvos dessas vias (MASOUND e LI, 2015). Estudos recentes têm sido direcionados para o HIF -1alfa como terapia alvo. Agentes quimioterápicos miram na angiogênese para a redução de crescimento de tumores primário (TANG e YU, 2012). Antraciclinas é uma

classe de drogas quimioterápicas bem conhecidas. Há mais de 50 anos, as antraciclinas têm sido utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo leucemias, bexiga, mama e tireoide (PANG *et al.*, 2017).

As drogas apresentadas na tabela abaixo (Tabela 2) são apenas protótipos. O HIF-1alfa é reconhecido como um mediador central, a chave para ativação de vários genes relacionados ao desenvolvimento do câncer.

Processo Inibido	Protótipo
Síntese de proteínas HIF-1alfa	Rapamicina com digoxina; 2-metoxiestradiol; topotecano
Estabilidade da proteína HIF-1alfa	LAQ824 17-AAG; Ciclosporina; YC-1.
Heterodimerização	Criflavina
Ligação de DNA	Doxorrubicina; Equinomicina.
Transativação	Anfotericina B de bortezomib
Transdução de sinal	Imatinibe ibuprofeno erlotinib; Gefitinib trastuzuma.

Tabela 2. Processos Inibitórios e as Vias Relacionadas.

Fonte: Adaptado de Semenza, G. L. (2012).

Sua elevada produção pode ser iniciada por diversos fatores contribuindo para um prognóstico ruim. No entanto, a inibição do HIF-1alfa, e seus caminhos, continuam sendo o melhor alvo terapêutico (TANG e YU, 2012). Várias estratégias que visam o HIF-1alfa para desenvolvimento de medicamentos vêm sendo relatadas, atualmente, mas devido a uma preocupação com a segurança, com a estabilidade dos reagentes e uma inconstante resposta clínica, as aplicações clínicas foram limitadas (YANG, N. *et al.*, 2016).

10 | CONCLUSÃO

A hipóxia estabiliza a subunidade HIF-1alfa, o qual se dimeriza com a subunidade HIF-1beta, originando o HIF-1 ativo que faz a mediação gênica, levando à transcrição de diversos genes principalmente os da cadeia metastática, como VEGF, SDF-1, EPO, possibilitando a invasão tumoral e a metástase. O HIF-1 também ativa genes glicolíticos, como a GLUT-1, suprimindo a necessidade energética dependente da oxidação na mitocôndria, além da nutricional da célula tumoral. Esse mecanismo demonstra que o HIF-1 possui um papel crucial na sobrevivência do tumor e na metástase. Como o HIF-1alfa é expresso em todas as células e a sua elevação é proporcional com o aumento do tumor, leva-nos a observar a importância dessa proteína para o tumor e a concluir que conhecendo o funcionamento geral da proteína HIF-1 ativa; como a estrutura, sua síntese, a sua regulação, sua estabilização e a sua atuação, vai possibilitar o desenvolvimento, não apenas de estratégias terapêuticas, mas de novas drogas, para que assim possa diminuir, ou até mesmo evitar os processos metastáticos, possibilitando que um aumento da sobrevida dos pacientes com câncer.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer o professor Dr. Túlio César por toda sua competência, dedicação e empenho para que pudéssemos desenvolver esse trabalho. Seus conhecimentos na área foram de suma importância para que o trabalho possa contribuir para o conhecimento científico desse gene, o qual tem papel fundamental na homeostasia do oxigênio e também na carcinogênese. Também agradecemos a Professora Dra. Élide G. Campos (Professora Associada da Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Biologia Molecular) por também nos levar a interessar sobre esse rico tema.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BAN, H. S. *et al.* **The novel hypoxia-inducible factor-1 α inhibitor IDF-11774 regulates cancer metabolism, there by suppressing tumor growth**. *Cell Death and Disease*: vol. 8, nº e2843, p. 8, 2017.

BRAICU, E. I. *et al.* **HIF1 α is an independent prognostic factor for overall survival in advanced primary epithelial ovarian cancer – a study of the OVCAD Consortium**. *Dovexpress- OncoTargets and Therapy*: vol. 7, p. 1563-1569, 2014.

BROCATO, J.; CHERVOSA, Y.; COSTA, **Molecular Responses to Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Beyond**. *Molecular Pharmacology*: vol. 85, nº 5, p. 651-657; 2014.

BURROUGHES, S. *et al.* **Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics**. *Future Med. Chem*: vol. 5, nº 5, p. 31, 2014.

CASTELLARNAU, M. T.; ATAURI, P. De; CASCANTI, M. **Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming**. *Oncotarget*: vol. 7, nº 38, p. 62726-62753, 2016.

CASTRO, N. F. **Efeitos da expressão do HIF humano na levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2014.

CHEN, C.; LOU, T. **Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma**. *Oncotarget*: vol. 8, nº 28, p. 46691-46703, 2017.

CUYAR, L. F. G. *et al.* **Cellular Respiration and Tumor Suppressor**. *Genes*. In: SEMENZA, G. L. (Ed.). *Cellular Respiration and Carcinogenesis*. New York (USA): Springer: 2009, p. 131-144.

DAI, X. *et al.* **A novel small-molecule arylsulfonamide causes energetic stress and suppresses breast and lung tumor growth and metastasis**. *Oncotarget*: vol. 8, nº 59, p. 99245-99260, 2017.

DEVINE, R. D.; BICER, S.; REISER, P. J.; WOLD, L. E. **Increased hypoxia-inducible factor-1 in striated muscle of tumor-bearing mice**. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*: vol. 312, p. H1154–H1162, 2017.

FEITELSON, M. A. *et al.* **Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets.** Semin. Cancer Biol.: vol. 35, p. S25-S54; 2015.

FERREIRA, T. C. **Clonagem e Expressão do Fator 1 Humano Induzível Por Hipóxia (HIF-1) na Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

FRAGA, A.; RIBEIRO, R.; MEDEIROS, R. **Hipoxia tumoral: Papel del factor inducible por hipóxia.** Altas Urol. España: vol. 33, n° 9, p. 941-951, 2009.

GENEWEL. COM. **O que é a dieta cetogênica? Ela pode ajudar contra o câncer?** Disponível em: <http://genewel.com/br/o-que-e-a-dieta-cetogenica-ela-pode-ajudar-contr-o-cancer/>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

HIELSCHER, A.; GERECHT, S. **Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships.** Free Radic Biol Med.: vol.79, p. 281–291, 2015.

HU, H. *et al.* **Hypoxia-inducible factors enhance glutamate signaling in cancer cells.** Oncotarget: vol. 5, n° 19, p. 8853-8868, 2014.

HUBBI, M. E., SEMENZA, G. L. **Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors.** THEMES: Am. J. Physiol Cell Physiol: vol. 309, p. C775–C782, 2015

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas Para o Controle do Câncer.** Rio de Janeiro: 2011.

IKEMORI, R. Y.; SAITO, R. F. **Alterações Metabólicas Envolvidas no Desenvolvimento Tumoral.** In.: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYAYASU, H. (Org.): Oncologia Para Graduação. São Paulo: Lemar, 2013, 142-150.

JING, S. W.; WANG, J.; XU, Q. **Expression of hypoxia inducible factor 1 alpha and its clinical significance in esophageal carcinoma: A meta-analysis.** Tumor Biology: p. 1-12, 2017.

JOHNSON, R. W.; SOWDER, M. E.; GIACCIA, A. J. **Hypoxia and Bone Metastatic Disease.** Curr Osteoporos Rep.: vol. 15, n° 4, p. 231–238, 2017.

JU, J. A. *et al* **Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. Oncogenes and Tumor Suppressors.** Molecular Cancer Research: vol. 15, n° 6, p. 723-724, 2017.

KOYASU, S. *et al.* **Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge.** Cancer Science. Australia: vol. 109, p. 560–571; 2018.

LATHA, M. S.; SADDALA, M. S. **Molecular docking based screening of a simulated HIF-1 protein model for potencial inhibitors.** Bioinformation: vol. 13, n° 11. p. 388-393, 2017.

LEE, M.S. **Sphingosine Kinase-1 Involves the Inhibitory Action of HIF-1 α by Chlorogenic Acid in Hypoxic DU145 Cells.** International Journal of Molecular Sciences: vol. 18, n°325, p. 1-13, 2017.

- LEE, S. Y. *et al.* **Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation.** *Molecular Cancer*: vol. 16, n° 10, p. 21, 2017.
- LIANG, K.; DING, X. Q.; LIN, C.; KANG, Y. J. **Hypoxia-inducible factor-1 α dependent nuclear entry of factor inhibiting HIF-1.** *Experimental Biology and Medicine*: vol. 240, p. 1446-1451; 2015.
- LIN, C. S. *et al.* **Independent Prognostic Value of Hypoxia-inducible Factor 1-alpha Expression in Small Cell Lung Cancer.** *Internacional Journal of Medical Sciences*: vol. 14, n° 8. p. 785-790, 2017.
- LODISH, H. *et al.* **Biologia Celular e Molecular.** 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LOFTUS, S. K. *et al.* **Hypoxia-induced HIF1 α targets in melanocytes reveal a molecular profile associated with poor melanoma prognosis.** *Pigment Cell Melanoma Res.*: vol. 30, n° 3, p. 339–352, 2017.
- LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. **The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism.** *Cancer Lett*: vol. 352, n° 2, p. 156-164; 2015.
- LU, Y. *et al.* **Brusatol inhibits HIF-1 signaling pathway and suppresses glucose uptake under hypoxic conditions in HCT116 cells.** *Scientific Reportes*: vol. 6, n° 39123, p. 1-12, 2016.
- MA, S. *et al.* **The role of tumor microenvironment in resistance to anti-angiogenic therapy.** *F1000Research (F1000 Faculty Rev)*: vol. 7, n° 326, p. 17, 2018.
- MACCLENDON, J. *et al.* **Hypoxia-Inducible Factor 1 α Signaling Promotes Repair of the Alveolar Epithelium after Acute Lung Injury.** *The American Journal of Pathology (Elsevier)*: vol. 187, n° 8, p. 1772-1786, 2017.
- MACHADO, L. B.; CHAMMAS, R. **Fatores Teciduais de Resistência à Medicamentos em Tumores.** In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYAYASU, H. (Org.): *Oncologia Para Graduação.* São Paulo: Lemar, 2013, p. 158-166.
- MAJMUNDAR, A. J.; WONG, W. J.; SIMON, M. C. **Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress.** *Molecular Cell*: vol. 40, p. 294-309, 2010
- MASOUND, G. N.; LI, W. **HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.** *Acta Pharmaceutica Sinica B (Elsevier)*: vol. 5, n° 5. p. 378-389, 2015.
- MASOUND, G. N. *et al.* **Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel HIF1 α Inhibitors.** *Anticancer Research*: vol. 35, p. 3849-3860, 2015.
- PALAZON, A. *et al.* **HIF Transcription Factors Inflammation, and Immunity.** *Immunity (Elsevier)*: vol. 42. p. 518-528, 2014.
- PANG, Y. *et al.* **Anthracyclines suppress pheochromocytoma cell characteristics, including metastasis, through inhibition of the hypoxia signaling pathway.** *Oncotarget*: vol. 8, n° 14, p. 22313-22324, 2017.

PARK, E. J. *et al.* **Vanillin Suppresses Cell Motility by Inhibiting STAT3-Mediated HIF-1 α mRNA Expression in Malignant Melanoma Cells.** International Journal of Molecular Sciences: vol. 18, n $^{\circ}$ 532, p. 1-11; 2017.

PARK, K. *et al.* **Molecular and functional evaluation of a novel HIF inhibitor, benzopyranyl 1,2,3-triazole compound.** Oncotarget: vol. 8, n $^{\circ}$ 5, p. 7801-7813, 2016.

PAVLIDES, S. *et al.* **The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma.** Cell Cycle: vol. 8, n $^{\circ}$ 32, p. 3984-4001; 2009.

PAWLUS, M. R. *et al.* **STAT3 or USF2 Contributes to HIF Target Gene Specificity.** Plus One: vol. 8, n $^{\circ}$. 8, p. e72358, 2013.

RAMPLING *et al.* **Direct measurement of pO $_2$ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors.** Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 29: 427–431; 1994.

RANKIN, E. R.; GIACCIA, A. J. **Hypoxic control of metastasis.** Science; vol. 352, n $^{\circ}$ 6282, p. 175–180, 2016.

SAMANTA, D. *et al.* **Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells.** PNAS: vol. 11, n $^{\circ}$ 50, p. E429- E438, 2014.

SANTOS, S. N. D. **Biologia Tumoral.** In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYAYASU, H. (Org.): Oncologia Para Graduação. São Paulo, Lemar, 2013, p. 23-29.

SALLAIS, J. *et al.* **Factor inhibiting HIF1–A novel target of SUMOylation in the human placenta.** Oncotarget: vol. 8, n $^{\circ}$ 69, p. 114002-114018, 2017.

SCHULTZ, R. M. **Ciclo Celular, Morte Celular Programada e Câncer.** In: DEVLIN, T. M. (Org.): Manuel de Bioquímica Com Correlações Clínicas. São Paulo: Blucher, 2011, p. 1028-1047.

SEMENZA, G. L. **Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype.** The EMBO Journal: vol. 36, n $^{\circ}$ 3, p. 252-259, 2017.

SEMENZA, G. L. **HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism.** Current opinion in genetic e development: vol. 20, p. 51 – 56. 2010.

SEMENZA, G. L. **Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine.** Molecular Cell: vol. 148, p 399-408, 2012

SEMENZA, G. L. *et al.* **Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to human erythropoietin gene.** Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A: vol. 88, p. 5680-5684, 1991.

SONI, S.; PADWARD, Y. **HIF-1 in cancer therapy: twodecade long story of a transcription factor.** Acta Oncologica: vol. 56, n $^{\circ}$ 4. p. 503-5015, 2017.

SPIRINA, L. V. *et al.* **Transcription Factors NF- κ B, HIF-1, HIF-2, Growth Factor VEGF, VEGFR2 and Carboanhydrase IX mRNA and Protein Level in the Development of Kidney Cancer Metastasis.** *Molecular Cell Biology*: vol. 51, n° 2, p. 328–332, 2017.

SHAN, Y. *et al.* **Hypoxia-Induced Matrix Metalloproteinase-13 Expression in Exosomes from Nasopharyngeal Carcinoma Enhances Metastases.** *Cell Death and Disease*: vol. 9, p. 392; 2018.

TANG, C. M.; LI, Y. **Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology*: vol. 28, p. 401–405, 2013.

TOTH, R. K.; WARFEL, N. A. **Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia.** *Antioxidants*: vol. 6, n° 27, p. 21, 2017.

TSAI, I. T. *et al.* **Novel microtubule inhibitor MPT0B098 inhibits hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma.** *Journal of Biomedical Science*: vol 25, n° 28, p. 12, 2018.

WANG, M. *et al.* **HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment.** *Journal of Experimental Clinical Cancer Research*: vol. 36, n° 60, p. 14, 2017.

WIGERUP, C.; PAHLMAS, S.; BEXELL, D. **Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer.** *Pharmacology & Therapeutics (Elsevier)*: vol. 64, p. 152–169; 2016.

YANG, N. *et al.* **Propofol suppresses LPS-induced nuclear accumulation of HIF-1 α and tumor aggressiveness in non-small cell lung cancer.** *Oncology Reports*: vol. 37, p. 2611-2619, 2016.

YANG, T. *et al.* **Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis.** *International Journal of Nanomedicine*: vol. 11, p. 6679–6692, 2016.

YU, T.; TANG, B.; SUN, X. **Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy.** *Yonsei Medical Journal*: vol. 58, n° 3. p. 489-496, 2017.

ZENG, M. *et al.* **The HIF-1 Antagonist Acriflavine; Visualization in Retina and Suppression of Ocular Neovascularization.** *J. Mol. Med. (Berl)*: vol. 94, n° 4, p. 417-429, 2017.

ZEPEDA, A. B. *et al.* **HSF-1, HIF-1 and HSP90 expression on recombinant *Pichia pastoris* under fed-batch fermentation.** *Brazilian Journal of Microbiology*: vol. 45, n°2. p. 485-490, 2014.

ZIELLO, J. E.; JOUIN, I. S.; HUANG, Y. **Hypoxia-inducible Factor (HIF) -1 Regulatory Pathway and Its Potencial For Therapeutic Intervention.** *Yale Journal of Biology and Medicine*: 80, p. 51-60; 2007.

CAPÍTULO 2

DOENÇA PERIODONTAL NA COVID-19

Data de aceite: 01/11/2021

Roberta Maria Pimenta Chadú

Graduanda em Odontologia, Universidade de Uberaba (UNIUBE)
Uberaba – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/2355241105099747>

Ana Gabriela Aguiar Caetano Rezende

Graduanda em Odontologia, Universidade de Uberaba (UNIUBE)
Uberaba – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/6231090494430551>

Juliana Barbosa de Faria

Doutoranda em Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)
Uberaba - Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/8536037873271738>

Táissa Cássia de Souza Furtado

Doutoranda em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP-USP, Universidade de São Paulo (USP)
Ribeirão Preto – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/8178551310977590>

Sanívia Aparecida de Lima Pereira

Docente do CEFORES, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); Graduação em Odontologia e Medicina (Universidade de Uberaba - UNIUBE); do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e do Programa de Mestrado em Odontologia, Universidade de Uberaba (UNIUBE)
Uberaba – Minas Gerais
<http://lattes.cnpq.br/9567264526096951>

RESUMO: O SARS-CoV-2 é um vírus que provoca a doença coronavírus, conhecida como COVID-19. Essa doença desencadeia lesões sistêmicas graves que estão sendo responsáveis por grande morbidade e mortalidade na população mundial. A pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 iniciou-se em Wuhan na China, em dezembro de 2019, e atualmente ainda assola o Brasil e o mundo. Já a doença periodontal é uma doença bucal muito comum que acomete grande parte da população brasileira, sendo causada por diferentes fatores etiológicos, dentre eles os agentes biológicos que se acumulam no biofilme bucal. Estudos recentes demonstraram que as bolsas periodontais causadas pela periodontite podem atuar como reservatórios para o SARS-CoV-2, funcionando como meio para o agravamento da infecção. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar revisão da literatura sobre a doença periodontal na COVID-19. Descrevemos dados relativos aos patógenos, as formas de contágio, sintomas, transmissão e tratamento da doença periodontal e da COVID-19 e a relação entre essas duas doenças. A redução da propagação do SARS-CoV-2 está relacionada à identificação dos reservatórios desse vírus, o tratamento da periodontite poderia diminuir a infecção viral nas células hospedeiras. Sabendo que a prevenção e controle da infecção periodontal e a manutenção da saúde sistêmica dos pacientes acometidos pelo coronavírus reduz a morbimortalidade, são necessários mais estudos a fim de compreender melhor a associação entre essas duas doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Coronavírus, COVID-19, Doenças Periodontais, Periodontite, SARS-CoV-2.

PERIODONTAL DISEASE IN COVID-19

ABSTRACT: SARS-CoV-2 is a virus that causes coronavirus disease, known as COVID-19. This disease triggers serious systemic injuries that are responsible for great morbidity and mortality in the world population. The pandemic caused by SARS-CoV-2 began in Wuhan, China, in December 2019, and currently still ravages Brazil and the world. Periodontal disease, on the other hand, is a very common oral disease that affects a large part of the Brazilian population, being caused by different etiological factors, including biological agents that accumulate in the oral biofilm. Recent studies have shown that periodontal pockets caused by periodontitis can act as a reservoir for SARS-CoV-2, functioning as a means to aggravate the infection. Thus, the aim of this study was to perform a literature review on periodontal disease in COVID-19. We describe data related to pathogens, forms of contagion, symptoms, transmission and treatment of periodontal disease and COVID-19 and the relationship between these two diseases. The reduction in the spread of SARS-CoV-2 is related to the identification of the reservoirs of this virus, the treatment of periodontitis could reduce viral infection in host cells. Knowing that the prevention and control of periodontal infection and the maintenance of systemic health of patients affected by coronavirus reduces morbidity and mortality, more studies are needed in order to better understand the association between these two diseases. **KEYWORDS:** Coronavirus, COVID-19, Periodontal disease, Periodontitis, SARS-CoV-2.

1 | INTRODUÇÃO

A pandemia começou em Wuhan (província de Hubei, China) em dezembro de 2019, com sintomas semelhantes aos da pneumonia, e rapidamente espalhou-se pelo mundo, denominada como COVID-19 e anunciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma pandemia (MATUCKA et al., 2020). A nova doença COVID-19 também conhecida como coronavírus é uma Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que pode ser transmitida de uma pessoa para outra por meio de contato direto ou indireto (SIDDHARTHAN, NAING, WAN-ARFAH, 2020).

O coronavírus SARS-CoV-2 é uma cepa do coronavírus relacionado à síndrome coronavírus (SARr-CoV), membro da Família *Coronaviridae* e o agente responsável pela doença referida (MAROUF et al 2021). Este vírus pertence ao gênero Betacoronavirus, que também inclui o SARS-CoV (síndrome respiratória aguda grave) e MERSCoV (síndrome respiratória do Oriente Médio), no entanto a origem do SARS-CoV-2 permanece obscura (HU, HUANG, YIN, 2020).

O coronavírus possui um alto poder de contágio que pode ocorrer através de gotículas presentes no ar e nas superfícies, aumentando, conseqüentemente, seus riscos à população (SOUSA et al., 2020). O SARS-CoV-2 se espalha muito mais rapidamente do que outros agentes infecciosos do sistema respiratório. Esse fato pode estar relacionado ao grande tempo de incubação e à alta capacidade do vírus para contaminar através da tosse ou espirro, durante a interação social. Devido à baixa prevalência de rinorreia nos pacientes com COVID-19, sugere-se que estes não são apenas contaminados por

escarro nasal e fluidos respiratórios, mas por gotículas infectadas da saliva, por meio de aerossóis (gotículas menores que permanecem suspensas no ar) (HU, HUANG, YIN, 2020; WIERSINGA et al., 2020).

A periodontite é uma das doenças bucais mais comuns, causada devido aos diferentes fatores etiológicos. Patógenos contendo bactérias desempenham um papel importante no desenvolvimento da periodontite. Sendo assim, os vírus causadores da COVID-19 também foram encontrados em bolsas periodontais que também atuam como reservatórios para diferentes patógenos. Embora o acúmulo e maturação do biofilme bacteriano iniciem a inflamação gengival, a progressão da doença periodontal ocorre em consequência da resposta do hospedeiro e das alterações disbióticas no microbioma. Foi hipotetizado que a bolsa periodontal poderia ser um nicho para novos coronavírus, devido a um ambiente favorável para replicar e eventualmente migrar sistemicamente usando o complexo periodontal capilar (BERTOLINI et al., 2020).

Já foi demonstrado que indivíduos com doença periodontal apresentam um alto risco de adquirir consequências desfavoráveis associadas à COVID-19, o que ressalta a importância para manter a saúde periodontal e o valor de uma higiene bucal cuidadosa em pacientes com COVID-19 (SIDHARTHAN, NAING, WAN-ARFAH, 2020). É imprescindível que o dentista realize procedimentos profiláticos e educativos em saúde gengival, para evitar o início ou agravamento de quadros deletérios e o risco de pacientes desenvolverem problemas cardiovasculares, principalmente, devido à situação mundial da COVID-19 (SOUSA et al., 2020). Melhorar os cuidados bucais dos pacientes com COVID-19 no hospital pode ser um método simples para melhorar seu quadro de saúde. Na ausência de atendimento odontológico de rotina, consultas remotas são uma oportunidade para enfatizar métodos de autocuidado, como a escovação completa e limpeza interdental, ambas para prevenir doenças orais e reduzir o risco de mortalidade pela COVID-19 (LARVIN et al., 2020).

2 | REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Coronavírus

O SARS-CoV-2 é um vírus da família *Coronaviridae*, com um surto recente que está causando uma grande pandemia. A nova doença coronavírus COVID-19 tornou-se a quinta doença documentada como uma pandemia desde a Gripe espanhola (H1N1) 1918, gripe asiática de 1957 (H2N2), gripe de Hong Kong de 1968 (H3N2) e gripe pandêmica de 2009 (H1N1), que causou 50 milhões, 1,5 milhão, 1 milhão e 300.000 mortes humanas, respectivamente. A COVID-19 foi relatada pela primeira vez em Wuhan, China, e posteriormente se espalhou em todo o mundo. A primeira data de início dos sintomas foi em 1 de dezembro de 2019, incluindo febre, mal-estar, tosse seca e dispneia, e foi

diagnosticada como uma pneumonia viral, inicialmente denominada pela imprensa como Pneumonia de Wuhan. Mais tarde, resultados de testes do sequenciamento do genoma mostraram que o agente causador era um novo coronavírus. A Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou em 12 de janeiro de 2020 como a doença infecciosa coronavírus 2019 (COVID-19). Posteriormente, o coronavírus foi oficialmente denominado como uma Síndrome Respiratória Aguda Grave - coronavírus 2 (SARS-CoV-2) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus com base na análise filogenética. Acredita-se que o SARS-CoV-2 seja um transbordamento de um coronavírus animal que mais tarde se adaptou adquirindo a capacidade de transmissão de humano para humano. Como o vírus é altamente contagioso, ele se espalha rapidamente e evolui continuamente na população humana. Desde que a COVID-19 surgiu na China, o vírus evoluiu em quatro meses e rapidamente se espalhou para outros países em todo o mundo como uma ameaça global. Em 11 de março de 2020, a OMS finalmente fez a avaliação de que a COVID-19 poderia ser classificada como uma pandemia (LIU, KUO, SHIH, 2020; SANTOS et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

Na chegada do vírus no Brasil, em janeiro de 2020, toda a população foi orientada a cumprir protocolos de medidas de prevenção e intervenção para o enfrentamento da COVID-19 e redução de letalidade e óbitos, por meio de Centros de Operações de Emergências em Saúde Pública para o novo coronavírus (COE/nCoV), previstas no Plano Nacional de Resposta às Emergências em Saúde Pública do Ministério da Saúde, além de Grupos de Enfrentamento em cada região do País. Tanto a nível Federal como Distrital, Estadual e Municipal são produzidas ações de prevenção, intervenção e informação para coordenar a atuação das equipes em saúde, como por exemplo, o Protocolo de Tratamento do nCoV para “Orientar a Rede de Serviços de Atenção à Saúde do SUS para a identificação, notificação e manejo oportuno de casos suspeitos de Infecção Humana pelo novo coronavírus de modo a mitigar os riscos de transmissão sustentada no território nacional”. Outro aspecto, trata-se do cumprimento de ações preventivas instituídas internacionalmente com base para a diminuição da curva crítica epidêmica e controle epidemiológico, como: (1) cuidados sistemáticos com higiene pessoal e residencial; (2) boas condições de alimentação e condições gerais corporais; (3) o isolamento social em condições de saúde, a quarentena em viajantes e o afastamento interpessoal nos casos de resfriado ou COVID-19 (PIMENTEL, SILVA, 2020; SOUSA et al., 2020).

O coronavírus é um vírus zoonótico, um RNA vírus da ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae*. Esta é uma família de vírus que causam infecções respiratórias, os quais foram isolados pela primeira vez em 1937 e descritos como tal em 1965, em decorrência do seu perfil na microscopia similar a uma coroa. Os tipos de coronavírus conhecidos até o momento são: alfa coronavírus HCoV-229E e alfa coronavírus HCoV-NL63, beta coronavírus HCoV-OC43 e beta coronavírus HCoV-HKU1, SARS-CoV (causador da síndrome respiratória aguda grave ou SARS), MERS-CoV (causador da síndrome respiratória do

Oriente Médio ou MERS) e SARSCoV-2, um novo coronavírus descrito no final de 2019, após casos registrados na China que provoca a doença chamada de COVID-19.

A doença infecciosa COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, compreende o sétimo coronavírus identificado até o momento, sendo responsável por quadros de insuficiência respiratória (CIRILLO, 2020; COSTA et al., 2020; LIMA, 2020; PIMENTEL e SILVA, 2020). Os subtipos existentes de vírus adaptados aos seres humanos são: HCoV-OC43, provavelmente vindo de bovinos, mas originário de roedores; HCoV- NL63, proveniente de morcegos, como os da SARS e da COVID-19; HCoV-229E, vindo de camelos, mas originário de morcegos; e HCoV-HKU1, vindo de roedores, porém o novo coronavírus possui uma taxa de fatalidade menos mortal do que os patógenos por trás de outros surtos de grande escala, como de SARS, MERS e Ebola. No entanto, a infecção se espalhou muito mais rápido do que SARS, MERS e influenza sazonal (CIRILLO, 2020; LIMA, 2020).

Todos os coronavírus humanos têm origem animal, ou seja, hospedeiros naturais. Os morcegos podem ser os hospedeiros naturais de HCoV-229E, SARSCoV, HCoV-NL63 e MERS-CoV. Além disso, HCoV-OC43 e HKU1 provavelmente se originou de roedores. Morcegos são, sem dúvida, os principais reservatórios naturais de alfa-coronavírus e beta-coronavírus. Animais domésticos podem sofrer de doenças como hospedeiros intermediários que causam a transmissão do vírus de hospedeiros naturais para humanos; por exemplo, SARS-CoV e MERS-CoV cruzaram as barreiras de espécies em civetas e camelos, respectivamente. O SARS-CoV-2 sequenciado na fase inicial do surto de COVID-19 compartilha apenas 79,6% de identidade de sequência com SARS-CoV por meio de comparações genômicas de comprimento total iniciais. No entanto, é altamente idêntico (96,2%) em todo o genoma com o Bat-CoV RaTG13, que foi detectado anteriormente em *Rhinolophus affinis* da província de Yunnan. Os morcegos são provavelmente hospedeiros reservatórios do SARS-CoV-2, no entanto permanece inconclusivo se Bat-CoV transpôs diretamente para humanos ou transmite para hospedeiros intermediários para facilitar a transmissão de animais para humanos (LIU, KUO, SHIH, 2020).

Sabe-se que todas as pessoas são infectadas ao longo da vida com o coronavírus humano, e podem também obter o coronavírus que evoluem em animais podendo ser prejudicial aos humanos quando transmitido, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, e agora o SARS-CoV-2. Das sete variedades conhecidas, quatro já foram identificadas no Brasil. O coronavírus humano (HCoV) e suas cepas HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-HKU1 e HCoV-OC43 geralmente causam leves e autolimitadas infecções do trato das vias respiratórias superiores, como um resfriado comum (LIU, KUO, SHIH, 2020).

2.2 Transmissão

Os dados epidemiológicos disponíveis sugerem fortemente que a transmissão de SARS-CoV-2 ocorre principalmente por via respiratória através de gotículas, tosse e

espirros por contato direto. O contato indireto via superfícies contaminadas é outra causa provável de infecção. Também sabemos que a transmissão aérea é possível, porque o vírus é estável por várias horas a dias em aerossóis e em superfícies. Especificamente, o SARS-CoV-2 foi detectável, embora em títulos progressivamente mais baixos, em aerossóis por até 3 h, até a 4 h em cobre, até 24 h em papelão e até 2 a 3 dias em aço inoxidável e plástico, respectivamente. Intervenções odontológicas, que incluem geração de aerossol, manuseio de perfurocortantes e proximidade do provedor à região orofaríngea do paciente, expõem dentistas e profissionais de saúde ao contágio (CIRILLO 2020; COSTA et al., 2020; PIMENTEL e SILVA, 2020).

2.3 Sinais e sintomas

A COVID-19 é uma doença que provoca danos aos pulmões e outros órgãos. A maioria dos pacientes apresenta sintomas leves; no entanto, alguns podem desenvolver doença grave como pneumonia, edema pulmonar, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome de disfunção de múltiplos órgãos ou mesmo morte. Os sintomas relatados em portadores do vírus SARS-CoV-2 geralmente são: febre, tosse seca, dor de garganta, dispneia, anosmia e ageusia, sendo considerados casos leves. De todos os infectados, apenas uma pequena porcentagem induz estado crítico, considerando a presença de alguma comorbidade ou condição, que podem ser diabetes, hipertensão, obesidade, asma, gravidez, doenças pulmonares, doenças hepáticas e disbiose oral (PITONES-RUBIO et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

2.4 Doença periodontal

A doença periodontal é uma das doenças bucais mais comuns que podem ser causadas por diferentes fatores etiológicos. Os patógenos que contêm bactérias são parte fundamental para o seu desenvolvimento, acomete o periodonto e possui origem infecciosa, além de causar reações inflamatórias e imunológicas no tecido periodontal que são induzidas pelos microrganismos da placa bacteriana, denominada como biofilme dental (BERTOLINI et al., 2020; LARVIN et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

A periodontite é a principal causa para perda de elementos dentais em adultos e é a sexta patologia mais prevalente no planeta, atingindo de 10 a 50% da população adulta. Entre suas características encontramos gengivas com sangramento e doloridas. Quando apresenta grau leve ao moderado é denominada gengivite que é o quadro reversível, enquanto dentes que apresentam mobilidade indicam o grau severo da patologia, denominada periodontite, já apresentando irreversibilidade (BERTOLINI et al., 2020; LARVIN et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

O acúmulo e a maturação do biofilme bacteriano iniciam a inflamação gengival e a progressão da doença periodontal se dá por consequência da resposta do hospedeiro e pelas alterações disbióticas do microbiota. Uma das maneiras de evitar que essa doença

progrida é a partir de uma boa higienização diária. Há algum tempo, pesquisadores mostraram que a periodontite está correlacionada com condições sistêmicas relevantes, podendo estar interligada ao início ou à progressão da doença periodontal. Além disso, há provas de que desordens sistêmicas vão desencadear o agravamento da doença, de modo a causar o aumento dos patógenos periodontais. Pessoas com periodontite podem ter o risco de desenvolver doenças sistêmicas subsequentemente aumentadas, exemplos: doenças cardiovasculares, hipertensão, doenças respiratórias, diabetes e câncer. Pode-se concluir, assim, que as bolsas periodontais são como reservatórios para diferentes patógenos (BERTOLINI et al., 2020; LARVIN et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

As doenças periodontais compreendem uma família de doenças que se diferem na etiologia como demonstrado nos Quadros 1 e 2, história natural, progressão e resposta à terapia. Já as doenças gengivais estão classificadas em dois tipos: aquelas induzidas pela placa dental e aquelas não são associadas primariamente à placa dental. Uma característica importante da subdivisão “induzida pela placa bacteriana” é o reconhecimento de que fatores sistêmicos podem modificar a expressão clínica da gengivite. Esses fatores são: alterações do sistema endócrino, medicamentos e a desnutrição (DIAS, PIOL, ALMEIDA, 2006).

DOENÇAS GENGIVAIS	
<u>Induzidas por Placa</u>	<u>Não Induzidas por Placa</u>
<p>Doenças gengivais associadas apenas à placa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem Fatores Locais; • Com Fatores Locais. 	<p>Doenças gengivais de origem bacteriana:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Associada a <i>Neisseria gonorrhoeae</i>; • Associada a <i>Treponema pallidum</i>; • Associada a <i>Streptococcus sp</i>; • Outros.
<p>Doenças Gengivais Modificadas por Fatores Sistêmicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Associada Ao Sistema Endócrino • Puberdade; • Ciclo Menstrual; • Gravidez; • Diabetes <i>Mellitus</i>; • Associada à Discrasias Sanguíneas • Leucemia; • Outros. 	<p>Doenças Gengivais de Origem Viral:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecção Por Herpes; • Outros.

<p>Doenças Gingivais Modificadas por Medicamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hiperplasias Influenciadas por Drogas; • Gingivites Influenciadas por Drogas; • Associada a Contraceptivos Orais; • Outros. 	<p>Doenças Gingivais de Origem Fúngica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecções Por <i>Candida</i> sp; • Eritema Gingival Linear; • Histoplasmose; • Outros.
<p>Doenças Gingivais Modificadas Por Desnutrição:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deficiência de Vitamina C; • Outros. 	<p>Manifestação de Condições Sistêmicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alterações mucocutâneas; • Reações Alérgicas; • Lesões Traumáticas; • Reações De Corpo Estranho; • Outras Não Especificadas.
	<p>Lesões Gingivais De Origem Genética.</p>

Quadro 1 - Classificação das Doenças Gingivais. Fonte: Adaptado - DIAS, PIOL, ALMEIDA. UFES Revista de Odontologia. 2006;8(2):59-65.

DOENÇAS PERIODONTAIS	
Periodontite Crônica	Periodontite Associada a Lesões Endodôntica
Periodontite Agressiva	Condições e Deformidades Congênitas ou Adquiridas
<p>Periodontite Como Manifestação de Doenças Sistêmicas:</p> <p>a. Associada a Discrasias sanguíneas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neutropenia adquirida; • Leucemias; • Outros. <p>b. Associada a Distúrbios Genéticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neutropenia Cíclica e Familiar; • Síndrome De Down; • Deficiência De Adesão Leucocitária. 	<p>Abcessos Periodontais:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abcesso Gingival; • Abcesso Periodontal; • Abcesso Pericoronário. <p>Doenças Periodontais Necrosantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gingivite Ulcerativa Necrosante; • Periodontite Ulcerativa Necrosante.

Quadro 2 - Classificação das Doenças Periodontais. Fonte - Adaptado: DIAS, PIOL, ALMEIDA. UFES Revista de Odontologia. 2006;8(2):59-65.

No caso da periodontite crônica, suas principais características foram definidas com taxa de progressão leve a moderada, podendo ter períodos de progressão rápida, presença de locais compatíveis com a severidade da doença e de ocorrência maior em adultos, porém pode acometer crianças e adolescentes. Há também a “Periodontite Agressiva” que

compreende um grupo de lesões caracterizadas por ocorrer em indivíduos geralmente saudáveis, cujas manifestações clínicas são caracterizadas por rápida perda de inserção e destruição óssea, que não condizem com a quantidade de acúmulo de placa (DIAS, PIOL, ALMEIDA, 2006).

Ainda não existem evidências que comprovem se gengivite ulcerativa necrosante e periodontite ulcerativa necrosante são duas entidades de doença pertencentes a um mesmo processo patológico ou se seriam duas condições totalmente distintas. Assim, acreditam ser mais apropriado, no presente momento, combiná-las em um único grupo de doenças, descritas como “Doenças Periodontais Necrosantes”, apesar de reconhecer que sejam duas condições clínicas identificáveis. Outro fator a ser considerado é que tanto a gengivite como a periodontite ulcerativa necrosante podem ser manifestações sistêmicas, como na infecção por HIV (DIAS, PIOL, ALMEIDA, 2006).

Neste grupo de doenças periodontais, podem ser incluídos também os abscessos periodontais, que possuem diagnóstico específico e tratamento diferenciado em relação a outras doenças periodontais, ainda podemos classificá-los em três subdivisões, que foram relacionadas de acordo com a sua localização, em abscesso gengival, abscesso periodontal e abscesso pericoronário. Estes podem ser reservatórios de patógenos na cavidade bucal tornando os abscessos periodontais como “uma porta de entrada” para o organismo humano (DIAS, PIOL, ALMEIDA, 2006; BERTOLINI et al., 2020; LARVIN et al., 2020; SOUSA et al., 2020).

2.5 Efeito da doença periodontal na COVID-19

Sugere-se que a COVID-19 possa estar vinculada à doença periodontal, já que possuem fatores de risco semelhantes com a obesidade, idade e hipertensão como demonstrado na Figura 1. Foi demonstrado que em indivíduos com doença periodontal possuem um agravamento da COVID-19. Considerando a relação entre COVID-19 e periodontite, é importante manter a saúde periodontal através de uma boa higiene bucal, o que colabora na melhora clínica da COVID-19 (SIDDHARTHAN, NAING, WAN-ARFAH, 2020; LARVIN et al., 2020; MAROUF, et al., 2021).



Figura 1 - Visão geral da Doença Periodontal e COVID-19. Fonte: Adaptado - SIDDHARTHAN et al. JPRI. 2020;32(32): 88-91.

A principal manifestação clínica da periodontite é a formação de bolsa periodontal, que por sua vez é considerada um ambiente ideal para formação de biofilmes bacterianos subgingivais, assim como espécies virais, por exemplo, o vírus epstein-barr (EBV), o vírus herpes simples (HSV) e o citomegalovírus humano (HCMV). A bolsa periodontal pode ser infectada por vírus, através da migração do vírus pelo sistema circulatório ou mediante as células epiteliais gengivais que estão expostas à cavidade oral ou ainda por meio de células imunes infectadas presentes na inflamação periodontal. Nessa perspectiva, eleva-se a possibilidade do vírus SARS-CoV-2 alcançar a bolsa periodontal e encontrar um meio para se multiplicar. Dessa forma, a bolsa periodontal pode ser um reservatório para o vírus (SANTOS et al., 2020; LARVIN et al., 2020).

Em estudos anteriores, foram verificadas características moleculares e histopatológica dos tecidos periodontais de cinco autópsias de pacientes com COVID-19. Em um dos pacientes foi demonstrado que a saliva e o fluido das fendas gengivais são fontes de vírus humanos na cavidade oral, embora não tenham analisado os componentes das mesmas, foi observada a presença de RNA SARS-CoV-2 no tecido periodontal, mesmo muitos dias após os primeiros sintomas. Este achado pode justificar a cavidade bucal como fonte de SARS-CoV-2, pois o vírus tem sido consistentemente detectado na saliva, sugerindo que pode estar relacionado ao acesso pela via específica no fluido crevicular. Da mesma forma, já foi demonstrado que a periodontite está significativamente associada a um maior risco de complicações da COVID-19, incluindo admissão na UTI, necessidade de assistência de ventilação e aumento dos níveis sanguíneos de marcadores vinculados a um pior resultado da COVID-19 (MATUCKA, et al., 2020; MAROUF, et al., 2020).

Além disso já foi demonstrado, em amostras de saliva de alguns pacientes, que o

SARS-CoV-2 pode ser detectado por 20 dias ou mais após os primeiros sintomas. Alguns pacientes possuem a saliva como o principal componente que são responsáveis pelo alto padrão de contágio do COVID-19. Neste contexto, a detecção de SARS-CoV-2 RNA no tecido periodontal chama atenção para possíveis implicações de tratamento periodontal para pacientes com COVID-19, como o desbridamento supra e subgingival, mesmo sem geração de aerossol, que pode ser potencialmente contaminante, lembrando assim que o cirurgião dentista deve se prevenir como mostrado na Figura 2 (MATUCKA, et al., 2020).



Figura 2 - Plano esquemático de ações e recomendações no tratamento dentário durante a pandemia da COVID-19. Fonte: Adaptado – CIRILLO et al. *Clinical Oral Investigations*. 2020;24:2529–2535.

Em estudos anteriores foi demonstrado que pacientes com periodontite crônica estão mais propensos a desenvolver infecção do SARS-CoV-2 através da mucosa oral, assim como a infecção pelo SARS-CoV-2 predisporia o desenvolvimento da doença periodontal necrosante. Ademais, foi descrito que as citocinas pró-inflamatórias da periodontite podem intensificar os sintomas da COVID-19 (SANTOS, et al., 2020; MATUCKA, et al., 2020; MAROUF, et al., 2020; SIDDHARTHAN, NAING, WAN-ARFAH, 2020).

3 | CONCLUSÃO

Portanto, como a bolsa periodontal pode funcionar como fonte de entrada e reservatório para o SARS-CoV-2, o tratamento da periodontite poderá diminuir a capacidade desse vírus infectar as células hospedeiras. Assim, como a prevenção e controle da infecção periodontal poderá reduzir a morbimortalidade, são necessários mais estudos a fim de compreender melhor a associação entre a doença periodontal e a COVID-19.

REFERÊNCIAS

- BERTOLINI, M; PITA, A; KOO, S; CARDENAS, A; MEETHIL, A; *et al.* Periodontal Disease in the COVID-19 Era: Potential Reservoir and Increased Risk for SARS–CoV-2. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 20, n. (supp1), p. 0134. Out., 2020.
- CIRILLO, N. COVID-19 outbreak: succinct advice for dentists and oral healthcare professionals. **Clinical oral investigations**, Advance online publication, 2020: 1–7.
- COSTA, I.B.S.S, BITTAR, C.S, RISK, S.I, ARAÚJO FILHO, A.E, SANTOS, K.A.Q, MACHADO, T.I.V, *et al.* O Coração e a COVID-19: O que o Cardiologista Precisa Saber. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo. v. 114, e.5, p. 805-816. 2020.
- DIAS, L,Z,S., PIOL, S,A,C., ALMEIDA, C,S,L. Atual classificação das doenças periodontais. **UFES revista de odontologia**, Vitória – ES. v. 8, n. 2, p. 59-65. Ago, 2006.
- HU, B; HUANG , S; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, Guangzhou, China., v. 93, p. 250–256. Jun., 2020.
- LARVIN, H; WILMOTT, S; WU, J; KANG, J. The Impact of Periodontal Disease on Hospital Admission and Mortality During COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Medicine**, Fang Hua, Wuhan University, China, v. 7, p. 604 – 980. Nov., 2020.
- LIMA, C.M.A.O. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). **Radiologia Brasileira**, Rio de Janeiro. v. 53, n. 2, p. V-VI. Mar/Abr, 2020.
- LIU, Y.C, KUO, R.L, SHIH, S.R.COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal** . v. 43, p. 328-333. May., 2020.
- MAROUF, N; CAI, W; SAID, K.N; DAAS, H; CHINTA, V.R; *et al.* Association between periodontitis and severity of COVID-19 infection: A case–control study. **Journal of Clinical Periodontology**, Qatar, Canadá, 00:1–9. Fev., 2021.
- MATUCKA, B.F; DOLHNIKOFFA, M; MAIAB, G.V.A.; SENDYKC, D.I; ZARPELLOND, A; *et al.* Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: a post-mortem study. **Journal Of Oral Microbiology**, São Paulo, v. 13, p. 1848135, 26 Nov., 2020.
- PIMENTEL, A.D.S.G, SILVA, M.R.M.O. Psychic Health in Times of Corona Virus. **Research, Society and Development**, Pará. v. 9, n. 7, e 11973602. Abr, 2020.
- PITONES-RUBIO, V; CHÁVEZ-CORTEZ, E.G; HURTADO-CAMARENA, A; GONZÁLEZ-RASCÓN, A; SERAFÍN-HIGUERA, N. Is periodontal disease a risk factor for severe COVID-19 illness?. **Medical Hypotheses**, México, v. 144, 109969, Nov., 2020.
- SANTOS, J.P.A; SILVA, J.C; SILVA, J.É.M; FILHO, E.S.D.D; *et al.* DOENÇA PERIODONTAL E COVID-19: O Que Podemos Inferir Da Literatura Até O Presente. **Odontologia Clínico-científica**, Recife, v. 19, n. 3, p. 238 – 242. Jul., 2020.
- SIDDHARTHAN,S; NAING, N.N; WAN-ARFAH, N. Periodontal Disease and COVID 19. **Journal of Pharmaceutical Research International**, China, v. 32(32): 88-91, Dec. 2020.
- SOUSA, S.C.A; SILVA, I.L; ALENCAR, L.B.B; ARAÚJO, V.F; MOURA, A.B.R, *et al.* Relação entre doenças sistêmicas e manifestações periodontais: um enfoque em grupos de risco da COVID-19. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, PR, v. 6, n. 11, p. 89109-89124, Nov., 2020.
- WIERSINGA, W.J, RHODES, A, CHENG, A.C, PEACOCK, S.J, PRESCOTT, H.C. **American Medical Association**, Amsterdam. v. 324, e. 8, p. 782-793. Jul., 2020.

TESTES PARA AVALIAR RESISTÊNCIA DE UNIÃO EM ODONTOLOGIA: REVISÃO DE LITERATURA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 06/10/2021

Renata Vasconcelos Monteiro

Universidade Federal do Amazonas – UFAM,
Departamento de Odontologia
Manaus – AM
<http://lattes.cnpq.br/2127397067526360>

Rodrigo Barros Esteves Lins

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB,
Faculdade de Odontologia – Campus VIII
Araruna - PB
<http://lattes.cnpq.br/7841492335090098>

Vitor Schweigert Bona

Universidade Federal de Santa Catarina –
UFSC,
Departamento de Odontologia
Florianópolis – SC
<http://lattes.cnpq.br/9669172668046352>

Daniela Micheline dos Santos

Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
Dentária
Araçatuba - SP
<http://lattes.cnpq.br/6403786288807474>

RESUMO: A longevidade e o sucesso das restaurações dentárias estão diretamente relacionados à eficácia e durabilidade da adesão do material restaurador à estrutura dentária. Sendo assim, estudos *in vitro* realizados a partir de testes laboratoriais são necessários para se avaliar a qualidade da resistência de união,

como os testes de resistência ao cisalhamento e à tração, que apresentam o propósito de avaliar a eficácia da adesão dos sistemas adesivos ao esmalte e à dentina. Portanto, este artigo tem como objetivo apresentar uma revisão da literatura acerca dos métodos mecânicos de avaliação da resistência de união (resistência à tração, microtração, cisalhamento e microcisalhamento) realizados a partir de estudos laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: Testes mecânicos. Resistência à tração. Resistência ao cisalhamento.

TESTS TO EVALUATE THE BOND STRENGTH IN DENTISTRY: LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: The longevity and success of dental restorations are directly related to the effectiveness and durability of the adhesion of the restorative material to the tooth structure. Therefore, *in vitro* studies carried out from laboratory tests are necessary to assess the bond strength, such as the shear and tensile strength tests, which have the purpose of evaluating the effectiveness of adhesion of adhesive systems to enamel and to dentin. Therefore, this article aims to present a literature review on mechanical methods for evaluating bond strength (tensile strength, microtensile, shear and microshear) performed from laboratory studies.

KEYWORDS: Mechanical tests. Tensile strength. Shear strength.

1 | INTRODUÇÃO

Procedimentos restauradores realizados

na clínica odontológica utilizando-se de materiais que apresentam adesão à estrutura dentária ganharam popularidade a partir da década de 60 e hoje constituem os materiais de escolha a serem utilizados tanto para dentes anteriores, como para posteriores (DEMARCO et al.,2017; FERRACANE 2011). O aumento pela procura destes materiais em substituição à utilização do amálgama, atrelada a prevalência da doença cárie em grande parte da população, caracterizada como um dos maiores problemas de saúde pública mundial, contribuem para o aumento da busca por materiais adesivos (WHO, 2009).

As propriedades ópticas e mecânicas destes materiais, assemelhando-se às características do dente natural, assim como um baixo custo, uma técnica minimamente invasiva e principalmente, por apresentarem adesão ao esmalte e à dentina, caracterizando-se como vantagens que justificam a sua grande aceitação por parte da população e pelos cirurgiões-dentistas (DEMARCO et al.,2017; FERRACANE, 2011).

Tendo em vista esta alta demanda, pesquisadores e fabricantes desenvolvem materiais com tecnologias cada vez mais superiores, mitigando limitações clínicas destes materiais, todavia, pesquisas científicas são desenvolvidas a fim de caracterizar cada material e confirmar sua segurança e aplicabilidade clínica. Portanto, antes de serem realizados estudos clínicos com materiais novos no mercado, deve-se realizar os estudos laboratoriais, os denominados estudos *in vitro*, observacionais, os quais têm como objetivo avaliar tanto as propriedades do material em si, como também a sua interação com às estruturas dentais.

Entende-se que os estudos laboratoriais apresentam uma maior quantidade de limitações ou presença de vieses de pesquisa comparados aos estudos clínicos, contudo, em ambiente laboratorial consegue-se isolar o fator de estudo, avaliando precisamente a adesão do material (GARCIA et al., 2002). A adesão, conceituada por Reis e colaboradores (2021) como a força que mantém juntas duas substâncias ou substratos, pode ser avaliada por testes mecânicos de resistência de união (material restaurador – esmalte ou dentina) que tendem a avaliar a força de união entre dois substratos que sofrem uma força de deslocamento diretamente sobre a interface adesiva ou à distância a ela (GARCIA et al., 2002). Portanto, torna-se mais coerente a aplicação clínica de materiais restauradores que apresentam sucesso ou que demonstrem ter resultados promissores a partir de estudos laboratoriais, garantindo a sua eficácia e segurança clínica.

Desta forma, este artigo tem como objetivo apresentar uma revisão da literatura acerca dos métodos mecânicos de avaliação da resistência de união (resistência à tração, microtração, cisalhamento e microcisalhamento) realizados a partir de estudos laboratoriais.

2 | REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Teste de Resistência à Tração

Em um teste de resistência à tração a força é aplicada perpendicularmente a interface adesiva. Quando um material aderido à uma superfície plana é submetido ao teste de tração a distribuição do stress ao longo da interface adesiva não é uniforme e a presença de defeitos ao longo da interface podem desencadear a propagação de fratura. (VAN NOORT, 1989; PASHLEY, 1995,). Em um estudo realizado por Sano et al. (1994a), foi observado que a área de superfície de adesão influencia os valores de resistência de união. Quanto maior a área de superfície de adesão mais susceptível é a presença de defeitos e/ou stress (GRIFFITH, 1920), conseqüentemente menores são os valores da resistência adesiva. Na tentativa de avaliar a resistência de união de interfaces adesivas em espécimes de dimensões reduzidas e reproduzir resultados mais perto de seus valores reais foi introduzido o teste de microtração (SANO et al., 1994a).

2.2 Teste de Resistência à Microtração

O teste recebe este nome em virtude de os espécimes testados apresentarem uma área de adesão abaixo de 2mm², fig. 1-e, (SANO et al., 1994b, GAMBORGHI; LOGUERCIO; REIS, 2007, FRANKENBERGER et al., 2001). Segundo Pashley et al., (1995) uma das maiores vantagens deste teste é a possibilidade de obter, na maioria dos espécimes, mais falhas adesivas que coesivas. Além disso, é possível obter múltiplos espécimes de uma única amostra, permitindo avaliar a variabilidade intra e inter-dentes, testar superfícies irregulares e áreas muito pequenas, e o tamanho dos espécimes facilita a análise pela microscopia eletrônica de varredura. No entanto, devido as dimensões reduzidas eles são de difícil fabricação e manejo, e são facilmente danificados e desidratados. É um teste trabalhoso, que exige treinamento do operador e requer equipamentos especiais para execução (PASHLEY et al., 1995, ARMSTRONG et al., 2010).

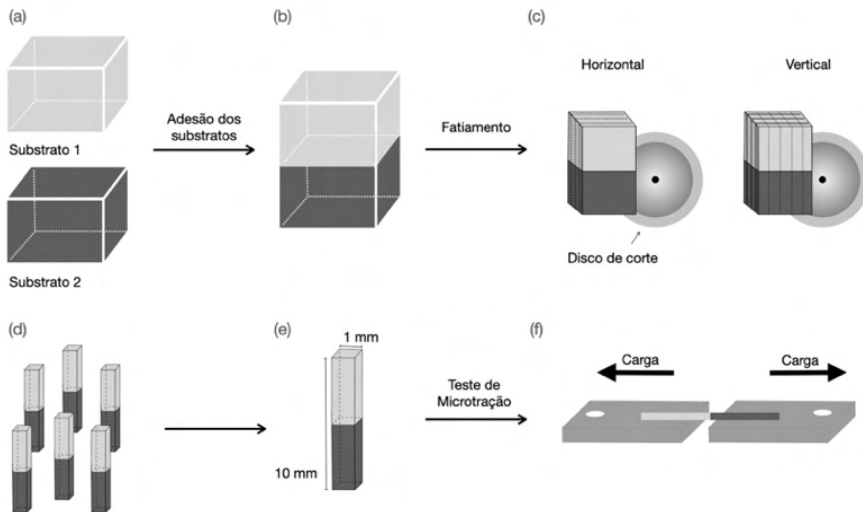


Fig. 1 – Teste de resistência a microtração. (a) Substratos 1 e 2 previamente a união. (b) Substratos 1 e 2 unidos formando um bloco único. (c) Cortes sequenciais horizontais e verticais do bloco para obtenção dos corpos de prova. (d) Corpos de prova em forma de palitos. (e) Palitos com seção transversal por volta de 1mm^2 . (f) Corpos de prova fixados com cola de cianocrilato ao dispositivo específico, posicionado paralelamente ao longo eixo e a interface de união perpendicular ao dispositivo.

O teste baseia-se em cortes perpendiculares da amostra para formar corpos de prova em formato de palito, com uma seção transversal por volta de 1mm^2 (fig. 1-e) (SANO et al., 1994, GAMBORGHI; LOGUERCIIO; REIS, 2007). Um parâmetro importante a ser definido é a altura do espécime ao longo da interface de adesão. Para uma altura inferior a 3 mm, as tensões resultantes da aplicação da carga são deslocadas da superfície para dentro do material. Portanto, a falha pode ser deslocada para um local imprevisível onde um defeito interno existe. (VAN NOORT,1989). Dessa forma, há uma exigência de altura mínima de 3mm.

Outro fator a ser considerado é a geometria dos corpos de prova para a realização do teste. Ghassemieh (2008) ao comparar três geometrias de amostras observou que as em forma de ampolheta apresentaram uma melhor distribuição de tensão na interface adesiva que as em forma de halhete e bastão. No entanto, uma vez que essas amostras precisam de um corte adicional após a secção, o risco de indução de falhas ou defeitos na borda é maior. Segundo Neves et al., (2008) a presença de entalhe nos corpos de prova aumenta a concentração de tensões axiais e afeta a distribuição geral do stress. Portanto, sugere-se usar em um teste de microtração espécimes em forma de bastão (fig.1-d) onde a concentração indesejável de tensão causada pelo entalhe e a indução adicional de stress não está presente.

Para realização do teste os corpos de prova são fixados a um dispositivo específico. O ideal é que o espécime esteja posicionado ao dispositivo paralelamente ao longo eixo e a interface de união perpendicular ao dispositivo (fig.1-f), uma vez que a carga aplicada

fora do eixo produz uma distribuição de tensão de flexão dentro da interface, reduzindo os valores de resistência de união (ZHENG et al., 2001, SILVA et al., 2006). Para facilitar o alinhamento dos corpos de prova foi desenvolvido o dispositivo de Geraldeli, permitindo o auto-alinhamento dos espécimes previamente a realização do teste (PERDIGÃO et al., 2002). No entanto, esse tipo de dispositivo requer a fixação dos espécimes com cola de cianocrilato. Esse método de fixação pode induzir a falha no substrato, aumentando a prevalência de falhas coesivas e conseqüentemente influenciando o resultado do teste (RAPOSO et al., 2012). Além disso, um cuidado deve ser tomado no momento da aplicação da cola, pois se a cola entrar em contato com a interface adesiva os valores obtidos com o teste de microtração não reproduzirão a verdadeira resistência de união da interface (SOARES et al., 2008).

Em virtude disso e da dificuldade de manuseio com o uso da cola foram desenvolvidos dispositivos em que a fixação dos espécimes é feita sem cola, por meio de prensão passiva (PHRUKKANON; BURROW; TYAS, 1998, ARMSTRONG et al. 2003, SATTABANASUK et al., 2007). No entanto, estes não foram amplamente aceitos, pois requerem equipamentos adicionais e necessitam da obtenção de amostras com geometria específica, que podem exigir método computadorizado de fabricação com um alto custo para execução (SOARES et al., 2008, ARMSTRONG et al., 2010).

2.3 Teste de Resistência ao Cisalhamento

Em um teste convencional de cisalhamento, um material em forma de cilíndrico é aderido a outro material através de um agente de união (JIN et al., 2016). O teste baseia-se no rompimento da união por uma força aplicada paralelamente a interface adesiva até a falha ocorrer (VAN NOORT et al., 1989, VERSLUIS; TANTBIROJN; DOUGLAS, 1997). Esse teste, em comparação ao teste de tração, tem sido preferível por pesquisadores devido a simplicidade da fabricação das amostras, pois não há necessidade de corte para obtenção dos espécimes, o que evita indução de stress na interface de união e falhas prematuras (CARDOSO; BRAGA; CARRILHO 1998, XAVIER et al., 2009, ANDRADE et al., 2010).

Para a realização do teste um parâmetro importante é a posição de aplicação da carga em relação a interface adesiva. Segundo Van Noort et al. (1989) a aplicação de carga pontual distante da interface adesiva gera momentos de flexão, com predomínio de tensões de tração e não de cisalhamento. Hatamleh et al., (2011) observaram que quanto mais próximo a carga da interface adesiva mais uniforme é a distribuição de tensão e menor é a influência do momento de flexão, conseqüentemente mais fidedignos são os resultados. Dessa forma, em um teste de cisalhamento a carga deve ser aplicada o mais próximo possível da interface adesiva.

A força de cisalhamento pode ser aplicada por diferentes configurações de carregamento. DeHoff, Anusavice e Wang (1995) ao comparar o carregamento da carga com lâmina de faca e fio ortodôntico observaram que o uso da lâmina de faca resulta

em uma maior concentração de tensão próximo ao local de carregamento, em virtude da pequena área de contato entre a lâmina e o espécime. Já o fio, por envolver metade da circunferência do cilindro, permite uma melhor distribuição de tensão em torno da interface adesiva. No entanto, Braz et al., (2010) observaram que o carregamento da carga com fita de aço inoxidável, ao invés de lâmina de faca e fio, cria as melhores condições para o estabelecimento de um teste de cisalhamento verdadeiro. Uma vez que a maior área de contato entre fita de aço inoxidável e o cilindro permite a que a distribuição de tensão ocorra ao longo de toda a interface de ligação.

O teste de cisalhamento convencional é comumente usado em odontologia para testar a força de adesão, no entanto a heterogeneidade da distribuição de tensão e a incidência de falhas coesivas subestimou a validade do teste (VAN NOORT et al., 1989, DELLA BONA; VAN NOORT, 1995, VERSLUIS; TANTBIROJN; DOUGLAS, 1997, BRAGA et al., 2010). Para contornar esses problemas espécimes com dimensões reduzidas (abaixo de 2mm) substituindo o convencional tem sido preferido por muitos autores, o chamado teste de micro-cisalhamento (BRAGA et al., 2010, SHIMAOKA et al., 2011, MUNOZ et al., 2014, LOGUERCIO et al., 2015). Segundo Placido et al. (2007) é importante deixar claro que estudos sobre distribuição de tensão em ensaios convencionais de cisalhamento não podem ser aplicado ao método de micro-cisalhamento, uma vez que existe diferença de proporcionalidade geométrica de ambos os testes.

2.4 Teste de Resistência ao microcisalhamento

Em um teste de micro-cisalhamento, previamente a construção dos espécimes cilíndricos, uma fita dupla face ácido/solvente resistente é colocada sobre o material aderente com o objetivo de delimitar a área adesiva (LOGUERCIO et al., 2015). Shimaoka et al., (2011) ao avaliar a influência da delimitação da área adesiva na resistência de união ao microcisalhamento, observaram que quando o adesivo é aplicado em todo o substrato é difícil garantir que a área que está sendo testada é restrita à circunferência do cilindro, conseqüentemente a fratura pode acontecer além dos limites do espécime cilíndrico. Além disso, pode ocasionar excesso de adesivo ao redor do tubo, o que prejudica o posicionamento correto do fio ao redor da interface adesiva e influencia negativamente a distribuição de tensão durante o carregamento da amostra. Portanto, ao delimitar a área adesiva ocorre uma melhor distribuição de stress em torno do espécime cilíndrico no nível da interface adesiva. Segundo Chai et al., (2015) essa é uma etapa fundamental para controlar a variabilidade em testes de resistência de micro-cisalhamento, proporcionando resultados mais confiáveis.

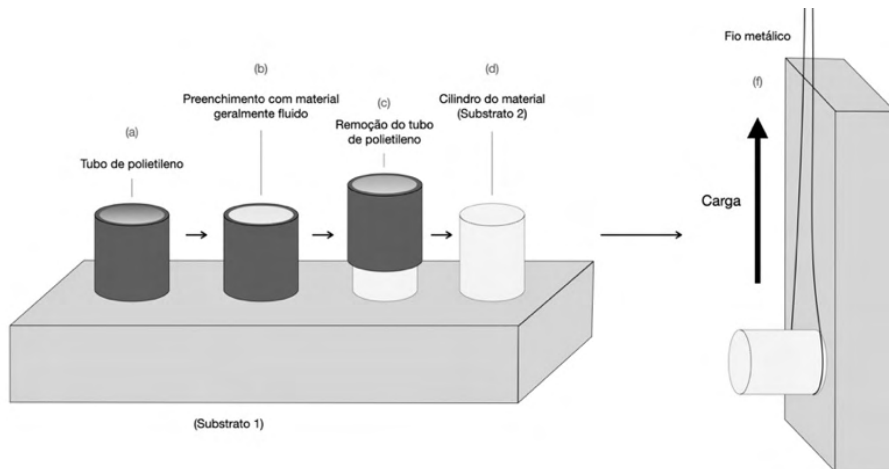


Fig. 2 – Teste de resistência ao cisalhamento (a) Tubo de polietileno é posicionado sobre o substrato 1. (b) Preenchimento do tubo com material preferencialmente fluido. (c) Remoção do tubo delicadamente. (d) Obtenção do cilindro do segundo substrato. (f) Carga de cisalhamento aplicada por um fio metálico. (Figura adaptada de Garcial et al. 2007).

Para preparar a amostra tubos de polietileno são usualmente utilizados (fig.2-a) como molde para colocação do material (SHIMADA; YAMAGUCHI; TAGAMI, 2002, MUNOZ et al., 2014, LOGUERCIO et al., 2015). Para o teste micro, materiais fluidos são preferíveis, uma vez que a consistência facilita o enchimento do molde (fig.2-b). Já para os testes de cisalhamento, os cilindros são comumente obtidos com materiais condensáveis (XAVIER et al., 2009).

Após a construção dos espécimes cilíndricos o operador usa uma lâmina de bisturi para remover os tubos cilíndricos manualmente (fig.2-c). A pressão exercida sobre a lâmina pelo operador, a fim de cortar e remover os tubos de polietileno, pode ser transferido ao espécime cilíndrico e como consequência ocasionar estresse na interface adesiva e falhas prematuras (ANDRADE et al., 2012). Para evitar esses problemas, as matrizes de tubo de polietileno podem ser substituídas por macarrão. Quando submerso na água, o macarrão amolece e pode ser facilmente removido do com um explorador (MORO et al., 2017).

Uma vez preparada as amostras, o fio ortodôntico com espessura de 0,2 mm têm sido o mais comumente utilizado (fig.2-f) para o carregamento de carga em um teste de micro-cisalhamento (SHIMADA; YAMAGUCHI; TAGAMI, 2002, SHIMAOKA et al., 2011, LOGUERCIO et al., 2015,). O uso do fio é simples e pode ser mais facilmente posicionado na interface adesiva (FOONG et al., 2006). Todavia, a deformação do fio durante a aplicação da carga pode ser uma preocupação. Mas ele parece não influenciar no teste, uma vez que ele não altera a intensidade nem direção da força e não muda o plano de tensão de contato entre o fio e a amostra (PLACIDO et al., 2007).

31 CONCLUSÃO

A realização de testes laboratoriais voltados para os materiais dentários que apresentam adesão à estrutura dental é essencial de ser desenvolvido primordialmente a sua aplicação clínica, a fim de se comprovar a sua efetividade e segurança clínica. Para tanto, diversas metodologias são desenvolvidas com esta finalidade, sendo as de microtração e microcisalhamento as de maior sensibilidade.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, A.M.; GARCIA, E.; MOURA, S.K.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.; SILVA, L.M.; PIMENTEL, G.H.; GRANDE, R.H. Do the microshear test variables affect the bond strength values? **International journal of dentistry**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
2. ANDRADE, A.M.; MOURA, S.K.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D.; GARCIA, E.J.; GRANDE, R.H. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. **Journal of applied oral science**, v.18, n. 6, p. 591-598, 2010.
3. ARMSTRONG, S.; GERALDELI, S.; MAIA, R.; RAPOSO, L.H.; SOARES, C.J.; YAMAGAWA, J. Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. **Dental materials**, v.26, n.2, p. e50-62, 2010.
4. ARMSTRONG, S.R.; VARGAS, M.A.; FANG, Q.; LAFFOON, J.E. Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. **The journal of adhesive dentistry**, v.5, n.1, p.47-56, 2003.
5. BRAGA, R.R.; MEIRA, J.B.; BOARO, L.C.; XAVIER, T.A. Adhesion to tooth structure: a critical review of "macro" test methods. **Dental materials**, v.26, n.2, p. e38-e49, 2010.
6. BRAZ, R.; SINHORETI, M. A.C.; SPAZZIN, A.O.; LORETTO, S.C.; DE CASTRO LYRA, A.M.V.; DE MEIRA-JÚNIOR, A.D. Shear bond strength test using different loading conditions – a finite element analysis. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.9, n.4, p.439-442, 2010.
7. CARDOSO, P.E.; BRAGA, R.R.; CARRILHO, M.R. Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. **Dental materials**, v.14, n.6, p. 394-398, 1998.
8. CHAI, Y.; LIN, H.; ZHENG, G.; ZHANG, X.; NIU, G.; DU, Q. Evaluation of the micro-shear bond strength of four adhesive systems to dentin with and without adhesive area limitation. **Bio-medical materials and engineering**, v.26, n.1, p.S63-S72, 2015.
9. DEHOFF, P.H.; ANUSAVICE, K.J.; WANG, Z. Three-dimensional finite element analysis of the shear bond test. **Dental materials**, v.11, n.2, p. 126-131, 1995.
10. DELLA BONA, A.; VAN NOORT, R. Shear vs. tensile bond strength of resin composite bonded to ceramic. **Journal of Dental Research**, v.74, n.9, p. 1591-1596, 1995.
11. DEMARCO, F.F.; COLLARES, K.; CORREA, M.B.; CENCI, M.S.; MORAES, R.R.; OPDAM, N.J. Should my composite restorations last forever? Why are they failing? **Brazilian Oral Research**, v.31, n.1, p. 92-99, 2017.

12. FERRACANE, J.L. Resin composite--state of the art. **Dental materials**, v.27, n.1, p.29-38, 2011.
13. FOONG, J.; LEE, K.; NGUYEN, C.; TANG, G.; AUSTIN, D.; CH'NG, C.; BURROW, M.F.; THOMAS, D.L. Comparison of microshear bond strengths of four self-etching bonding systems to enamel using two test methods. **Australian dental journal**, v.51, n.3, p.252-257, 2006.
14. FRANKENBERGER, R.; PERDIGÃO, J.; ROSA, B.T.; LOPES, M. "No-bottle" vs "multi-bottle" dentin adhesives--a microtensile bond strength and morphological study. **Dental materials**, v. 17, n. 5, p. 373-380, 2001.
15. GAMBORGI, G.P.; LOGUERCIO, A.D; REIS, A. Influence of enamel border and regional variability on durability of resin-dentin bonds. **Journal of dentistry**, v.35, n.5, p. 371-376, 2007.
16. GARCIA, F.C.P.; D'ALPINO, P.H.P.; TERADA, R.S.S.; CARVALHO, R.M. Testes mecânicos para a avaliação laboratorial da união resina/dentina. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, n.3, p.118-127, 2002.
17. GARCIA, N.G.; SOUZA, C.R.S.; JUSTINO, L.M.; SCHEIN, M.T.; GIANNINI, M. Bond strength of two self-etching adhesive systems – Review of the literature and application of the microshear test. **Revista Sul-Brasileira de odontologia**, v.4, n.1, p.37-45, 2007.
18. GHASSEMIH, E. Evaluation of sources of uncertainties in microtensile bond strength of dental adhesive system for different specimen geometries. **Dental materials**, v.24, n.4, p. 536-347, 2008.
19. GRIFFITH, A.A. The phenomena of rupture and flow in solids. Series A, **Containing Papers of a Mathematical or Physical Character**, v. 221, p.163-198, 1921.
20. HATAMLEH, M.M.; RODRIGUES, F.P.; SILIKAS, N.; WATTS, D.C. 3D-FE analysis of soft liner-acrylic interfaces under shear loading. **Dental materials**, v.27, n.5, p.445-454, 2011.
21. JIN, X.Z.; HOMAEI, E.; MATINLINNA, J.P.; TSOI, J.K.H. A new concept and finite-element study on dental bond strength tests. **Dental materials**, v.32, n.10, p.e238-e250, 2016.
22. LOGUERCIO, A.D.; MUÑOZ, M.A.; LUQUE-MARTINEZ, I.; HASS, V.; REIS, A.; PERDIGÃO, J. Does active application of universal adhesives to enamel in self-etch mode improve their performance? **Journal of dentistry**, v.43, n.9, p.1060-1070, 2015.
23. MORO, A.F.V.; RAMOS, A.B.; ROCHA, G.M.; PEREZ, C.D.R. Effect of prior silane application on the bond strength of a universal adhesive to a lithium disilicate ceramic. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.118, n.5, p.666-671, 2017.
24. MUÑOZ, M.A.; BAGGIO, R.; EMILIO MENDES, Y.B.; GOMES, G.M.; LUQUE-MARTINEZ, I.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A. The effect of the loading method and cross-head speed on resin–dentin microshear bond strength. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 50, p. 136-141, 2014.
25. NEVES, A.A.; COUTINHO, E.; CARDOSO, M.V.; JAECQUES, S.; LAMBRECHTS, P.; SLOTEN, J.V.; VAN OOSTERWYCK, H.; VAN MEERBEEK, B. Influence of notch geometry and interface on stress concentration and distribution in micro-tensile bond strength specimens. **Journal of dentistry**, v.36, n.10, p. 808-815, 2008.

26. PASHLEY, D.H.; SANO, H.; CIUCCHI, B.; YOSHIYAMA, M.; CARVALHO, R.M. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. **Dental materials**, v.11, n.2, p. 117-125, 1995.
27. PERDIGÃO, J.; GERALDELI, S.; CARMO, A.R.; DUTRA, H.R. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. **Journal of esthetic and restorative dentistry**, v.14, n.1, p.31-38, 2002.
28. PHRUKKANON, S.; BURROW, M.F.; TYAS, M.J. Effect of cross-sectional surface area on bond strengths between resin and dentin. **Dental materials**, v.14, n.2, p.120-128, 1998.
29. PLACIDO, E.; MEIRA, J.B.; LIMA, R.G.; MUENCH, A.; DE SOUZA, R.M.; BALLESTER, R.Y. Shear versus micro-shear bond strength test: a finite element stress analysis. **Dental materials**, v.23, n.9, p.1086-1092, 2007.
30. RAPOSO, L.H.; ARMSTRONG, S.R.; MAIA, R.R.; QIAN, F.; GERALDELI, S.; SOARES, C.J. Effect of specimen gripping device, geometry and fixation method on microtensile bond strength, failure mode and stress distribution: laboratory and finite element analyses. **Dental materials**, v.28, n.5, p.e50-62, 2012.
31. REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. *Materiais Dentários Diretos Dos Fundamentos a Aplicação Clínica*. 2 ed. Ed Guanabara Koogan, 2021.
32. SANO, H.; CIUCCHI, B.; MATTHEWS, W.G.; PASHLEY, D.H. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. **Journal of dental research**, v.73, n.6, p. 1205-1211, 1994b.
33. SANO, H.; SHONO, T.; SONODA, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R.; PASHLEY, D.H. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. **Dental materials**, v.10, n.4, p. 236-240, 1994a.
34. SATTABANASUK, V.; VACHIRAMON, V.; QIAN, F.; ARMSTRONG, S.R. Resin-dentin bond strength as related to different surface preparation methods. **Journal of dentistry**, v.35, n.6, p.467-475, 2007.
35. SHIMADA, Y.; YAMAGUCHI, S.; TAGAMI, J. Micro-shear bond strength of dual-cured resin cement to glass ceramics. **Dental materials**, v.18, n.5, p.380-388, 2002.
36. SHIMAOKA, A.M.; DE ANDRADE, A.P.; CARDOSO, M.V.; DE CARVALHO, R.C. The importance of adhesive area delimitation in a microshear bond strength experimental design. **The journal of adhesive dentistry**, v.13, n.4, p.307-314, 2011.
37. SILVA, N.R.; CALAMIA, C.S.; HARSONO, M.; CARVALHO, R.M.; PEGORARO, L.F.; FERNANDES, C.A.; VIEIRA, A.C.; THOMPSON, V.P. Bond angle effects on microtensile bonds: laboratory and FEA comparison. **Dental materials**, v.22, n.4, p.314-324, 2006.
38. SOARES, C.J.; SOARES, P.V.; SANTOS-FILHO, P.C.; ARMSTRONG, S.R. Microtensile specimen attachment and shape--finite element analysis. **Journal of dental research**, v.87, n.1, p.89-93, 2008.
39. VAN NOORT, R.; NOROOZI, S.; HOWARD, I.C.; CARDEW, G. A critique of bond strength measurements. **Journal of Dentistry**, v.17, n.2, p. 61-67, 1989.

40. VERSLUIS, A.; TANTBIROJN, D.; DOUGLAS, W.H. Why do shear bond tests pull out dentin? **Journal of dental research**, v.76, n.6, p. 1298-1307, 1997.

41. WHO HQ. Future use of materials for dental restoration: report of the meeting convened at WHO HQ, Geneva, Switzerland 16th to 17th November 2009.

42. XAVIER, T.A.; MEIRA, J.B.C.; RODRIGUES, F.P.; LIMA, R.G.; BALLESTER, R.Y. Finite Element Analysis of Shear Versus Torsion Adhesive Strength Tests for Dental Resin Composites. **Journal of adhesion science and technology**, v.23, p.1575-1589, 2009.

43. ZHENG, L.; PEREIRA, P.N.; NAKAJIMA, M.; SANO, H.; TAGAMI, J. Relationship between adhesive thickness and microtensile bond strength. **Operative dentistry**, v.26, n.1, p. 97-104, 2001.

CAPÍTULO 4

QUALIDADE DE VIDA E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE PACIENTES ONCOLÓGICOS EM QUIMIOTERAPIA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 31/08/2021

Dalton Luiz Schiessel

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/7922612257223273>

Eduarda Kaczuk Refosco

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/2543388864605512>

Gabriela Datsch Bennemann

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/2485854845988259>

Angélica Rocha de Freitas Melhem

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/6955795162478080>

Caryna Eurich Mazur

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/6817895976879675>

Mariana Abe Vicente Cavagnari

Departamento de Nutrição – Universidade Estadual do Centro Oeste
Guarapuava – PR – Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/3616777949691496>

RESUMO: Introdução: O câncer por si só e tratamento quimioterápico aumenta a perda de peso e pode levar ao catabolismo muscular alterando a composição corporal. A alimentação e estilo de vida são fatores determinantes sobre a saúde, sendo que a relação entre dieta e câncer reflete na qualidade de vida de quem está em tratamento oncológico. **Objetivo:** Analisar a qualidade de vida e composição corporal em pacientes oncológicos em quimioterapia. **Materiais e Métodos:** Estudo transversal com pacientes diagnosticados com câncer realizado em um hospital em Guarapuava-PR. O estado nutricional foi avaliado pelas variáveis antropométricas IMC, e mudança de peso; e composição corporal foi aferida por bioimpedância elétrica. Qualidade de vida foi avaliada por meio do questionário WHOQOL-BREF. **Resultados:** Participaram do estudo 29 pacientes, com idade média de 63 anos, sendo 31 % do sexo feminino e 69% do sexo masculino. Sobre a percepção da qualidade de vida e a satisfação com sua saúde os resultados obtidos foram de 34,5% no geral para a pergunta sobre percepção de qualidade de vida e para pergunta sobre a satisfação com sua saúde a maior prevalência aponta a opção “regular”, demonstra que de 29 pacientes 14 destes, não estavam satisfeitos com a sua saúde. **Conclusão:** Estudo colabora em evidenciar o impacto que ocorre com o tratamento oncológico na composição corporal do indivíduo e quando relacionado este com a qualidade de vida. Assim a importância da análise conjunta itens para contribuir melhorando os domínios avaliados do paciente que responderá de forma melhor ao

tratamento oncológico.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer; Avaliação Nutricional; Estado nutricional, Qualidade de Vida.

QUALITY OF LIFE AND BODY COMPOSITION OF CANCER CHEMOTHERAPY PATIENTS

ABSTRACT: Introduction: Cancer per se and chemotherapy treatment increases weight loss and can lead to muscle catabolism by altering body composition. Diet and lifestyle are key determinants of health, and the relationship between diet and cancer reflects on quality of life of those undergoing cancer treatments. **Objective:** Analyze the quality of life and body composition in cancer patients undergoing chemotherapy. **Materials and Methods:** Cross-sectional study with patients diagnosed with cancer in a hospital in Guarapuava-PR. Nutritional status was assessed by anthropometric variables BMI, and weight change; body composition was measured by bioelectrical impedance. Quality of life was assessed using the WHOQOL-BREF questionnaire. **Results:** This study included 29 patients, with a mean age of 63 years, 31% female and 69% male. Regarding the perception of quality of life and satisfaction with their health the results obtained were 34.5% overall for the question about perception of quality of life and for question about satisfaction with their health the highest prevalence points to the option “regular” Shows that of 29 patients 14 of these were not satisfied with their health. **Conclusion:** This study contributes to highlight the impact that occurs with cancer treatment on the body composition of the individual and when related to the quality of life. Thus, the importance of the joint analysis of these two items to contribute to improving the evaluated domains of the patient who will respond better to cancer treatment. **Keywords:** Cancer; Nutritional assessment; Nutritional status, Quality of life

INTRODUÇÃO

A desnutrição em pacientes oncológicos varia conforme a localização do tumor, em resposta a combinação da ingestão reduzida de alimentos e alterações metabólicas, incluindo aumento de catabolismo proteico e energético, excesso de fatores pró-inflamatórios e consequente perda de peso corporal. A esse conjunto de fatores dá-se o nome de “Caquexia Associada ao Câncer” (CAC) ¹.

Está bem documentado na literatura que a prevalência de desnutrição em pacientes oncológicos é alta, variando entre 25% e 70%, tendo como referência as avaliações nutricionais. Entretanto, a desnutrição nesses pacientes permanece sub diagnosticada e sub tratada ^{2, 3}.

Pacientes com CAC apresentam complicações relacionadas ao tratamento (toleram menos ciclos de quimioterapia e possuem alto risco de toxicidade). Além disso, apresentam menor qualidade de vida (QV) e redução de sobrevida^{4,5,6,7} o que representa a causa direta de pelo menos 20% de óbitos associados ao câncer⁸.

Na maioria dos tipos de câncer, as alterações catabólicas relacionadas ao tratamento de quimioterapia aumentam substancialmente a perda geral de peso e redução

de massa muscular, o que pode alterar a composição corporal. Os efeitos colaterais comuns da quimioterapia citotóxica incluem anorexia, náuseas e vômitos, que são sintomas nutricionalmente impactantes que contribuem para reduzir a ingestão de alimentos e, portanto, para perda de peso^{9,10}.

Vários agentes quimioterápicos como a oxaliplatina¹¹, cisplatina¹², antraciclinas, 5-fluorouracilo e irinotecano, parecem ser absorvidos por células musculares e induzem atrofia¹³. A doxorubicina suprime a síntese proteica e ativa a sinalização proteolítica¹⁴. Ainda, o tratamento antineoplásico aumenta os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias¹⁵ que contribuem para a indução da CAC¹⁶ e para a sarcopenia relacionada à obesidade¹⁷.

Em suma, o tratamento quimioterápico provoca sintomas de impacto nutricional que limitam ou impedem o paciente de se alimentar, alterando a quantidade e qualidade da dieta¹⁸.

A alimentação e o estilo de vida são fatores determinantes sobre a saúde dos pacientes oncológicos. Destaca-se ainda a importância da avaliação da qualidade de vida (QV) de quem está em tratamento para qualquer tipo de neoplasia, pois a QV, principalmente na presença da desnutrição, tende a afetar a capacidade funcional em resposta ao tratamento e a sobrevida do paciente¹⁹.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, QV é a visão que o indivíduo tem sobre a sua vida, seja baseado em suas culturas, valores, relações, objetivos, padrões, expectativas e preocupações que vivencia²⁰. Em pacientes oncológicos a QV é influenciada por fatores como a dor, depressão, alteração no estilo de vida, os desconfortos físicos, psicossociais e espirituais que estes indivíduos vivenciam e a luta no curso da doença diminuem a QV, merecendo ainda mais atenção dos profissionais da área de saúde²¹.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição corporal, e a QV de pacientes oncológicos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal prospectivo realizado com pacientes com diagnóstico de câncer avaliados até 48 horas de internação em um hospital filantrópico do Centro Oeste no estado do Paraná, durante o período de fevereiro a abril de 2019. O estudo considerou os critérios éticos em pesquisa sobre aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com parecer 1.593.833 de 16/06/2016. Os critérios de inclusão foram: possuir diagnóstico clínico de câncer e estar realizando tratamento quimioterápico preferencialmente na primeira sessão, ser alfabetizado, ser maior de 18 anos de idade e aceitar participar da pesquisa concordando com as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que o presente estudo foi aprovado, bem como preencher o questionário de QV (WHOQOL-BREF)²². Os critérios de exclusão foram pacientes em cuidados paliativos e portadores de prótese metálica ou marca-passo, devido à realização da bioimpedância.

Avaliação geral; antropométrica e composição corporal

Para caracterização da amostra foram obtidos dados sócio-demográficos, hábitos de vida e avaliação antropométrica (peso habitual (kg), peso atual (kg), altura (m) e o índice de massa corpórea (IMC - kg/m^2). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado por meio da razão entre peso corporal (kg) e quadrado da altura (m), classificado segundo a Organização Mundial de Saúde²³.

A perda de peso foi calculada: mudança de peso (MP) (peso habitual – peso atual) e o percentual de mudança de peso (%MP) (peso habitual/peso atual x 100%). A impedância bioelétrica (BIA) (Bioimpedância RJL SYSTEMS® - *Quantum V Segmental BIA4*) foi realizada de acordo com Kyle et al. (2004)²⁴, para avaliar Massa Corporal magra (MCM), Massa Gorda (FM) e Ângulo de Fase (PA). Os parâmetros de sarcopenia foram avaliados de acordo com os pontos de corte para determinar sarcopenia da EWGSOP2²⁵.

Avaliação da Qualidade de Vida

Para analisar a QV dos pacientes utilizou-se um questionário, o WHOQOL-BREF²² um questionário QV, que é composto por 26 questões, onde duas destas são sobre uma autoavaliação de vida e 24 questões representando as facetas de quatro domínios diferentes: (I) - Domínio físico (que aborda questionamentos sobre a dor e o desconforto, energia e fadiga, sono e repouso, mobilidade, atividades da vida cotidiana, dependência de medicação ou de tratamentos, capacidade de trabalho); (II) - Domínio psicológico (sentimentos positivos, pensar, aprender, memória e concentração, autoestima, imagem corporal e aparência, sentimentos negativos, espiritualidade/religião/crenças pessoais); (III) - Relações sociais (relações pessoais, suporte (apoio) social, atividade sexual); (IV) - Meio ambiente (segurança física e proteção, ambiente no lar, recursos financeiros, cuidados de saúde e sociais: disponibilidade e qualidade, oportunidades de adquirir novas informações e habilidades e oportunidades de recreação/lazer, ambiente físico: (poluição/ruído/trânsito/clima/transporte). As respostas seguem a escala de Likert (de 1 a 5, onde quanto maior a pontuação melhor a qualidade de vida)²².

Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados por meio de estatística descritiva, com a utilização de médias, desvio padrão e frequências relativas e absolutas. Todos os valores de p foram de dois lados e foi atribuída a significância quando $p \leq 0,05$. Foi realizado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para verificar a distribuição das variáveis numéricas. A comparação das variáveis numéricas foi realizada por meio de teste T-student para amostras independentes ou teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas com o auxílio do software IBM-SPSS® Statistics versão 22.0.

RESULTADOS

Foram avaliados 29 pacientes, com média de idade de 63,1 anos ($\pm 14,3$) sendo 69% do sexo masculino. Os tipos de câncer mais prevalentes foram: 24,1% (n=7) câncer de estômago, 17,2% (n=5) câncer de reto, 13,8% (n=4) câncer de pulmão e 10,3% (n=3) câncer de esôfago. Outros tipos de câncer totalizaram 34,6% (n=10).

De acordo com o IMC, 69% apresentavam eutrofia, sendo 12 homens e 8 mulheres e 13,4 % baixo peso sendo 3 homens e 1 mulher. Com relação ao percentual de perda de peso (% PP) nos últimos seis meses, observou-se um valor de 8% ($\pm 10,5$) entre os homens e 2,8% ($\pm 4,8$) entre as mulheres. Notou-se que os homens, embora sem diferença significativa ($p > 0,05$), apresentaram maior perda de peso quando comparado às mulheres (Tabela 1).

VARIÁVEIS	Grupo geral (n=29)	Homens (n=21)	Mulheres (n=8)	Valor de p
Sexo – % (n)*	100 (29)	69 (20)	31 (9)	0,475 ^a
Idade (anos)**	63,1 \pm 14,3	65,1 \pm 15,5	58,7 \pm 10,2	0,269 ^b
Peso Usual (kg)**	62,6 \pm 11,1	68,5 \pm 9,9	53,1 \pm 3,7	<0,001 ^c
Peso Atual (kg)**	62,0 \pm 14,5	66,7 \pm 14,8	51,3 \pm 5,3	<0,001 ^b
Estatuta (m)**	1,68 \pm 0,1	1,71 \pm 0,1	1,62 \pm 0,1	0,004 ^b
% Perda de peso (PP) **	5,9 \pm 8,9	8,0 \pm 10,5	2,8 \pm 4,8	0,204 ^b
IMC atual (kg/m ²)**	21,8 \pm 4,7	22,8 \pm 5,2	19,5 \pm 1,6	<0,015 ^b
Classificação IMC Atual – %(n)*				
Baixo peso	13,4 (4)	15 (3)	11,1 (1)	
Eutrofia	69 (20)	60 (12)	88,9 (8)	0,361 ^a
Sobrepeso	6,9 (2)	10 (2)	-	
Obesidade	10,3 (3)	15 (3)	-	

Tabela 1. Caracterização demográfica e antropométrica de pacientes avaliados no estudo, 2019

^aTeste Qui-quadrado de *Pearson*; ^bteste *T Student* para amostras independentes; ^cTeste *Mann-Whitney* - *Dados expressos em percentual e número amostral – % (n) - **Dados expressos em média e desvio padrão – X (DP)

Em relação à composição corporal, foi obtido o valor médio de 5,1 graus para o ângulo de fase, tanto no grupo geral, como no grupo de homens e mulheres. Embora sem diferença estatística significativa, houve maior prevalência de AF reduzido entre os homens. Foram encontrados valores semelhantes, tanto no grupo geral como no grupo de homens e mulheres, em relação à classificação da sarcopenia. (Tabela 2).

	Grupo geral (n=29)	Homens (n=21)	Mulheres (n=8)	Valor de p
AF (graus)**	5,1 ± 1,8	5,1 ± 2,1	5,1 ± 1,2	0,795 ^a
MME (kg)**	18,8 ± 6,6	20,0 ± 7,4	16,3 ± 3,5	0,109 ^a
IMME (kg/m2)**	6,61 ± 2,12	6,8 ± 2,4	6,1 ± 1,3	0,475 ^b
Classificação AF*				
Normal	13,8 (4)	10,0 (2)	22,2 (2)	0,377 ^c
Reduzido	86,2 (25)	90,0 (18)	77,8 (7)	
Classificação sarcopenia*				
Normal	55,2 (16)	55 (11)	55,6 (5)	0,978 ^c
Reduzido	44,8 (13)	45 (9)	44,4 (4)	

Tabela 2. Avaliação da composição corporal dos pacientes avaliados no estudo, 2019

Notas: MME = massa muscular esquelética; IMME = índice de massa muscular esquelética; AF = ângulo de fase

^aTeste Qui-quadrado de *Pearson*; ^bteste *T Student* para amostras independentes; ^cTeste *Mann-Whitney* - *Dados expressos em percentual e número amostral – % (n) - **Dados expressos em média e desvio padrão – X (DP)

A Figura 1 mostra a pontuação média das questões 1 e 2 do questionário de avaliação da QV, que dizem respeito à percepção da QV do próprio entrevistado e a satisfação com sua saúde. Embora sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), os homens apresentaram pontuação média mais baixa que as mulheres. No grupo geral, na variação de pontos de 1 a 5, a pontuação para a questão 1 foi de 3,1 ($\pm 0,1$) pontos, e para a questão 2 foi de 3,0 ($\pm 0,1$) pontos.

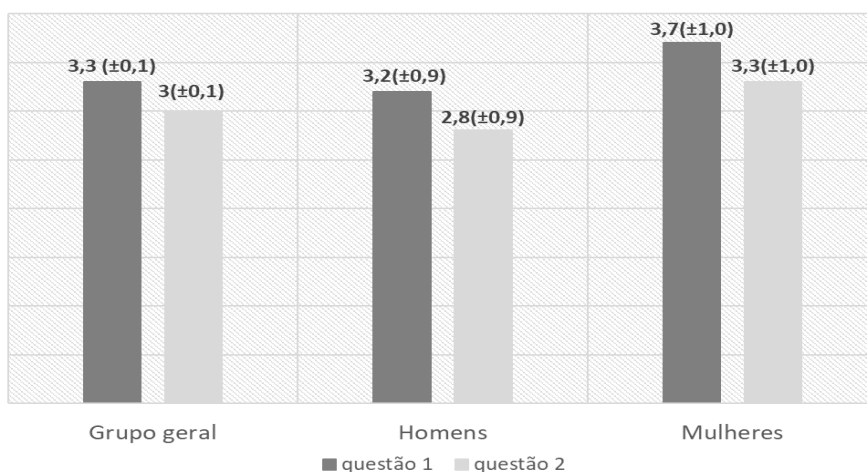


Figura 1. Avaliação das questões 1 e 2 do questionário de Qualidade de vida.

Notas: Valores expressos em média e desvio-padrão

Em relação aos domínios avaliados para a QV (tabela 3), tanto para o grupo geral, como para os grupos de homens e mulheres, foram encontrados baixos percentuais, indicativos da necessidade de melhorar todos os domínios avaliados. Apenas para o domínio ambiental foram encontrados percentuais acima de 50%. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os homens e as mulheres em relação à QV ($p > 0,05$).

Qualidade de vida	Grupo geral (n=29)	Homens (n=21)	Mulheres (n=8)	Valor de p
% domínio físico*	43,3±13,7	42,1±13,8	46,0 ±14,1	0,491**
% domínio psicológico*	51,1±15,7	49,8±15,2	54,2±17,2	0,497**
% domínio social*	48,3±20,7	47,1±21,7	50,9±19,3	0,652**
% domínio ambiental*	54,1±17,4	54,2±17,5	53,8 ± 18,3	0,956**

Tabela 3. Avaliação geral dos domínios da Qualidade de Vida dos pacientes do estudo

Notas: *Resultados expressos em média e desvio-padrão; **teste T Student

n = número amostral; % = percentual; p = valor estatístico do teste

DISCUSSÃO

O estudo traz como parâmetro principal avaliar a QV de pacientes oncológicos e analisar a composição corporal destes indivíduos em âmbito hospitalar e durante quimioterapia.

Em relação a amostra estudada, o fato de ter mais homens está relacionado ao tipo de coleta: amostragem de conveniência. A amostra estudada, por sua vez não apresenta relação distinta de maior prevalência de um câncer que afeta mais homens ou mulheres, é uma amostra heterogênea.

No parâmetro %PP quando comparado homens e mulheres nota-se que houve maior prevalência na perda de peso nos homens, isso porque as mulheres apresentam maior percentual de gordura corporal²⁶.

O IMC não deve ser utilizado como parâmetro isolado de estado nutricional, pois não traz resultados relevantes pois o IMC serve como uma triagem e deve ser utilizado em conjunto com outros parâmetros²⁷, como neste estudo, que foi utilizado o percentual de perda de peso, a sarcopenia e o parâmetro ângulo de fase realizado através bioimpedância.

A sarcopenia afeta o paciente oncológico pois é caracterizada pela tríade de massa muscular reduzida em associação com força muscular reduzida e / ou desempenho físico, parâmetros que já estão evidentes no paciente oncológico e se destacam ainda mais quando associado sarcopenia e câncer²⁸.

O ângulo de fase reduzido em pacientes oncológicos, como observado no presente estudo, se dá devido a integridade da membrana celular que está afetada isso fica bem

representado no ângulo de fase reduzido. Por isso a importância de se avaliar esse parâmetro no paciente oncológico²⁹.

No que diz respeito a análise de QV percebe-se que o domínio ambiental atingiu o maior percentual (54,1%). Pode-se justificar isso ao fato desse domínio não se relacionar diretamente ao câncer quando comparado ao domínio físico que está ligado a dor e/ou com a aceitação do paciente com relação ao seu corpo que enfrenta mudanças ocasionadas pelo câncer como por exemplo inapetência, insônia, astenia e perda de peso²¹. Um ponto relevante quando se trata de uma pesquisa realizada com pacientes oncológicos e que apresentam perda de peso significativa.

Um dado importante quando levando em consideração que muitos destes pacientes enfrentam a quimioterapia sozinhos ou por vezes sem o acompanhante presente, pontos que podem ser observados nos domínios psicológicos e social.

Com relação a questão um e dois que se referem QV e à percepção do paciente sobre a satisfação com a sua saúde, o resultado obtido em maior prevalência aponta a opção “regular”, isso demonstra que os pacientes não estão satisfeitos com a sua saúde.

O conceito de QV é multidimensional e busca relacionar saúde física de pacientes oncológicos, com aspectos sociais, culturais, ambientais e espirituais³⁰, sendo considerada com a percepção que o indivíduo acometido com a doença tem sobre o seu meio, e considera também a avaliação sobre suas expectativas pregressas e objetivos para o futuro.

Quando analisados os domínios nota-se que em todos os quatro houve uma resposta de baixa QV. Principalmente no que diz respeito ao físico e psicológico, domínios estes que estão claramente relacionados a QV do paciente. Com isso o estudo deixa claro a importância da avaliação do estado nutricional e também da QV. A análise conjunta destes dois itens pode contribuir para uma melhor resposta ao tratamento uma vez que, melhorando o domínio social, ambiental, físico e psicológico o paciente responderá de forma mais positiva estando apto para enfrentar o tratamento oncológico³¹.

O termo QV foi considerado importante no âmbito da saúde após os avanços tecnológicos que aumentaram a expectativa de vida dos doentes segundo. O ser humano passou a ser visto de maneira íntegra e que a QV faz parte da saúde deste indivíduo e deve então ser tratada de forma geral desconsiderando tratar apenas a enfermidade aparente e sim como um todo. Houve desde então uma necessidade em pensar na QV dos pacientes oncológicos, quando levado em conta que eles estão susceptíveis a condições que afetam a sua perspectiva de vida e que isso está diretamente ligado à resposta ao tratamento^{32, 30}.

As limitações do estudo foram a amostra pois se tratava de uma amostragem conveniência e também os protocolos da realização da bioimpedância que não foram seguidos a critério do exigido pois nas condições do ambiente hospitalar não foram possíveis. Embora o estudo tenha uma amostragem reduzida, traz dados relevantes sobre o estado nutricional dos pacientes avaliados.

CONCLUSÃO

O presente estudo analisou a composição corporal de pacientes oncológico e a QV. Apesar de a maioria apresentar eutrofia e com os valores de IMC adequados para idade concluiu-se que os valores de perda de peso recente foram significativos. Diante do exposto percebe-se a necessidade de novos estudos com amostragem diferente como por exemplo homogênea que possam contribuir com análises relacionadas com a QV e composição corporal de pacientes oncológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária de Apoio à Pesquisa do Estado do Paraná pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIS/FA).

REFERÊNCIAS

1. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(17105):1–18. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp2017105>
2. Abbott J, Teleni L, McKavanagh D, Watson J, McCarthy AL, Isenring E. Patient-Generated Subjective Global Assessment Short Form (PG-SGA SF) is a valid screening tool in chemotherapy outpatients. *Support Care Cancer* [Internet]. 2016;24(9):3883–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-016-3196-0>
3. Muscaritoli M, Lucia S, Farcomeni A, Lorusso V, Saracino V, Barone C, et al. Prevalence of malnutrition in patients at first medical oncology visit: the PreMiO study. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(45):79884–96. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/20168>
4. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Mar 8];12(5):489–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296615>
5. Antoun S, Baracos VE, Birdsell L, Escudier B, Sawyer MB. Low body mass index and sarcopenia associated with dose-limiting toxicity of sorafenib in patients with renal cell carcinoma. *Ann Oncol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2013 Apr 22];21(8):1594–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089558>
6. Martin L, Senesse P, Gioulbasanis I, Antoun S, Bozzetti F, Deans C, et al. Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):90–9.
7. Kazemi-Bajestani SMR, Mazurak VC, Baracos V. Computed tomography-defined muscle and fat wasting are associated with cancer clinical outcomes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2016;54:2–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.001>
8. Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis* [Internet]. 2016;5(2):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2016.3>
9. Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer

cachexia. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 May 23];10(2):90–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207794>

10. Arends J, Bachmann P, Baracos V, Barthelemy N, Bertz H, Bozzetti F, et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clin Nutr* [Internet]. 2017;36(1):11–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.07.015>

11. Sorensen JC, Petersen AC, Timpani CA, Campelj DG, Cook J, Trewin AJ, et al. BGP-15 protects against oxaliplatin-induced skeletal myopathy and mitochondrial reactive oxygen species production in mice. *Front Pharmacol*. 2017;8(APR):1–19.

12. Sirago G, Conte E, Fracasso F, Cormio A, Fehrentz JA, Martinez J, et al. Growth hormone secretagogues hexarelin and JMV2894 protect skeletal muscle from mitochondrial damages in a rat model of cisplatin-induced cachexia. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13504-y>

13. Sorensen JC, Cheregi BD, Timpani CA, Nurgali K, Hayes A, Rybalka E. Mitochondria: Inadvertent targets in chemotherapy-induced skeletal muscle toxicity and wasting? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(4):673–83.

14. Nissinen TA, Degerman J, Räsänen M, Poikonen AR, Koskinen S, Mervaala E, et al. Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32695>

15. Dieli-Conwright CM, Parmentier J-H, Sami N, Lee K, Spicer D, Mack WJ, et al. Adipose tissue inflammation in breast cancer survivors: effects of a 16-week combined aerobic and resistance exercise training intervention. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2018;Feb;168(1):147–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-017-4576-y>

16. Schiessel DL, Baracos VE. Barriers to cancer nutrition therapy: excess catabolism of muscle and adipose tissues induced by tumour products and chemotherapy. *Proc Nutr Soc*. 2018;(December 2017):1–9.

17. Cespedes Feliciano EM, Kroenke CH, Meyerhardt JA, Prado CM, Bradshaw PT, Kwan ML, et al. Association of Systemic Inflammation and Sarcopenia With Survival in Nonmetastatic Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017;94612(12):e172319. Available from: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2017.2319>

18. Martin L, Kubrak C. How much does reduced food intake contribute to cancer-associated weight loss? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2018;12(4):410–9.

19. Kubrak C, Martin L, Gramlich L, Scrimger R, Jha N, Debenham B, et al. Prevalence and prognostic significance of malnutrition in patients with cancers of the head and neck. *Clin Nutr* [Internet]. 2019;(https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.030). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.030>

20. Bampi LNSD, Guilhem D, Lima DD. Quality of live in people with traumatic spinal cord injury: A study with WHOQOL-bref. *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11(1):67–77.

21. Lopes AB, Guimarães IV, Melo IMV de, Teixeira LS, Silva SVV, Silva MH, et al. Factors modifying quality of life of oncological patients under chemotherapy. *Rev Médica Minas Gerais*. 2016;26(Supl 3):41–6.

22. Metelko Z, Szabo S, Diseases M, Kumar S, Delhi N, Heck V, et al. The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): Position paper from the World Health Organization. *Soc Sci Med*. 1995;41(10):1403–9.
23. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Heal Organ - Tech Rep Ser [Internet]. 2000;894:253. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=AvnqOsqv9doC&oi=fnd&pg=PA1&de=Obesity:+Preventing+and+managing+the+global+epidemic&ots=6UF0cjXY6M&sig=iA1h8eoKNhRTKdFqXqIVZaivyk4%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234459>
24. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* [Internet]. 2004 Oct [cited 2013 May 23];23(5):1226–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380917>
25. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(1):16–31.
26. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* [Internet]. 2009;6(SUPPL. 1):60–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.genm.2009.02.002>
27. Lucio A, Mjc B, Sa S, Mlj M, Bezerra MJC. Características Da Capacidade Funcional E Sua Relação Com O Imc Em Idosas Ingressantes Em Um Programa De Educação Física. *Rev Bras Ciência e Mov*. 2011;19(2):13–8.
28. Santos KT de O, Gomes FMA, Silva SME da, Silva ARA da, Pinho CPS. Sarcopenia en pacientes oncológicos en tratamiento Quimioterápico. *Rev Chil Nutr*. 2019;46(4):375–83.
29. Paiva SI, Borges LR, Halpern-Silveira D, Assunção MCF, Barros AJD, Gonzalez MC. Standardized phase angle from bioelectrical impedance analysis as prognostic factor for survival in patients with cancer. *Support Care Cancer*. 2011;19(2):187–92.
30. Fernandes WC, Kimura M. Qualidade de vida relacionada à saúde de mulheres com câncer de colo uterino. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2010;18(3):360–7.
31. Magalhães ES, De Oliveira AEM, Cunha NB. Atuação do nutricionista para melhora da qualidade de vida de pacientes oncológicos em cuidados paliativos. *Arq Ciências da Saúde*. 2018;25(3):4.
32. Miranda GMD, Mendes A da CG, Silva ALA da, Miranda GMD, Mendes A da CG, Silva ALA da. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. *Rev Bras Geriatr e Gerontol* [Internet]. 2016;19(3):507–19. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232016000300507&lng=en&tling=en.

CAPÍTULO 5

TESTE DO PEZINHO AMPLIADO NO SUS – EXAME PASSARÁ A RASTREAR MAIS DE 50 DOENÇAS RARAS

Data de aceite: 01/11/2021

Fernanda Borgmann Reppetto

Acadêmica de Farmácia na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4453810679448906>

Silvia Muller de Moura Sarmento

Biomédica, Patologista Clínica e Doutoranda pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/6978359527952267>

Rafael Tamborena Malheiros

Fisioterapeuta, Doutorando pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4079663494667647>

Pietra de Vargas Minuzzi

Fisioterapeuta, Mestranda pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1702990835273251>

Gênifer Erminda Schreiner

Licenciada em Ciências Biológicas, Mestranda no Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4063695224854057>

Guilherme de Freitas Teodósio

Fisioterapeuta, Especialista em Urgência e Emergência pela Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7419602287311171>

Laura Smolski dos Santos

Farmacêutica, Mestranda no Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7787259736067752>

Elizandra Gomes Schmitt

Farmacêutica - Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2792328420536809>

Gabriela Escalante Brites

Acadêmica de Farmácia na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8380109160433969>

Luana Tamires Maders

Acadêmica de Farmácia na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/2703636407254407>

Mariana Larré da Silveira

Farmacêutica, Mestranda no Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, RS, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5304952082077754>

Ilsou Dias da Silveira

Farmacêutico Bioquímico, Doutorado em Ciências da Saúde (PUCRS), Docente do Curso de Medicina da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana RS, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2671555186958226>

Vinícius Tejada Nunes

Enfermeiro, Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana RS, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3634669905909829>

Vanusa Manfredini

Farmacêutica Bioquímica, Doutorado em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), Docente do Curso de Farmácia e do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana RS, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/7062274179396656>

RESUMO: A triagem neonatal sanguínea é conhecida popularmente como teste do pezinho (TP) e é uma das medidas adotadas pela rede de saúde pública visando o diagnóstico de doenças congênitas e a redução da mortalidade infantil, o teste é obrigatório e gratuito em todo território brasileiro. Logo nos primeiros dias de vida, o teste atualmente identifica até 6 diferentes doenças genéticas, metabólicas e infecciosas. Com a necessidade de uma maior abrangência de doenças consideradas mais raras, o Ministério da Saúde através do congresso nacional aprovou uma lei de ampliação do teste na rede pública de saúde, auxiliando muitos pacientes no diagnóstico e encaminhando para um tratamento eficaz, reduzindo assim a taxa de mortalidade infantil e o possível desenvolvimento de sequelas. O presente trabalho objetiva a realização de uma revisão bibliográfica acerca da triagem neonatal na rede de saúde pública atual e a ampliada, mostrando a importância dos novos diagnósticos para a vida de muitos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Triagem Neonatal- Doenças Metabólicas - Triagem Neonatal no SUS

GUTHRIE TEST EXPANDED ON SUS - TESTE WILL SCREEN FOR MORE THAN 50 DISEASES RARE

ABSTRACT: Blood neonatal screening is popularly known as the heel prick test and is one of the measures adopted by the public health network aimed at diagnosing congenital diseases and reducing infant mortality, the test is mandatory and free throughout Brazil. In the very first days of life, the test currently identifies up to 6 different genetic, metabolic and infectious diseases. With the need for a greater coverage of rarer diseases, the Ministry of Health, through the national congress, approved a law to expand the test in the public health network, helping many patients in the diagnosis and referring them to effective treatment, thus reducing the rate infant mortality and the possible development of sequelae. The present work aims to carry out a literature review on neonatal screening in the current and expanded public health network, showing the importance of new diagnoses for the lives of many patients.

KEYWORDS: Neonatal Screening - Metabolic Diseases - Neonatal Screening in SUS.

TRIAGEM NEONATAL

O Ministério da Saúde (MS) integra normas para a triagem neonatal, contendo nessa triagem: triagem ocular, triagem auditiva, triagem das cardiopatias congênitas e triagem sanguínea.

A triagem ocular, conhecida popularmente como “teste do olhinho” é um reflexo de luz vermelha que incide diretamente sobre o olho do recém-nascido com objetivo de avaliar se existe algum obstáculo à chegada da luz até a retina do olho (AGUIAR; CARDOSO; LÚCIO, 2007).

A triagem neonatal auditiva tem como finalidade o diagnóstico através de um teste para detectar deficiência auditiva. Segundo dados de diferentes estudos epidemiológicos, a prevalência da deficiência auditiva varia de um a seis neonatos para cada mil nascidos vivos, e de um a quatro para cada cem recém-nascidos provenientes de Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). A deficiência auditiva (DA) é definida com base no nível de perda, medido em decibéis em diferentes frequências de 126 Hz (sons graves) a 8.000 Hz (sons agudos), podendo ser classificada como normal, discreta, leve, moderada, grave e profunda. No período neonatal, o principal tipo de PA é sensorio-neural e relacionado a danos nas células ciliadas da cóclea. (BRASIL, 2012).

Também conhecido como “teste do coraçõzinho”, a triagem das cardiopatias congênitas é um exame realizado ainda na maternidade, entre 24h a 48h após o nascimento. Consiste em medir a oxigenação do sangue e os batimentos cardíacos do recém-nascido com o auxílio de um oxímetro no pulso e no pé do bebê. Caso algum problema seja detectado, o bebê é encaminhado para realizar um ecocardiograma. Se o exame apresentar alguma alteração, é feito o encaminhamento para um centro de referência em cardiopatia para início do tratamento (CHIAMULERA, 2020).

A triagem neonatal sanguínea é conhecida popularmente como “teste do pezinho” e consiste em um exame de rastreamento de doenças realizado em recém-nascidos (NASCIMENTO, 2011, FORTES, 2012). Este exame é realizado através da retirada de sangue do calcanhar do bebê, pois esta área é considerada bastante vascularizada e de fácil coleta. Este estudo enfatizará a triagem sanguínea. O principal objetivo do exame é a identificação precoce de doenças metabólicas, antes mesmo da primeira manifestação de sintomas, conseguindo assim proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente.

No Brasil, na década de 70 a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de São Paulo, iniciou os primeiros diagnósticos para a fenilcetonúria, e em seguida, no ano de 1980, passou a diagnosticar mais outra doença que foi o hipotireoidismo congênito (BRASIL, 2002). Foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) em 1992, sendo obrigatório e gratuito a ser realizado em todos os recém-nascidos vivos.

Em 2001, foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pela portaria

GM/ MS nº 822 de 06 de junho de 2001 e tem como objetivo a ampliação de patologias (anemia falciforme, hemoglobinopatias e fibrose cística). A implantação do exame ocorreu de forma gradativa no país, seguindo as condições organizacionais de cada estado. Desde então, houveram quatro fases de incorporação de doenças até a versão atual do teste. Em 2014, todos os estados já estavam habilitados para a triagem das seis doenças previstas no programa pelo SUS (BRASIL, 2021).

DOENÇAS DETECTADAS ATUALMENTE COM O TESTE DO PEZINHO (TP)

Fenilcetonúria

É uma doença genética ocasionada por um erro metabólico, ocorre a deficiência da enzima hepática “fenilalanina hidroxilase”, que é responsável pela conversão da fenilalanina presente nas proteínas provenientes da alimentação em tirosina. A falta da tirosina acarreta uma insuficiente produção de neurotransmissores importantes como a noradrenalina e a dopamina. (SANTOS; HAACK, 2013) Através do teste do pezinho, é possível obter um diagnóstico precoce através da detecção de níveis elevados de fenilalanina sanguíneo em bebês. A recomendação é que o sangue seja coletado após 48h do seu nascimento para garantir que ele tenha ingerido quantidades de proteína suficientes para apontar alterações no exame, afim de evitar resultados falso-negativos. (BRASIL, 2002)

Hipotireoidismo Congênito

O hipotireoidismo congênito é um distúrbio endócrino que pode acarretar na criança vários graus de deficiências neurológicas, motoras e de crescimento, incluindo o retardo mental irreversível. É caracterizada pela deficiência na produção dos hormônios tireoidianos que são a tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). (NASCIMENTO, 2011, SETIAN, 2007). A deficiência desses hormônios pode levar a lesões irreversíveis no desenvolvimento do sistema nervoso, podendo ocasionar retardo mental grave. Se diagnosticado de forma precoce, o início do tratamento pode evitar sequelas na vida do bebê. O tratamento deve começar o mais rápido possível e consiste na administração de tiroxina via oral. (MACIEL et al., 2013).

Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são doenças de caráter hereditário, causadas por um gene alterado que determina modificações na hemoglobina. Entre os casos de hemoglobinopatias, existem dois grupos principais: as alterações estruturais, representadas pelas doenças falciformes e as alterações quantitativas, representadas pelas talassemias. A doença falciforme é a doença hereditária mais prevalente no Brasil (SILVA et al., 2016).

A doença falciforme pode apresentar manifestações clínicas agudas ou crônicas, podendo lesar progressivamente os tecidos e órgãos como pulmões, coração, ossos, rins, fígado, retina e pele. O objetivo da triagem para identificação de hemoglobinopatias

é a identificação prévia de crianças com doenças falciformes. A anemia falciforme é uma doença genética, hereditária de alta morbidade e mortalidade. É causada por uma mutação genética, onde no lugar da hemoglobina A, existe uma hemoglobina mutante denominada S.

Fibrose Cística

A fibrose cística é uma doença genética relacionada ao mal funcionamento do transporte de cloro e sódio nas membranas celulares. A alteração nesse transporte faz com que ocorra uma maior produção de muco espesso nos brônquios e nos pulmões, o que facilita a ocorrência de infecções frequentes. Também pode ocorrer o bloqueio dos ductos pancreáticos, causando problemas no sistema digestivo. A evolução da doença acarreta uma desnutrição severa, atraso no desenvolvimento e infecções pulmonares crônicas, e podem ainda evoluir para óbito. (BRASIL, 2016).

Hiperplasia Adrenal Congênita

A hiperplasia adrenal congênita é um conjunto de doenças de caráter genético, onde ocorre deficiência da enzima 21 – hidroxilase, relacionada com a biossíntese do hormônio cortisol. Como consequência desse distúrbio, ocorre a hipersecreção do hormônio adrenocorticotrófico, que leva à hiperplasia das glândulas supra-renais (BRASIL, 2015). O hormônio cortisol é de grande importância e essencial para a manutenção da vida, está relacionado com o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e ainda possui um eficiente efeito anti-inflamatório. Pode acarretar na excessiva perda de sal levando ao risco de vida para os recém-nascidos (BRASIL, 2016).

Deficiência da Biotinidase

A deficiência da biotinidase é um erro metabólico que causa um defeito na reciclagem da vitamina biotina, indispensável para a atividade de diversas enzimas. Se não for tratada precocemente, pode acarretar em alterações neurológicas como crises epiléticas de difícil controle, microcefalia, atraso no desenvolvimento e alterações cutâneas (ARANTES et al, 2016).

Ampliação do Teste do Pezinho no SUS

No mês de maio de 2021, foi sancionada a Lei nº 14.154, que amplia para mais de 50 o número de doenças rastreadas pelo Teste do Pezinho oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Esta ampliação altera o Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990), e aperfeiçoa o Programa Nacional de Triagem Neonatal (BRASIL, 2021). Atualmente, o teste ampliado só está disponível na rede particular. Avaliando financeiramente, a longo prazo, o custo do tratamento de pacientes com doenças raras sem diagnóstico precoce é maior para os cofres públicos do que o investimento necessário para adotar a triagem neonatal ampliada na rede pública. (CHIAMULERA, 2021). Portanto,

a partir da nova lei, será possível realizar o teste ampliado na rede pública de saúde, ajudando no diagnóstico e tratamento precoce para melhorar a qualidade de vida de muitos recém nascidos.

O exame ampliado vai identificar 14 grupos de doenças. A ampliação vai ocorrer de forma escalonada através de cinco etapas estabelecidas pelo Ministério da Saúde.

Primeira etapa

Nessa primeira etapa da implementação do teste, o exame continuará detectando as seis doenças realizadas no teste atual, tendo como adicional o diagnóstico da toxoplasmose congênita.

A toxoplasmose congênita é uma infecção considerada protozoose, causada pelo protozoário toxoplasma, a transmissão de forma congênita pode ocorrer quando a mulher adquire a infecção durante o período gestacional. Essa doença pode passar despercebida no nascimento, porém pode se manifestar meses ou até anos depois. Os recém-nascidos infectados por essa doença podem apresentar problemas na visão e audição, dificuldades mentais e na movimentação, dependendo do período gestacional que a mãe foi contaminada. Atualmente, os pacientes são diagnosticados no SUS por meio de exames que identificam os anticorpos IgM, o método de ISAGA-IgM é considerado o método de escolha para detectar o Toxoplasma IgM em lactentes com menos de 6 meses de idade (CONITEC, 2020). No soro do recém-nascido a presença de níveis elevados de anticorpos igG que aumentam ou permanecem positivos em até 18 meses é indicativo de toxoplasmose congênita, os níveis que decrescem e se tornam negativos representam os anticorpos maternos transmitidos de forma passiva (SPALDING SM, et al. 2003).

SEGUNDA ETAPA

Serão acrescentados na segunda etapa, os testes para galactosemias, aminoacidopatias, distúrbios do ciclo da ureia e distúrbios da beta oxidação dos ácidos graxos.

a) Galactosemia

É uma doença metabólica, do grupo de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), caracterizada pela deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT), enzima responsável pela metabolização da galactose, açúcar presente no leite e derivados. Trata-se de uma doença hereditária com herança autossômica recessiva causada por mutações no gene GALT. No período neonatal, após a ingestão de galactose, os pacientes podem apresentar sintomas como dificuldades alimentares, vômitos, diarreia, perda de peso, icterícia, anemia hemolítica, edema cerebral, catarata, hepatomegalia e ascite. Nos casos em que a doença é detectada, o tratamento é feito com a restrição de alimentos que contenham lactose ou galactose (SBTEIM, 2021).

b) Distúrbio do ciclo da ureia

O ciclo da ureia é o responsável pelo conjunto de reações enzimáticas que convertem a amônia liberada durante o catabolismo das proteínas em ureia. A ureia liberada é uma substância nitrogenada que é excretada na urina. Os distúrbios no ciclo da ureia (DCU) ocasionam uma hiperamonemia (acumulo de amônia no sangue), esta condição é altamente neurotóxica aos seres humanos (DLE, 2010).

As principais enzimas envolvidas no ciclo da ureia são cinco: carbamil-fosfato sintetase (CPS), ornitina-transcarbamilase (OTC), arginino-succinato sintetase (AS), arginino-succinato liase (AL) e arginase (DLE, 2010).

O DCU é uma patologia rara em recém-nascidos, mas os que possuem são herdados como traços autossômicos recessivos, em exceção quando há deficiência da ornitina-transcarbamilase (OTC), que é herdada como traço ligado ao X. A família do paciente diagnosticado com DCU deve receber aconselhamento genético, porque a detecção do portador e o diagnóstico pré-natal estão disponíveis para a maioria dos distúrbios causados por essa doença (DLE, 2010).

Na maioria dos casos, os primeiros sintomas aparecem nos primeiros dias de vida do bebê, através de uma deterioração neurológica rapidamente progressiva. Com o aumento dos níveis de amônia sanguínea, os pacientes desenvolvem recusa alimentar, anorexia, alterações comportamentais, vômitos, letargia, convulsões, edema cerebral e colapso circulatório. Algumas formas menos graves da doença podem se desenvolver mais tardiamente, já na idade adulta, com sintomas intermitentes de hiperamonemia, transtornos de comportamento ou disfunções neurológicas (DLE, 2010).

O exame diagnóstico é realizado através da coleta de amostras para avaliação do perfil de aminoácidos quantitativo do plasma, análise de ácidos orgânicos urinários e dosagem do ácido orótico na urina (DEMCZKO, 2020).

O padrão das alterações pode determinar um distúrbio específico, por exemplo, níveis elevados de ornitina indicam deficiências CPS ou OTC, enquanto citrulina elevada é indicativo de citrulinemia. Para diferenciar a deficiência da CPS e da OTC, são realizadas as medições do ácido orótico, pois na deficiência OTC um acumulo de fosfato carbamóil pode resultar em uma via alternativa para o ácido orótico. Alguns dos distúrbios também podem ser confirmados por estudos genéticos moleculares (DEMCZKO, 2020).

O tratamento das DCU é realizado através de uma modificação alimentar, uma dieta pobre em proteínas, mas que forneça uma quantidade suficiente de aminoácidos para o desenvolvimento do metabolismo. Dependendo do distúrbio, também é necessário utilizar a suplementação de arginina ou citrulina (DEMCZKO, 2020).

c) Distúrbios da oxidação dos ácidos graxos

Os distúrbios da oxidação dos ácidos graxos (DOAG) são caracterizados por uma

deficiência genética metabólica, na qual ocorre a deficiência da enzima responsável pela oxidação dos ácidos graxos para produção de energia. A glicose é a principal fonte de energia para o organismo, porém quando a glicose se esgota, as reservas de ácidos graxos são oxidadas para produzir energia. Pessoas afetadas com DOAG não conseguem realizar esse processo (DLE, 2010).

A via metabólica dos ácidos graxos é a principal fonte de energia para alguns tecidos, enquanto o fígado utiliza em períodos de jejum. O cérebro, embora não oxide os ácidos graxos, utiliza os corpos cetônicos, derivados da acetil-CoA e da acetoacetil-CoA produzidas pela beta-oxidação hepática dos ácidos graxos. O diagnóstico laboratorial quase sempre inclui perfil de acilcarnitinas quantitativo do plasma, análise de ácidos orgânicos urinários, dosagens de carnitina total e livre e ensaios enzimáticos em fibroblastos. O perfil de acilcarnitinas quantitativo do plasma ou sangue total em papel-filtro é a forma mais direta de diagnóstico da maioria dos DOAG. O tratamento consiste em diferentes abordagens com mudanças e controle na alimentação e uso de suplementes, sendo a recomendação mais importante evitar o jejum de 4-6 horas, pois um período de jejum associado a uma enfermidade infecciosa pode desencadear uma crise metabólica, levando o paciente a hipoglicemia e letargia, sendo necessária a hospitalização (DLE, 2010).

TERCEIRA ETAPA

Nessa etapa serão acrescentados os testes para doenças lisossômicas, que afetam o funcionamento celular.

As doenças lisossômicas representam um grupo de doenças raras em que ocorre uma deficiência enzimática ocasionando um acúmulo progressivo de substâncias não metabolizadas no interior do lisossomo (DLE, 2010). Poder contar com a triagem de algumas doenças lisossômicas no Teste do Pezinho é um ganho significativo na qualidade de vida futura dos recém-nascidos.

Algumas doenças lisossômicas são investigadas na triagem neonatal, como:

a) Doença de Gaucher

A doença de Gaucher é causada por uma mutação no gene GBA, causando deficiência da enzima beta-glicosidase, que é responsável por metabolizar glicocerebrosídeo. No caso de pacientes acometidos por essa doença, a enzima tem uma atividade deficiente e essa substância não metabolizada no lisossomo e se acumula de forma progressiva nos macrófagos. Estes macrófagos aumentam de tamanho, cheios de glicocerebrosídeo não digerido e passam a ser chamados de «células de Gaucher».

Estas células se depositam principalmente no fígado e no baço, causando um aumento de tamanho nesses órgãos. Estas células também estão presentes na medula óssea, ocasionando enfraquecimento dos ossos. Os principais sintomas são decorrentes

da infiltração de células de Gaucher em diferentes órgãos, ocasionando problemas hematológicos como anemia, plaquetopenia, problema visceral causando hepatomegalia, esplenomegalia ou problemas esqueléticos causando dor óssea e osteopenia. O diagnóstico é realizado através de exame de ensaio enzimático da beta-glicocerebrosidade. O tratamento consiste na terapia de reposição enzimática (TRE) (FIOCRUZ, 2019).

b) Doença de Pompe

A doença de Pompe, também é conhecida como glicogenose tipo II ou deficiência de maltase ácida, é uma doença genética rara que causa problemas neuromusculares progressivos e nas formas mais graves pode ser fatal. É causada por variações no gene GAA, causando deficiência na atividade da alfa glicosidase ácida, enzima lisossômica responsável pela liberação da glicose a partir do glicogênio. Essa deficiência leva a um acúmulo de glicogênio no interior dos lisossomos e do citoplasma de diferentes tecidos, incluindo a musculatura lisa, esquelética e cardíaca. O acúmulo dessa substância gera mau funcionamento celular e causando hipertrofia e ruptura dos lisossomos. A doença pode aparecer já nos primeiros meses de vida do recém-nascido com sintomas de fraqueza muscular generalizada e cardiomegalia. Na ausência de tratamento, a taxa de mortalidade é alta aos 12 meses de vida (BRASIL, 2020).

c) Doença de Fabry

A Doença de Fabry (DF) é pertencente ao grupo de EIM com padrão de herança ligado ao cromossomo X, causando mutações no gene da enzima lisossômica alfa-galactosidase A (α -GAL). Essa alteração na enzima ocasiona na incapacidade total ou parcial de catabolizar lipídeos com resíduos de alfa-galactosil, que acabam por acumular-se de maneira progressiva nos lisossomos no endotélio, podócitos, células epiteliais, sistema nervoso autônomo, o que pode desencadear complicações renais, cardíacas e cerebrovasculares. Os sintomas podem se desenvolver anos após o nascimento, na infância, e se manifestam através de acroparestesias (dores nas articulações), principalmente nas mãos e pés. “Crises de Fabry” são definidas como crises dolorosas de forte intensidade, que afetam inicialmente as extremidades, com duração de minutos a semanas, também podem apresentar sintomas gastrointestinais como vômitos, diarreia e dor abdominal após a alimentação, o conjunto desses sintomas podem atrapalhar o desenvolvimento e crescimento das crianças. O diagnóstico da doença é realizado através da pesquisa da atividade da enzima alfa-GAL, medida no plasma e o tratamento específico para a DF é feito através da TER. (SILVA, 2017).

d) Mucopolissacaridose do tipo I (MPS1)

A mucopolissacaridose do tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica progressiva, de herança autossômica recessiva, causada pela atividade deficiente da alfa-L-iduronidase

(IDUA), que resulta no acúmulo progressivo de glicosaminoglicanos (GAGs) no interior dos lisossomos e aumento da sua excreção na urina. Em consequência, os pacientes apresentam comprometimento dos sistemas respiratório, nervoso, musculoesquelético, gastrointestinal (fígado e baço) e cardiovascular, entre outros. O exame recomendado para investigação da doença é o ensaio enzimático da alfa-L-iduronidase (DLE, 2010).

Esta doença está associada a três formas clássicas, que se diferenciam na presença de comprometimento neurológico, na velocidade de progressão da doença e na gravidade do acometimento dos órgãos. (BRASIL, 2018)

- Forma atenuada (Síndrome de Scheie): na forma mais leve da doença, os sintomas iniciam-se entre os 5 e 15 anos de idade e se desenvolvem de forma lenta. O curso clínico é dominado por problemas ortopédicos, e a altura final é normal ou quase normal, assim como o tempo de vida, o qual, entretanto, pode se ser reduzido pela doença cardíaca (BRASIL, 2018).

- Forma intermediária ou moderada (Síndrome de Hurler-Scheie): a forma intermediária da doença costuma apresentar sintomas entre os 3 e 8 anos de idade. Apresenta baixa estatura final, a capacidade mental pode ser normal e a sobrevivência até a idade adulta é comum (BRASIL, 2018).

- Forma grave (Síndrome de Hurler): na forma mais grave, os pacientes são diagnosticados até os 2 anos de idade, podem apresentar atraso no desenvolvimento cognitivo aparente entre os 14 e 24 meses e estatura inferior a 110cm. No desenvolvimento da doença, a criança é acometida por diversos problemas respiratórios e desenvolvimento de características faciais, hepatoesplenomegalia, valvulopatia, opacificação de córnea, hidrocefalia e manifestações musculoesqueléticas, como rigidez, contraturas e disostose múltipla. O óbito ocorre geralmente durante a primeira década de vida por insuficiência cardíaca ou respiratória (BRASIL, 2018).

QUARTA ETAPA

Na quarta etapa do processo, serão acrescentadas as imunodeficiências primárias (IDPs) são doenças causadas por uma deficiência em algum setor do sistema imunológico ocasionando na baixa capacidade de defesa do organismo. Os sintomas surgem por meio de infecções comuns como otites, pneumonia, sinusites, entre outras. A prevalência da doença varia muito de acordo com os diferentes tipos da doença. A suspeita para diagnóstico das IDPs sempre ocorre quando há processos infecciosos graves, de difícil tratamento e/ou muito frequentes. Nas crianças pequenas os sinais de alerta podem ser febres, sinais de inflamação sem infecções ou doenças autoimunes. (ASBAI, 2017).

QUINTA ETAPA

A quinta etapa será realizada com a adição dos diagnósticos de AME nos recém-

nascidos.

A Atrofia Muscular Espinhal (AME) é uma doença de origem genética de herança autossômica recessiva, e é a maior causa genética de mortalidade infantil. Os neurônios motores são as células capazes de controlar as atividades essenciais como andar, falar, engolir e respirar. Eles fazem a ligação da medula espinhal aos músculos do corpo. Esses neurônios precisam da proteína SMN para sua manutenção, sem a quantidade adequada da proteína, os neurônios morrem, pois não são capazes de se regenerar (INAME, 2019).

O principal responsável pela produção da proteína SMN no organismo é um gene denominado SMN1, os indivíduos portadores de AME possuem ausência ou deficiência desse gene e assim não conseguem produzir adequadamente a proteína SMN, ocasionando a morte dos neurônios motores (INAME, 2019).

A AME é classificada em 5 tipos, de acordo com a idade em que os sintomas se desenvolvem e a sua gravidade. Nas formas mais graves da doença, os problemas motores e respiratórios já se desenvolvem nos primeiros meses de vida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A triagem neonatal é uma etapa muito importante no início da vida de todos os recém-nascidos, através dela é possível diagnosticar diferentes doenças que podem posteriormente dificultar o desenvolvimento do bebê e que se não forem tratadas, podem causar desde sequelas até a morte.

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) ainda é considerado relativamente recente, pois sua implementação ocorreu no ano de 2001, atualmente o teste é capaz de diagnosticar apenas seis doenças, o que é considerado um número muito pequeno quando comparado a triagem de outros países. A partir da ampliação do teste será possível auxiliar muitas famílias no diagnóstico precoce e direto, evitando gastos para realização de outros exames diagnósticos afim de descobrir a doença do bebê.

Então, este estudo teve como objetivo analisar as pesquisas publicadas na literatura nacional sobre as doenças diagnosticadas na triagem neonatal sanguínea e sobre os diagnósticos das doenças implementadas no novo teste do pezinho ampliado no SUS.

A ampliação dos exames vai ocorrer de forma lenta através da implementação de cinco etapas, mas será um grande impacto para a rede de saúde pública, necessitando também trabalhar na melhor capacitação dos profissionais e das famílias.

Alguns bebês portadores dessas doenças podem apresentar aspecto saudável no nascimento, porém os sintomas podem surgir tardiamente afetando a vida do paciente. Portanto, os testes de triagem neonatal favorecem a detecção precoce de diversas doenças e assim possibilitam um encaminhamento específico para início precoce do tratamento, aumentando as chances de sobrevivência, redução do risco de sequelas e auxiliando no desenvolvimento do bebê.

Ainda é necessário conscientizar melhor a população acerca da importância da realização do Teste do Pezinho, a falta de conhecimento de muitos pais ainda é uma barreira que impede esse direito ao recém-nascido, causando riscos a sua saúde pela falta de diagnóstico assertivo.

BIBLIOGRAFIAS

AGUIAR, Adriana Sousa Carvalho de; CARDOSO, Maria Vera Lúcia Moreira Leitão; LÚCIO, Ingrid Martins Leite. Teste do reflexo vermelho: forma de prevenção à cegueira na infância. *Rev Bras Enferm*, Brasília, DF, v. 60, n. 5, p.541-545, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/reben/v60n5/v60n5a11>.

AMORIM, Tatiana et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant. Recife*, v. 5, n. 4, out/dez, p.457-462, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbsmi/v5n4/27764.pdf>.

ARANTES, R. R. et al. Deficiência de biotinidase: da Triagem Neonatal à confirmação diagnóstica e ao tratamento. *Rev Med Minas Gerais, Belo Horizonte*, v. 26, n. 6, p. 48-51, jan./jan. 2016. Disponível em: www.rmmg.org/exportarpdf/1988/v26s6a08.pdf.

ASBAI, Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. Imunodeficiências no Teste do Pezinho é prioritário para diagnóstico e tratamento adequados. 2017. Disponível em: <https://asbai.org.br/immunodeficiencias-no-teste-do-pezinho-e-prioritario-para-diagnostico-e-tratamento-adequados/>.

BRASIL, Conitec. Ampliação do uso do teste do pezinho para a detecção da toxoplasmose congênita. nº 185, mar. 2020. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Sociedade/ReSoc185_teste_pezinho_toxoplasmose.pdf.

BRASIL, Governo do. Teste do Pezinho será ampliado e detectará até 50 novas doenças: atualmente, teste abrange seis doenças. Atualmente, teste abrange seis doenças. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2021/05/teste-do-pezinho-sera-ampliado-e-detectara-ate-50-novas-doencas>.

BRASIL, Lei nº 14.154, DE 26 DE MAIO DE 2021. Altera a Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente), para aperfeiçoar o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), por meio do estabelecimento de rol mínimo de doenças a serem rastreadas pelo teste do pezinho; e dá outras Providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 27 de maio, 2021. Seção 1. pt. 1. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/lei-n-14.154-de-26-de-maio-de-2021-322209993>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Pompe. PORTARIA CONJUNTA Nº 12, DE 03 DE AGOSTO DE 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2020/portaria-conjunta-pcdt-doena-de-pompe10-08-2020.pdf>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Mucopolissacaridose do tipo I. 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/MUCOPOLISSACARIDOSE-TIPO-I.pdf>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília, DF, 2002. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/triagem_neonatal.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Triagem neonatal: hiperplasia adrenal congênita. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_hiperplasia_adrenal_congenita.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Triagem neonatal biológica: manual técnico/ Ministério da Saúde, Secretária de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_biologica_manual_tecnico.pdf.

CHIAMULERA, C. Ampliação da Triagem Neonatal e Judicialização. 2021. Disponível em: http://www.fepe.org.br/site/wpcontent/files/23_Ampliao_da_Triagem_Neonatal_e_Judicializacao_-_Dra._Caroline_Chiamulera.pdf.

DEMCKO, Matt, et al. Disfunções do ciclo da ureia - Pediatria - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/pediatria/disfuncoes-metabolicas-hereditarias/disfuncoes-do-ciclo-da-ureia>.

DLE, Genética humana e Doenças raras. Distúrbios da Oxidação dos Ácidos Graxos. 2010. Disponível em: <https://dle.com.br/artigos-e-links-relacionados/disturbios-da-oxidacao-dos-acidos-graxos>.

DLE, Genética humana e Doenças raras. Distúrbios do Ciclo da Uréia. 2010. Disponível em: <https://dle.com.br/artigos-relacionados/disturbios-docicloaureia>.

GARANITO, Marlene Pereira. Hemoglobinopatias – Interpretação do teste de triagem neonatal. Rev. Pediatra, São Paulo, p. 172-176, 2008. Disponível em: <http://pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/1280.pdf>.

GENÉTICA HUMANA E DOENÇAS RARAS (DLE). Distúrbios da Beta-Oxidação Ácidos Graxos. 2010. Disponível em: <https://dle.com.br/links-relacionados/disturbios-da-beta-oxidacao-dos-acidos-graxos>.

INAME, Instituto Nacional de Atrofia Muscular Espinhal. Tipos de AME e Sintomas. 2019. Disponível em: <https://iname.org.br/tipos-de-ame/>.

MACIEL, Léa Maria Zanini et al. Hipotireoidismo congênito: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v.57, n.3, p. 184-192, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-2730_2013000300004&lng=en&nrm=isso.

NASCIMENTO, Marilza Leal. Situação atual da triagem neonatal para hipotireoidismo congênito: críticas e perspectivas. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 55, n.8, p. 528-533, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v55n8/05.pdf>.

NASCIMENTO, Marilza Leal. Situação atual da triagem neonatal para hipotireoidismo congênito: críticas e perspectivas. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 55, n.8, p. 528-533, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v55n8/05.pdf>.

ROSA, Ruy Roberto Porto Ascenso. Fenilcetonúria: uma revisão de literatura. Revista Eletrônica de Farmácia, Teresina, v. 11, n. 4, p. 27-47, nov. 2014. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/viewFile/31258/18133>.

SANTOS, Mikaelly; HAACK, Adriana. Fenilcetonúria: diagnóstico e tratamento: Phenylketonuria: diagnostic and treatment. Revista ESCS, [S. l.], ano 2012, v. 23, n. 4, p. 263-270, 6 jun. 2013. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/artigos/fenilcetonuria_diagnostico_tratamento.pdf.

SBTEIM, Sociedade Brasileira Triagem Neonatal Erros Inatos do Metabolismo. Doenças e tratamentos - triagem neonatal. 2021. Disponível em: <https://www.sbteim.org.br/conteudo.aspx?id=8>.

SILVA, Cassiano Augusto Braga. DOENÇA DE FABRY. Revista Med. UFPR, ano 2017, v. 4, n. 1, p. 23-30, jan-mar 2017. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/revmedicaufpr/article/download/52249/pdf>.

SPALDING, SM, et al. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. Rev.Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba .2003; 36(4):483- 491. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000400009&lng=en&nrm=iso>.

IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ASSISTÊNCIA AO PACIENTE CRÔNICO DE ALTA DEPENDÊNCIA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 19/09/2021

Maria Helane Rocha Batista Gonçalves

Universidade Estadual do Ceará – UECE
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/1374972923091474>

Christian Raphael Fernandes Almeida

Universidade Estadual do Ceará – UECE
Fortaleza – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5716368923491985>

Jonisvaldo Pereira Albuquerque

Hospital Regional do Sertão Central
Quixeramobim, Ceará- HRSC
<http://lattes.cnpq.br/8421015577788904>

Kelly Barros Marques

Mestranda em Tecnologia e Inovação em
Enfermagem na Universidade de Fortaleza-
UNIFOR
Fortaleza - CE
<http://lattes.cnpq.br/1748152409947636>

Cinara Franco de Sá Nascimento Abreu

Coordenadora do Serviço de Cuidados
Paliativos do Hospital Universitário Walter
Cantídio - HUWC/EBERSH
Fortaleza- Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5449273156668787>

Fernanda Colares de Borba Netto

Professora do curso de Medicina da
Universidade de Fortaleza- UNIFOR
Fortaleza - CE
<https://orcid.org/0000-0002-2621-1135>

RESUMO: INTRODUÇÃO: A longa permanência de pacientes no hospital requer planejamento do cuidado; grande parte desses pacientes são portadores de comorbidades ameaçadoras à vida, com parcial ou total dependência de cuidados. Torna-se um desafio mensurar a efetividade da assistência. **OBJETIVO:** Relatar a experiência de construção e implantação de um indicador de resultado da assistência a pacientes crônicos de alta dependência. **MÉTODO:** Relato de experiência no período de julho/2016 a dezembro/2017. Elaborou-se uma ficha técnica para mensuração da efetividade dos protocolos assistenciais de reabilitação e prevenção, bem como do indicador de resultado “Saída Conforme”.

RESULTADOS: Foram 263 desfechos. Destes, apenas 30 (12%) foram “saídas não conforme”: 17 incidências de lesão por pressão, 10 piora de lesão prévia, 02 Broncoaspiração e 01 falha no protocolo de reabilitação. **CONCLUSÃO:** A utilização de indicadores auxiliou o gestor a considerar as práticas assistenciais, educacionais e gerenciais, bem como os recursos humanos, materiais, financeiros e estruturais disponíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Linha de Cuidado; Redes de Assistência à Saúde; Gestão em Saúde.

IMPLEMENTATION OF THE METHOD OF EVALUATION OF THE ASSISTANCE TO THE HIGH DEPENDENCY CHRONIC PATIENT

ABSTRACT: INTRODUCTION: The long stay of patients in the hospital requires care planning; most of these patients are carriers of life-threatening comorbidities, with partial or total dependence on care. It is a challenge to

measure the effectiveness of care. **OBJECTIVE:** To report on the experience of building and implanting an outcome indicator of care for chronic high dependency patients. **METHOD:** Experience report from July / 2016 to December / 2017. A technical file was prepared to measure the effectiveness of the rehabilitation and prevention assistance protocols, as well as the “Conformal Outcome” indicator. **RESULTS:** There were 263 outcomes. Of these, only 30 (12%) were “out of compliance”: 17 incidences of pressure injury, 10 worsening of previous injury, 02 Bronchoaspiration and 1 failure in the rehabilitation protocol. **CONCLUSION:** The use of indicators helped the manager to consider the assistance, educational and managerial practices, as well as the available human, material, financial and structural resources. **KEY WORDS:** Line of Care; Health Care Networks; Health Management.

1 | INTRODUÇÃO

A mudança do perfil epidemiológico provocado pelo envelhecimento da população, alta prevalência de doenças e a predominância de condições crônicas de saúde constitui um desafio para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Destaca-se que essa mudança no perfil populacional, não vem acontecendo de forma igualitária entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento (FÁBIO, 2009). Para Leite et al.(2006) a grande diferença está no fato que nos países desenvolvidos esse processo ocorreu concomitante a melhoria das condições gerais de vida e com um preparo do sistema de saúde, bem como dos profissionais. Já nos países em desenvolvimento, o processo de envelhecer está centrado apenas no aperfeiçoamento das tecnologias médicas, sem, contudo, levar em conta a adequação da sociedade e dos serviços de saúde às peculiaridades dessa fase da vida.

As projeções indicavam que no ano de 2020 existiriam cerca de 34 milhões de novos idosos no Brasil (LEITE et al., 2006). Sendo esses, o correspondente à sexta população mais velha do planeta, ficando atrás apenas de alguns países europeus, do Japão e da América do Norte (MORO, 2009).

O aumento da expectativa de vida é uma das maiores conquistas na área da saúde, do ponto de vista biotecnológico, pois resultou na melhoria das condições socioeconômicas das populações, desde o aperfeiçoamento de imunização, saneamento básico, fármacos e até a aparelhagem hospitalar que possibilitaram que doenças, que antes eram fatais fossem controladas e se tornassem crônicas, além de proporcionar o entendimento de suas etiologias e principalmente, as melhorias no seu tratamento (SOUZA et al., 2018).

As doenças crônico-degenerativas muitas vezes têm evolução lenta e são acompanhadas de muito sofrimento para o paciente e para a família. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) na década de 2000, mostraram que no mundo morrem cerca de 59 milhões de pessoas por ano e que 90% delas sofrem de doenças crônicas. Essas pessoas estão vivendo e morrendo sozinhas, cheias de medos e incertezas, com suas dores não tratadas, com sintomas físicos, psicossociais e espirituais não atendidos de maneira correta (MANSO; GÓES e CONCONE, 2019).

Visando minimizar tal fragilidade, as instituições de saúde devem buscar cada vez mais ferramentas que sistematizam o cuidado de forma singular. O plano terapêutico, por sua vez, consiste num plano de cuidado de cada paciente, resultado do trabalho da equipe multiprofissional, com o objetivo de avaliar ou reavaliar diagnósticos e riscos, redefinindo as linhas de intervenções terapêuticas dos profissionais envolvidos no cuidado (BRASIL, 2013).

O projeto terapêutico é elaborado uma vez que a equipe fez os diagnósticos, são propostas de curto, médio e longo prazo (definição de metas) e estabelecem as tarefas de cada membro da equipe com clareza (divisão de responsabilidades), com realização de momentos específicos para reavaliação, em que será discutida a evolução dos pacientes e se farão as devidas correções de rumo. Projetos terapêuticos são, pois, resultantes de acordos possíveis e necessários entre ofertas e demandas, tomados tanto como as experiências da vida prática dos usuários como dos saberes e experiência clínica dos trabalhadores e equipes de saúde (BRASIL, 2009).

Com o objetivo de melhorar a qualidade assistencial dos serviços, nas últimas décadas, tiveram força os Programas de Acreditação Hospitalar, que consistem em um sistema de avaliação externa que verifica a concordância da estrutura e dos processos assistenciais adotados com o conjunto de padrões previamente estabelecidos. No Brasil, a Organização Nacional de Acreditação (ONA) oferece o Manual Brasileiro de Acreditação Hospitalar, instrumento que serve de guia às instituições para que estabeleçam padrões de atendimento com alta qualidade (SOUZA e GEORGES, 2020).

As linhas de cuidado correspondem à estratégia de organização da atenção que viabiliza a integralidade da assistência, por meio de um conjunto de saberes, tecnologias e recursos necessários ao enfrentamento de riscos, agravos ou demais condições específicas do ciclo de vida ou outro critério sanitário a serem ofertados de forma oportuna, articulada e contínua, abrangendo os campos da promoção, prevenção, tratamento e reabilitação (BRASIL, 2013).

O paciente de longa permanência em internações hospitalares é, habitualmente, idoso, possuidor de comorbidades ameaçadoras à vida, com parcial ou total dependência para cuidados básicos, tornando-se um desafio mensurar a efetividade do plano terapêutico. A permanência prolongada desse perfil de paciente requer um planejamento cada vez mais individualizado do cuidado prestado pela equipe multiprofissional assistencial, justificado pela dependência do paciente e da família em relação a toda a estrutura estabelecida para o tratamento.

Os avanços tecnológicos nos cuidados intensivos têm permitido a sobrevivência de mais pacientes às condições críticas agudas. Entretanto, muitos destes pacientes que sobrevivem o fazem às custas de muitas disfunções orgânicas e dependência de cuidados intensivos por período prolongado, principalmente da ventilação mecânica (VM), conhecida atualmente como doença crítica crônica (BONFADA et al., 2017).

Acompanhar e tratar estes pacientes torna-se um grande desafio para os

profissionais de saúde que em sua maioria não tiveram formação para tratar e conviver com a terminalidade, ao contrário, sempre foram treinados para curar, e a morte de um paciente muitas vezes representa o fracasso de sua atuação profissional (BURLÁ et al., 2011).

Diante deste contexto os Cuidados Paliativos tornam-se cada vez mais necessários uma vez que tratam o paciente e não a doença, com a finalidade de promover a qualidade de vida, de prevenir e aliviar sofrimento de indivíduos e de seus familiares quando estão diante de doenças ameaçadoras da vida. O uso correto dos fármacos e a intervenção da equipe multiprofissional de forma interdisciplinar são determinantes na qualidade dos cuidados no fim da vida. Torna-se essencial a todos os profissionais que lidam com a área da saúde o conhecimento da finitude humana, todavia a morte fará parte do cotidiano da maioria deles (QUEIROZ et al., 2018).

Segundo a Aliança Mundial de Cuidados Paliativos sobre a qualidade de morte no mundo, mais de 100 milhões de pessoas se beneficiam anualmente de cuidados paliativos, incluindo família e cuidadores, porém, menos de 8% delas têm acesso a esses cuidados. Nesse relatório foram avaliadas as condições de morrer em 40 países do mundo, incluindo o Brasil. Nosso país atingiu uma nota de 2,2 (a nota variava de 0-10), ficando à frente apenas de Uganda e da Índia (SANTOS, 2011).

A motivação para a realização desta investigação se deu em razão dos autores trabalharem num hospital geral secundário, no qual a maioria dos seus pacientes são idosos portadores de doenças crônicas e muitos com critérios para palição. Esse serviço se tornou uma referência no atendimento a doentes crônicos do sistema público no Estado do Ceará com a abertura em 2009 da Unidade de Cuidados Especiais e da Unidade de Acidente Vascular Cerebral (AVC) subagudo. Tais unidades se especializaram na reabilitação de pacientes crônicos como desmame difícil de VM, sequelados de AVC, sequelas de doenças neurológicas degenerativas, doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outros.

Vale salientar que a longa permanência desses pacientes na instituição requer um planejamento do cuidado prestado; grande parte dos pacientes tem perfil crítico-crônico, ou seja, portadores de comorbidades ameaçadoras à vida, com parcial ou total dependência para cuidados básicos de vida, tornando-se um desafio mensurar a efetividade dos planos terapêuticos, avaliando-se assim, a perda de oportunidades, ocorrências de eventos adversos e atraso na desospitalização.

2 | OBJETIVO

Relatar a experiência de construção e implantação de um indicador de resultado voltado à avaliação da assistência a pacientes crônicos de alta dependência.

3 | MÉTODO

O atual estudo consiste em um relato de experiência vivenciado pelos autores no período de julho de 2016 a dezembro de 2017, durante a implantação da linha de cuidados a pacientes crônicos de alta dependência em um hospital de assistência secundária na cidade de Fortaleza, Ceará, gerido com recursos públicos estaduais. Tal instituição é referência no atendimento e desospitalização de pacientes crônicos de alta dependência, que por sua vez, possui unidades de cuidado e apoio específicos, como Unidade de Cuidados Especiais (UCE), Serviço de Assistência Domiciliar (SAD) e equipe referência em cuidados paliativos no Estado.

O Time de Liderança da UCE, em parceria com o Núcleo de Qualidade do hospital, elaborou o primeiro desenho da linha de cuidado do paciente crônico de alta dependência, através da revisão da modelagem do processo da UCE com definição de suas etapas, na qual foi possível identificar os projetos terapêuticos mais trabalhados na unidade. Utilizou-se a ferramenta de qualidade *Brainstorming* para definir o perfil da unidade, fornecedores, clientes, riscos prioritários, protocolos institucionais e de reabilitação mais utilizados e resultados esperados.

Brainstorming significa tempestade de ideias, ou seja, pensamentos e ideias que cada pessoa do grupo pode expor sem restrições. Pode considerar, por exemplo, fatores de influência de um determinado problema (causas), sendo posteriormente discutidos pelo próprio grupo (SANTO e ZOCRATTO, 2020).

Definiu-se o perfil e critérios de elegibilidade para inclusão nos protocolos de reabilitação, o protocolo de desmame de ventilação mecânica prolongado, composto pelos critérios de inclusão: paciente que falhar repetidamente no teste de respiração espontânea (TRE), a partir do sétimo dia do primeiro TRE; pacientes com pneumopatia crônica; insuficiência cardíaca de classe funcional III ou IV; doença neurológica de alta dependência para as atividades de vida diária e cirrose hepática. Critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos e pacientes com morte encefálica confirmada.

Quanto aos critérios de inclusão para o protocolo de decanulação, a equipe assistencial avaliou se o paciente está em estabilidade hemodinâmica; ausência de Ventilação Mecânica (VM); ausência de secreção brônquica purulenta abundante (necessidade de aspiração menos de 3 vezes ao dia); com saturação de O₂ estável por mais de 24 horas (maior que 95% em ar ambiente); gasometria (PH) dentro dos valores normais; pacientes que apresentam ausência de delírios ou perturbações psiquiátricas; afebril há mais de 48 horas; tosse eficaz/capacidade de expectorar ou capacidade para usar aparelho para tosse assistida; radiografia de tórax sem novas alterações e deglutição funcional satisfatória.

Os critérios de elegibilidade para inclusão no protocolo de desmame da via alternativa de alimentação foram nível de consciência com Glasgow > 10 e diminuição da

secreção das vias aéreas em pacientes traqueostomizados e/ou com suporte de ventilação mecânica. Critérios de exclusão se trataram pacientes com câncer de cabeça e pescoço em estágio avançado; lesões de esôfago em estágio avançado; doenças demenciais e/ou degenerativas em estágios avançados; lesões em sistemas digestivos; alterações psiquiátricas que interfiram na aceitação da dieta e intervenção nutricional para melhorar aporte calórico do paciente.

Quanto à nutrição, os pacientes internados na unidade apresentam risco nutricional. Sendo assim, todos são avaliados e acompanhados pela nutricionista da unidade. Utilizam-se as nomenclaturas ganhou, manteve e perdeu para classificar o desfecho dos pacientes. Vale ressaltar que, os desfechos favoráveis são: ganhou ou manteve.

Quanto as lesões por pressão, os pacientes internados na unidade apresentam, em sua totalidade, risco elevado para o desenvolvimento de lesões dessa natureza, conforme a Escala de Braden. Desse modo, todos são avaliados e acompanhados pelos enfermeiros da unidade em parceria com o serviço de Estomaterapia da instituição. Utilizam-se as nomenclaturas pele íntegra, melhora, sem alteração, cicatrização e piora para classificar o desfecho dos pacientes. Salienta-se que os desfechos favoráveis são: pele íntegra, melhora, cicatrização e sem alteração.

Percebeu-se a necessidade de mensurar o desempenho obtido, bem como a necessidade de definir metas e gerenciar os protocolos assistenciais acima citados. Para armazenar as informações referentes aos dados dos pacientes e seu desempenho após aplicação dos protocolos, criou-se uma planilha utilizando o Google Drive™, por se tratar de uma ferramenta digital gratuita, de fácil manuseio e acessível ao Time de Liderança da unidade.

Mede-se para controlar/melhorar o desempenho. Medidas têm que ser úteis, fazer sentido para orientar a gestão no dia a dia. A medição tem que ser orientada para a melhoria do desempenho e a melhoria do desempenho tem que ser orientada pela medição (BRASIL, 2009).

Com o objetivo de reduzir os desvios na assistência, é preconizado que a meta de um programa de garantia de qualidade nas instituições assegure ao usuário grau elevado de excelência por meio de medição e avaliação dos componentes estruturais, das metas, dos processos e resultados apresentados pelos usuários, seguidos das alterações necessárias para a melhoria do serviço (NASCIMENTO et. al., 2008).

Elaborou-se a ficha técnica de mensuração da efetividade dos protocolos assistenciais de reabilitação e prevenção, bem como a ficha técnica do indicador de resultado estabelecido pelo projeto terapêutico individualizado, denominado “Saída Conforme”. Os indicadores são instrumentos de gestão essenciais nas atividades de monitoramento e avaliação das organizações, assim como seus projetos, programas e políticas, pois permitem acompanhar o alcance das metas, identificar avanços, melhorias de qualidade, correção de problemas, necessidades de mudança, entre outros (BRASIL,

2009).

Segundo a Rede Interagencial de Informações para a Saúde (RIPSA), que é uma iniciativa conjunta do Ministério da Saúde e da Organização Pan-Americana da Saúde para promover a produção, análise e disseminação de informações relacionadas à saúde no país, a elaboração do indicador deve ser baseada em um instrumento de orientação técnica denominado “ficha de qualificação do indicador” onde constam oito tópicos norteadores: **conceituação** ou definição do indicador; **interpretação** da informação e seu significado; **usos** ou forma de utilização dos dados; **limitações** ou fatores que restringem a interpretação do indicador; **fontes** de dados; **método de cálculo** ou fórmula; **categorias sugeridas para análise**, ou seja, variáveis que contribuem para interpretação dos dados, tais como faixa etária, unidades geográficas etc.; e **dados estatísticos e comentários**.” (MOURA et. al., 2009).

Saída Conforme trata-se de um indicador de resultado do projeto terapêutico da equipe assistencial. Realizada uma análise da efetividade dos protocolos de reabilitação e prevenção aplicados durante o tempo de internação do paciente, associados à ocorrência de eventos adversos que possam impactar no tempo de permanência hospitalar previsto. A saída conforme é um indicador criado para promover uma alta segura, oportuna e adequada aos pacientes crônicos de alta dependência.

Para o cálculo da saída conforme, devem ser considerados os critérios:

1. Desmame de VM: Pacientes elegíveis ao protocolo e que concluíram o desmame de ventilação mecânica sem intercorrências de processo, independentemente do número de tentativas.
2. Desmame de TQT: Pacientes elegíveis ao protocolo e que concluíram a decanulação de TQT sem intercorrências de processo, independentemente do número de tentativas.
3. Desmame de SNE: Pacientes elegíveis ao protocolo e que concluíram o desmame de SNE sem intercorrências de processo, independentemente do número de tentativas.
4. Prevenção de LP: Pacientes que não fizeram Lesão de Pele grau 3 e 4 Pacientes que fizeram Lesão de Pele grau 1 e 2 e evoluíram satisfatoriamente. Pacientes que foram admitidos com Lesão de pele e tiveram evolução favorável.
5. Acompanhamento nutricional: Pacientes que saíram com um desfecho nutricional favorável (ganha ou manutenção de peso e perda para pacientes obesos)
6. Eventos Adversos: Pacientes que não sofreram eventos adversos com dano moderado, grave ou óbito.

Pacientes em cuidados paliativos exclusivos foram excluídos da amostra.

Considera-se “saída não conforme” o não cumprimento de qualquer um dos protocolos desmame de VM, TQT, SNE, ou seja, pacientes que saíram da unidade em uso de

algum dos dispositivos, porém que apresentasse critérios para retirada destes. Bem como no protocolo de prevenção de LP, o desenvolvimento de LP grau 3 e 4; categoria 1 e 2 com evolução negativa; ou ainda pacientes admitidos com LP com evolução desfavorável. No acompanhamento Nutricional, pacientes que saíram com desfecho nutricional desfavorável. Além da ocorrência de evento adverso com dano moderado, grave e óbito. Vale ressaltar que pacientes em cuidados paliativos de fim de vida foram excluídos da amostra.

Excluiu-se ainda os desfechos de pacientes que permaneceram menos de 48 horas na unidade, por ser considerado tempo insuficiente para avaliação de todos os membros da equipe multidisciplinar, bem como programação do projeto terapêutico.

Quanto às análises dos dados, realizou-se abordagem quantitativa e qualitativa, verificando-se o sucesso ou a(s) falha(s) da aplicação dos protocolos elegíveis aos pacientes, com desfecho mensal óbito, alta hospitalar, transferência e desospitalização (SAD), internados na UCE no período de janeiro a dezembro de 2017.

A utilização do método de análise com elementos qualitativos e quantitativos possibilita ampliar a obtenção de resultados nos estudos investigativos (DAL-FARRA, LOPES, 2013).

No âmbito gerencial, a utilização de indicadores propicia a identificação de problemas, subsidia ações e decisões efetivas, monitorando o seu desenvolvimento. Na assistência, possibilita a revisão dos protocolos adotados e os resultados obtidos, tendo como horizonte atingir os padrões de excelência. Quanto ao ensino e pesquisa, possibilita a disponibilização de um instrumento válido para a comunidade científica, articulando interesses e demandas de serviços e de pesquisadores.

Quanto aos aspectos éticos, foi respeitada a identidade dos pacientes com desfecho no período pesquisado, utilizou-se dados do gerenciamento assistencial do grupo, e dados de prontuário, quando necessário (Resolução CNS No. 510, 2016).

Vale ressaltar que a pesquisa foi financiada por recursos próprios, sem nenhum ônus para a instituição.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

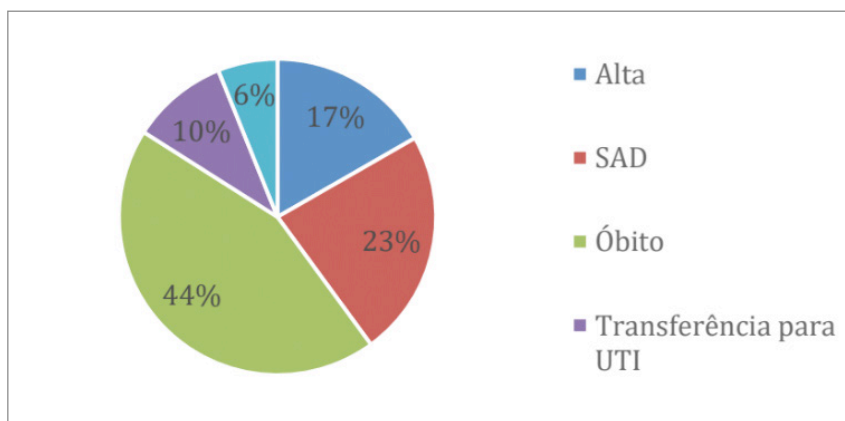


Gráfico 1: Tipos de desfechos 2017.

Observa-se que a unidade apresentou 263 desfechos entre os meses de janeiro a dezembro de 2017, média de vinte e dois (22) desfechos mensais. Verificou-se que 17% dos pacientes, apresentaram desfecho Alta, 23% foram desospitalizados (SAD), 44% evoluíram com o desfecho óbito, 10% foram transferidos para UTI e 6% foram transferidos para outra unidade hospitalar.

Considerando-se que na desospitalização, o paciente vai para casa e fica sob os cuidados da equipe do serviço de assistência domiciliar (SAD); o tipo de desfecho “Alta” representa então 40% dos desfechos da unidade.

Segundo Moura et al. (2009), a utilização de indicadores de qualidade assistencial só se justifica se estiver inserida numa cultura institucional de melhoria contínua. O que se pretende destacar com isso é que a informação que o dado proporciona deve ser analisada como instrumento para conhecer o serviço e apoiar as decisões gerenciais, seja para implementação de ações corretivas dos processos identificados como geradores de resultados insatisfatórios ou reconhecimento da adequação de determinadas intervenções. Desta forma, salienta-se que a iniciativa de adoção de indicadores deve estar desprovida de caráter fiscalizatório e punitivo, tornando fundamental o apoio de ações educativas para o sucesso desta prática.

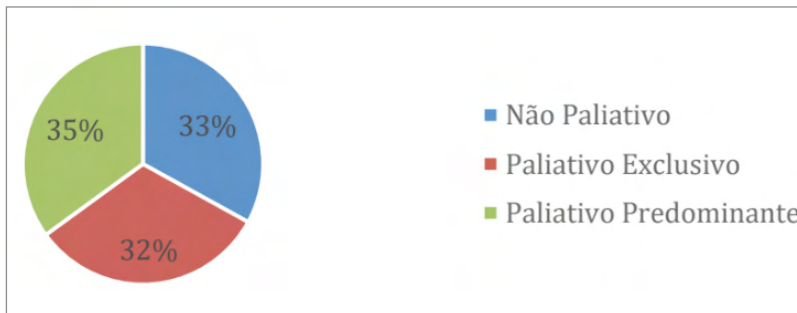


Gráfico 2: Percentual de Pacientes Sob Cuidados Paliativos de Janeiro a Dezembro De 2017.

Observa-se que dos 263 desfechos, apenas 86 (33%) pacientes não apresentaram indicação para cuidados paliativos durante o período estudado. Quanto à classificação dos pacientes em relação ao grau de palição, verificou-se que 177 (67%) desfechos foram em pacientes em cuidados paliativos, sendo 84 (32%) destes em pacientes sob cuidados de fim de vida, o que justifica o elevado número de desfecho “óbito” na unidade, pois trata-se de um desfecho esperado em pacientes sob cuidados paliativos.

O termo paliativo deriva do latim pallium, que significa “manto”. Onde a essência dos cuidados paliativos é aliviar os efeitos das doenças incuráveis ou prover manto para acobertar, proteger e dar suporte àqueles que não podem mais ser curados pela medicina. A fase de terminalidade da doença é marcada por uma progressão da doença avançada de forma a diminuir gradativamente a funcionalidade do indivíduo (FRANCK, 2016).

Esse indicador possibilita direcionar as ações assistenciais da unidade, fortalecendo a gestão clínica do cuidado. Os indicadores são instrumentos para definir parâmetros e realizar comparações, além de agregar valor frente ao encontrado e ao ideal estabelecido, tendo em vista que as informações obtidas podem beneficiar a administração dos serviços e favorecer a tomada de decisão com o menor grau de incerteza (LABBADIA et. al., 2011).

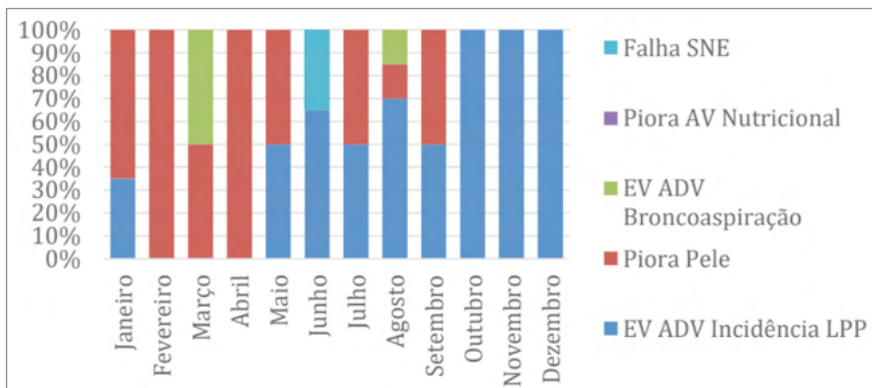


Gráfico 3: Motivo Das Não Conformidades 2017.

Quanto a não conformidade das saídas de acordo com os critérios estabelecidos, foram identificados apenas 30 (12%) saídas não conformes do total de desfechos analisados. Os motivos encontrados foram 17 incidência de lesão por pressão, que correspondeu em 52% de saídas não conformes; 10 piora de lesão por pressão prévia (40%), 02 Broncoaspiração (05%) e 01 falha no protocolo de desmame de SNE (03%).

Os resultados foram desanimadores a primeira vista, uma vez que a incidência de lesão por pressão mostrou-se muito elevada na unidade. Analisou-se detalhadamente estes eventos e observou-se que muitos pacientes em cuidados paliativos exclusivos apresentavam lesões por pressão nos últimos quinze (15) dias de vida e que lesões poderiam ser consideradas inevitáveis, uma vez que, no final da vida, em geral, a oferta nutricional deixa de ter objetivo nutritivo e passa a ser ofertada somente com a função de conforto, tendo inclusive, seu volume reduzido, em função da lentificação do esvaziamento gástrico. Além disso, observou-se que a falência orgânica que ia se estabelecendo, afetava também a pele, gerando lesões. Outra situação encontrada foi o desafio de acompanhar longitudinalmente estes pacientes que, muitas vezes, apresentavam tempo de permanência prolongado e dificuldades de cunho social, como insuficiência familiar.

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, assim como ocorre com os demais órgãos, pode sofrer disfunção quando a pessoa está em fase final de vida devido à doença crônica avançada ou agravo agudos que não correspondem ao tratamento proposto ou, ainda, devido a alterações sistêmicas ocasionadas pelo tratamento (FRANCK, 2016).

Os indicadores devem possibilitar, na avaliação de uma área ou serviço da instituição, a visualização do contexto organizacional na sua estrutura formal e informal, considerando as relações tangenciais dos diferentes serviços, bem como as consequências das decisões gerenciais que esses resultados acarretam (TRONCHIN et. al.,2009).

Na área da saúde, os indicadores mais adotados são os eventos sentinelas: caracterizados pela seriedade do evento e pelo grau através do qual pode ser evitado. Este indicador mede processos ou acontecimentos graves, indesejados e eventualmente evitáveis. São sinalizadores de não conformidades e sua utilização dependerá do contexto em que estiverem inseridos. O princípio/ razão que explica por que um indicador é útil na especificação e avaliação de uma prática (TRONCHIN et. al.,2009).

5 | CONCLUSÃO

Percebeu-se que se faz necessário reforçar com a equipe assistencial medidas preventivas relacionadas à prevenção de incidência de lesão por pressão, bem como fortalecer as ações de tratamento das lesões prévias; realizar revisão do processo assistencial e interação com os serviços de apoio para garantir os insumos necessários ao tratamento das lesões de pele pré-existentes.

Contudo, o resultado encontrado era esperado, devido ao perfil de alta dependência

dos pacientes da unidade, muitos destes apresentando disfunções orgânicas e sob cuidados paliativos. Acompanhar e tratar estes pacientes se torna um grande desafio para os profissionais de saúde que, em sua maioria, não tem formação para tratar e conviver com a terminalidade. Ao contrário, sempre são treinados para curar; e a morte de um paciente representa o fracasso de sua atuação profissional.

Deve-se considerar que, a utilização de indicadores auxilia o gestor ao apontar a necessidade de se considerar as práticas assistenciais, educacionais e gerenciais em saúde, a missão e a estrutura organizacional, bem como os recursos humanos, materiais, financeiros e estruturais disponíveis e as expectativas da clientela atendida.

Conclui-se que ainda é um desafio a organização dos fluxos da rede de saúde, para que o SUS atenda às necessidades dos usuários na sua integralidade. O desenho da linha de cuidado e a análise dos desfechos dos pacientes do referido estudo, através da criação de um indicador de resultado, possibilitou implementar a assistência aos pacientes, avaliar os recursos necessários para proporcionar um desfecho com foco na qualidade da assistência prestada, seja ele qual for.

6 | REFERÊNCIAS

SANTO, J. A. E. et al. FERRAMENTAS DA QUALIDADE NOS PROCESSOS GERENCIAIS DE SERVIÇOS DE SAÚDE. *Rev Remecs*, v. 5, n. 9, p. 62-67, out. 2020.

SOUZA, E.N; GEORGES, M. R. R. GESTÃO DE OPERAÇÕES E SUSTENTABILIDADE: UM PANORAMA NA HOSPITAIS ACREDITADOS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**, set. 2020.

MANSO, M. E. G; GÓES, L. G; CONCONE, M. H. V. B. Idosos edoenças crônico-degenerativas: por que eu, e por que agora?. **Revista Kairós-Gerontologia**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 379-393, 30 dez. 2019.

SOUZA, M.F.M. et al Transição da saúde e da doença no Brasil e nas Unidades Federadas durante os 30 anos do Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 1737-1750, 1 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Política Nacional de Humanização da Atenção e Gestão do SUS. Gestão participativa e cogestão / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Política Nacional de Humanização da Atenção e Gestão do SUS. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 56 p.: il. color. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO Nº 510, DE 07 DE ABRIL DE 2016 Publicada no DOU nº 98, terça-feira, 24 de maio de 2016 - seção 1, páginas 44, 45, 46

LEITE, V.M.M. et al., Depressão e envelhecimento: estudo nos participantes do Programa Universidade Aberta À Terceira Idade. *Ver. Bras. Saúde Mater. Infante*. Recife, v. 6,n.1, 2006. Disponível em: Acesso 20 de dez 2015.

FÁBIO, S.R.C., et al. Rotinas no AVC – Pré - Hospitalar e Hospitalar. Ministério da Saúde. Abril 2009.

MORO,C.H.C; FÁBIO,S.R.C. PACTOAVC - Programa de Aperfeiçoamento Continuado no Tratamento do Acidente Vascular Cerebral, 2009.

BONFADA, D. B. et al. Análise de sobrevivência de idosos internados em Unidades de Terapia Intensiva. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 20, n. 2, p. 198-206, set. 2017.

QUEIROZ, T. A. et al. CUIDADOS PALIATIVOS AO IDOSO NA TERAPIA INTENSIVA: OLHAR DA EQUIPE DE ENFERMAGEM. **Texto Contexto Enferm**, v. 27, n. 1, p. 1-10, jan. 2018.

MOURA, G. M. S. S. et al. Construção e implantação de dois indicadores de qualidade assistencial de enfermagem. **Revista Gaúcha Enfermagem**. V.30, n. 1, p.136-140, 2009.

NASCIMENTO, C. C. P. et al. Indicadores de resultados da assistência: análise dos eventos adversos durante a internação hospitalar. **Revista Latino-americana de Enfermagem**. V.16, n.4, 2008.

BURLÁ, C. **Cuidados Paliativos: Afinal, do que se Trata? In: Conflitos Bioéticos do Viver e do Morrer/Organização de Rachel Duarte Moritz**; Câmara Técnica sobre Terminalidade da Vida e Cuidados paliativos do Conselho Federal de Medicina. Brasília: CFM, pg 41-48, 2011.

SANTOS, F. S. **Introdução. In: Cuidados Paliativos: Diretrizes, Humanização e Alívio de Sintomas/** editor Franklin Santana Santos. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

DAL-FARRA, LOPES, Métodos mistos de pesquisa em educação: pressupostos teóricos. **Nuances: estudos sobre Educação**, Presidente Prudente-SP, v. 24, n. 3, p. 67-80, set./dez. 2013.

LABBADIA, L. L. et al. Sistema Informatizado para Gerenciamento de Indicadores da Assistência de Enfermagem do Hospital São Paulo. **Revista Escola Enfermagem**. V.45, n.4, p.1013-1017, 2011.

TRONCHIN, D. M. R. et al. Subsídios teóricos para a construção e implantação de indicadores de qualidade em saúde. **Revista Gaúcha Enfermagem**, v.30, n.3, p.542-546, 2009.

BRASIL. Guia referencial para medição de desempenho e manual para construção de indicadores. 2009, pg.11.

FRANCK, E. M. **Alterações de pele em pacientes em cuidados paliativos na terminalidade da doença e final da vida: coorte prospectiva**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

INFECÇÃO URINÁRIA CAUSADA PELA BACTÉRIA OPORTUNISTA *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA

Data de aceite: 01/11/2021

Camila Costa Mendes

Universidade CEUMA – UniCEUMA
Imperatriz, Maranhão

Camila Santiago Pinheiro da Silva

Universidade CEUMA – UniCEUMA
Imperatriz- Maranhão

Adayran Raposo Lacerda

Universidade CEUMA – UniCEUMA
Imperatriz- Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/2586361398252433>

Olnivânia Mayara Cardozo Almeida

Instituto Florence de Ensino Superior
São Luís, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/3820190069171722>

Mari Silma Maia da Silva

Universidade CEUMA – UniCEUMA
São Luís, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/7276527308435919>

Domingos Magno Santos Pereira

Universidade CEUMA – UniCEUMA
Imperatriz, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/2181262993095656>

Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo

Universidade CEUMA – UniCEUMA
Imperatriz, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/5072804383625735>

RESUMO: A infecção do trato urinário é um problema frequente, seu principal agente causador é a bactéria *Escherichia coli*, a manifestação poder ser sintomática ou assintomática, essa patologia acomete ambos

os sexos, porém mulheres são mais propensas em fator da sua anatomia genital ascendente. Os microrganismos invadem o sistema urinário provocando a infecção. Fatores de virulência como as fimbrias estão relacionadas as principais infecções do aparelho urinário. Com o uso abusivo dos antibióticos a resistência bacteriana tornou-se algo frequente o que causa grande impacto no tratamento da doença, os sintomas clínicos associados as ITUS podem variar, na cistite urgência miccional, noctúria, disúria e dor supra púbica é comum e o sintoma atípico é a febre, já a pielonefrite apresenta todos os sintomas da cistite, mas sempre acompanhada de febre alta além de dor lombar uni ou bilateral. Dentre os exames realizados estão EAS, urocultura sendo padrão ouro e conforme a gravidade os de imagem são solicitados.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções urinárias; *Escherichia coli*; Diagnóstico; Manifestações clínicas.

URINARY INFECTION CAUSED BY THE OPPORTUNISTIC BACTERIA UROPATHOGENIC *Escherichia coli*

ABSTRACT: Urinary tract infection is a frequent problem, its main causative agent is the bacterium *Escherichia coli*, the manifestation may be symptomatic or asymptomatic, this pathology affects both sexes, but women are more prone to their ascending genital anatomy. Microorganisms invade the urinary system causing infection. Virulence factors such as fimbriae are related to the main urinary tract infections. With the abusive use of antibiotics, bacterial resistance has become something frequent which has a

great impact on the treatment of the disease, the clinical symptoms associated with UTIs can vary, in cystitis, urinary urgency, nocturia, dysuria and suprapubic pain is common and the symptom fever is atypical, whereas pyelonephritis presents all the symptoms of cystitis, but is always accompanied by high fever in addition to unilateral or bilateral low back pain. Among the exams performed are EAS, uroculture being the gold standard and, depending on the severity, imaging are requested.

KEYWORDS: Urinary infections; *Escherichia coli*; Diagnosis; Clinical manifestations.

1 | INTRODUÇÃO

Pereira e Calhau (2016), definem a Infecção do Trato Urinário (ITU) como uma bacteriúria sintomática considerável. Isto é, infecções que são comuns em todas as faixas etárias, especialmente em termos de gênero. Devido a anatomia do sistema urogenital feminino, as mulheres acabam sendo mais propensas a infecções bacterianas desse tipo. De inflamação assintomática a quadro mais graves, como a pielonefrite, as manifestações clínicas das infecções do trato urinário podem variar.

Assim, cerca de 20% a 40% das infecções do trato urinário inferior progridem para pielonefrite (SILVA et al., 2014). A ocorrência e a gravidade dessas patologias do trato urinário estão relacionadas a questões como a virulência dos microrganismos que causam a doença. Assim como inflamações, fatores anatômicos, força dos mecanismos de defesa e intervenções terapêuticas adequadas. (COSTA, 2019).

A infecção do trato urinário é uma patologia considerada frequente, sendo a segunda mais comum na população, perdendo apenas para aquelas que afetam o sistema respiratório. Estima-se que ocorram 150 milhões de infecções no trato urinário em todo o mundo a cada ano. As infecções do trato urinário podem ocorrer em ambos os sexos, mas são particularmente proeminentes em certas faixas etárias, como mulheres jovens com atividade sexual ativa e crianças menores de seis anos e idosos (COSTA, 2019).

Vale ressaltar que a ITU pode ser causada por uma variedade de microrganismos patogênicos, sendo mais comuns em infecções com etiologia bacteriana. Entre os microrganismos estão as bactérias *Staphylococcus* sp., bactérias saprófitas, *Enterococcus faecalis* e certas espécies de *Proteus* sp. e *Klebsiella* sp. Nas UTI's, as enterobactérias, especialmente a *E. coli*, representam infecções de 70% a 85% na comunidade e cerca de 50% em infecções hospitalares fora da UTI (COSTA, 2019). Pereira e Calhau (2016) concluíram que a causa mais comum de infecções do trato urinário é a *Escherichia coli* patogênica do trato urinário (ECUP).

A Bactéria *Escherichia coli* pertence ao grupo familiar Enterobacteriaceae, e está presente no solo, água, plantas e na flora intestinal humana e animal (SANTOS, 2018). A *E. coli* é uma bactéria mesófila decorrente desse fator possui um ótimo desenvolvimento a 37° C, que é a média da temperatura humana corporal o que facilita a contaminação e infecção (COSTA, 2019).

Esta bactéria está relacionada a infecções intestinais ou extra intestinais com níveis de gravidades diferentes, devido a dados epidemiológicos, sintomas clínicos e a permanência de fatores de virulência, a *E. coli* uropatogênica acaba sendo a principal responsável por originar infecções do trato urinário (FLORES-MIRELES, 2015).

Diante disso se torna necessário um estudo crítico de forma organizada deste problema que afeta todas as idades, apresentando quadros leves como uretrite, cistite que podem evoluir para mais graves como pielonefrite, podendo gerar comprometimento renal. Além disso, é interessante pontuar a questão da resistência bacteriana que é um problema frequente que acontece através do uso incorreto e abusivo dos antibióticos.

Dessa forma é imprescindível viabilizar informações contribuindo assim para uma melhor compreensão do estudo que tem como objetivo descrever a fisiopatologia da infecção pela bactéria *Escherichia Coli* e as causas de resistências bacterianas, evidenciar as manifestações clínicas quanto os sinais e sintomas associados a ITU. E abordar os principais exames realizados para o diagnóstico da infecção do trato urinário na *E. coli*.

2 | METODOLOGIA

Este estudo foi construído no formato de uma revisão de literatura, baseado em pesquisas em artigos buscados em bancos de dados tais como: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Google Acadêmico, Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (PubMed), selecionados de acordo com o tema proposto.

Atendendo os critérios de inclusão com artigos publicados nos anos de 2011 a 2021, utilizando os descritores: “Infecções Urinárias”, “Diagnóstico de infecções urinarias”, “Infecções do trato urinário por *Escherichia coli*”, artigos de língua inglesa e portuguesa.

Como critério de exclusão não foram utilizados artigos fora da data proposta obedecendo a publicação mínima dos últimos dez anos e que não contemplem as informações necessárias para produção do projeto.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fisiopatologia

A infecção urinária (ITU) ocorre no momento em que os microrganismos geralmente bactérias, invadem o sistema urinário atingindo a via ascendente, uretra, ureteres, bexiga e rins (YANASE,2018). Quando esses agentes bacterianos se propagam no aparelho urinário acaba prejudicando o prognóstico da pessoa afetada que pode variar desde um quadro simples de infecção assintomática até mesmo uma complicação com presença de abscesso na região do períneo levando a sepse. Em virtude deste fator é importante detectar rastros de infecção por menores que sejam em tempo favorável para evitar complicações negativas e até mesmo intervir com um tratamento cessando o desenvolvimento da infecção

(CASTRO, 2021).

Mulheres comumente são mais propensas as infecções por ter o sistema urinário mais exposto, uma uretra mais curta e próxima dos anus, o que conseqüentemente se torna mais fácil a entrada desses microrganismos oportunistas, desenvolvendo um quadro de infecção do trato urinário quando comparado aos homens. O aparecimento dessa infecção geralmente acontece através de bactérias presentes na microbiota intestinal, sendo a *Escherichia coli* a principal e mais frequente (PAGNONCEL; COLACITE, 2016).

A fim de tornar a colonização eficaz, as bactérias aderem-se a membrana mucosa e à abertura vaginal e posteriormente para uretra e urotélio da bexiga. As infecções do trato urinário são quase sempre limitadas a bexiga o que não isenta a possibilidade de as bactérias subir e atingir o ureter e a pelve renal, através do refluxo vesico-ureteral que é produzido por causa do comprometimento do mecanismo antirrefluxo do meato uretral decorrente do edema ocasionado pela infecção já instalada. Dessa maneira, as alterações no peristaltismo do canal que conduz a urina e a aderência bacteriana agem facilitando a chegada desse patógeno ao rim (COSTA, 2019).

Neste mesmo lugar podem ascender mais ainda, através de papilas renais, e chegar aos túbulos contorcidos, podendo se espalhar pelo parênquima ocasionando a pielonefrite aguda. Esta última ascensão ocorre pelo refluxo pielotubular ou através da obstrução urinária, aumentando a pressão da pelve favorecendo assim a via ascendente (COSTA, 2019).

As fimbrias são os principais fatores de virulência relacionadas à patogênese das infecções do trato urinário. A adesina fimH faz o intermédio das ligações entre os receptores do hospedeiro e as glicoproteínas; além de ser uma estrutura encontrada na porção distal da fimbria 1, determinada como um dos tipos prevalentes desses filamentos. Moléculas superficiais de adesão tais como as integrinas facilitam a infecção, já a glicoproteína uroplaquina localizada na superfície da bexiga é um receptor essencial para a adesina fimH. Portanto as células invasoras se replicam antes da *E. coli*, se dissociar migrando para fora da célula em forma de filamentos. Tal estratégia de invasão evita que as bactérias sejam exterminadas por neutrófilos, o que acaba favorecendo a colonização do urotélio (MOTA, 2011).

Tem-se ainda o antígeno capsular k presente nas *E. coli* e está bastante relacionado a ITU, pois é responsável pela resistência bacteriana a fagocitose e a inflamação provocada no hospedeiro. Esses microrganismos possuem também o fator necrosante citotóxico 1 e a hemolisina alfa, que também é prejudicial para as células do hospedeiro e está relacionada à complicação da infecção, tratando-se de um fator letal de virulência, que provoca efeitos citotóxicos no epitélio renal promovendo assim a cicatrização (MOTA, 2011).

Resistência Bacteriana

Nas últimas décadas houve uma grande evolução nos fármacos que atuam nas

infecções urinárias facilitando o tratamento médico, refletindo em um baixo índice de mortalidade devido a doenças bacterianas. Em contrapartida o uso de antibióticos de forma inadequada ocasionou o desenvolvimento de bactérias com resistência aos antibióticos. Dessa maneira, o acompanhamento e estudo de traços de sensibilidade relacionada a resistência e patogenicidade das bactérias acaba minimizando erros terapêuticos e consequentemente diminuindo a multirresistência bacteriana pelo uso inadequado de antibióticos (OLIVEIRA, 2014).

É comum ocorrer resistência onde uma bactéria sensibilizada pelo fármaco desenvolva resistência a ele possuindo uma nova característica. Em virtude da mutação cromossomal, enterobactérias como *E. coli* adquirem resistência a antibióticos, onde no seu crescimento há mudança na estrutura macromolecular com alterações nas proteínas, ribossomos e elementos da parede celular (OLIVEIRA, 2014).

Os patógenos podem adquirir resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), sendo que o principal constituinte que determina o mecanismo de resistência aos betalactâmicos é a produção de beta-lactamases. A bactéria *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) apresenta resistência a ampicilina que é pertencente ao grupo das penicilinas, e as cefalosporinas de primeira geração, em específico a cefalotina, onde essa resistência resulta na produção da enzima beta-lactamase (CASTILHO, 2021).

Quem apresenta uma ação contra microrganismos gram-negativos são as cefalosporinas de terceira geração. Portanto é produzido enzimas extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), principalmente em cepas de *E. coli* e *Klebsiella sp*, podendo ocorrer também em outras espécies, um fator preocupante para o tratamento são as cepas produtoras de ESBL capazes de suportar a ação das cefalosporinas de terceira geração (CASTILHO, 2021).

A *E. coli* é a bactéria mais comum nas infecções urinárias e apresenta uma baixa sensibilidade *in vitro* a drogas. Sua resistência a cefalotina (em 40% das infecções ambulatoriais e 73,3% em pacientes internados) é considerável, pois esse antibiótico está entre a primeira opção para tratar cistite em gestantes sendo que nesse período tem-se o uso limitado de antibióticos (CASTILHO, 2021). Altos níveis de sensibilidade antimicrobiana da *E. coli* foram encontrados na gentamicina 96% e amicacina 100% que é uma classe pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos (CASTILHO, 2021), sendo que vários antibióticos são compostos pelos aminoglicosídeos que tem grande importância no tratamento de diversas infecções bacterianas por possuir uma estrutura química complexa (CASTILHO, 2021).

Nas infecções urinárias há comumente a combinação de trimetoprim + sulfametoxazol que usualmente é o antibiótico de primeira escolha (CASTILHO, 2021). A longo prazo o tratamento prático com esse antibiótico não é mais aconselhado em decorrência da sua alta resistência que foi ocorrendo através do uso indiscriminado, necessitando do uso de medicamentos diferentes. Com os mecanismos de resistência instalados essa dinâmica de

uso aplica-se, também, a ampicilina, tetraciclina e cefalotina (CASTILHO, 2021).

Dentre as drogas com alta eficácia no tratamento de infecções do trato urinário tem-se as quinolonas (ácido nalidixico) sintetizada em 1962 a partir da cloroquina medicamento utilizado para o tratamento de malária, a principal estrutura da quinolona viabilizou o desenvolvimento de antibióticos de alta eficácia que tivessem um amplo espectro (RODRIGUES-SILVA, Caio et al, 2014).

A ciprofloxacina, norfloxacina e a orfoxacina tem grande utilidade, especialmente quando o agente infeccioso é a *E. coli uropatogênica* (OLIVEIRA, 2011). A resistência encontrada nas fluoroquinolonas variam de 13% a 14% reforçando a ideia de que o de forma empírica segue os parâmetros citados anteriormente com o sulfametoxazol + trimetoprim, onde brevemente não poderão mais ser utilizados para o tratamento de infecções (CASTILHO, 2021).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Infecção do Trato Urinário Baixo

A cistite, infecção do trato urinário baixo, apresenta urgência a urinar, noctúria, disúria, polaciúria e dor supra púbica, sendo que a febre nesse tipo de infecção é uma condição atípica. Para a melhor compreensão da história clínica do paciente é importante atentar-se a características de episódios prévios de cistite. Vale ressaltar que a presença de piúria pode refletir em uma urina turva, acompanhada ou não de presença de sangue tornando-se avermelhada, com origem na litíase no decorrer do processo infeccioso (DE OLIVEIRA, 2021).

Infecções do Trato Urinário Alto

A pielonefrite, infecção do trato urinário alto, inicialmente apresenta os mesmos sintomas da cistite, porém nesse caso a febre é presente e bastante elevada, geralmente maior que 38°C, calafrios, dor lombar uni ou bilateral podendo migrar para o abdômen, flancos e/ou virilhas, quando a dor se apresenta na virilha é associada a litíase renal, nesse caso as características do processo de infecção local está presente, sendo, que muitas vezes sua intensidade é igual a gravidade do quadro de pielonefrite (DE OLIVEIRA, 2021).

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de infecção urinária é feito pela anamnese da história clínica do paciente e através de exames laboratoriais que são utilizados com o objetivo de indicar a infecção. Nesse âmbito a urocultura é o exame considerado padrão ouro (BORTOLOTTI, 2016). Exames de imagem são recomendados quando o paciente apresenta complicações sistêmicas e mudanças anatômicas (SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA, 2018).

Há também a utilização de fitas reagentes e exame microscópico, detectando

aumento de leucócitos (indicando piúria), presença de nitrato, alteração no pH urinário (maior que 7,5 é indicativo de ITU), proteinúria, hematúria, bacteriúria (DE OLIVEIRA, 2021).

A urocultura indica o agente responsável pela infecção facilitando o tratamento. Esse exame é feito em amostra do jato médio da urina de forma asséptica, de preferência antes do início da antibioticoterapia. A urina que apresenta maior número de bactéria por ter um tempo de incubação maior é a da manhã sendo esta a recomendada para a realização do exame, porém qualquer urina no decorrer do dia pode ser utilizada desde que colhida em um período de pelo menos duas horas posteriores a última micção excluindo-se assim falsos negativos (DE OLIVEIRA, 2021). Sendo a urocultura um exame padrão ouro para identificação da bactéria causadora é importante ressaltar que o fato do resultado não está disponível em 24 horas ocasiona a abordagem terapêutica empírica (VIDAL, 2015).

Teste de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos (TSA) apresenta uma baixa utilidade em cistite não complicadas e inicialmente tratadas de forma empírica o antibiograma é um exame auxiliar da urocultura. Quando não é resolvido com tratamento empírico precoce, este exame se torna essencial por fornecer o antibiótico conveniente para o tratamento (DE OLIVEIRA, 2021).

A hemocultura não tem valor diagnóstico no caso de ITU “baixa”, mas possui alta relevância em quadros e ITU “alta” com bacteremia presente em cerca de 25% a 60% dos pacientes, além de mostrar o agente causador e o risco de evoluir para sepse (DE OLIVEIRA, 2021).

O hemograma é solicitado nas infecções do trato urinário, pois é necessário avaliar todo o estado do paciente, especialmente marcadores de infecções tais como o PCR, VHS com possível leucocitose. Tais exames tem pouca utilidade clínica, pois, esses marcadores podem estar elevados em outras situações que há inflamação (LO, 2018).

Diagnóstico por Imagem

Em cistites não complicadas e em casos agudos, os exames de imagem são pouco utilizados. Porém, se tornam indispensáveis em casos de infecções complicadas pois identificam anormalidades recorrentes a essas condições (DE OLIVEIRA, 2021).

A ultrassonografia, tomografia e a ressonância magnética são exames indicados excepcionalmente em casos de cistite e pielonefrites não solucionados com tratamento prático assumindo grande importância no diagnóstico de complicações onde abscessos acúmulos de material purulentos são observados. Evidenciando assim modificações na estrutura e funcionamentos do aparelho urinário (rins policísticos, litíases etc.). Outros exames feitos a partir de casos selecionados é a urografia excretora (UEG) que não pode ser realizado em casos agudos em virtude da sua nefrotoxicidade. E por fim a radiografia simples que se mostra eficiente para identificar cálculos (DE OLIVEIRA, 2021).

4 | CONCLUSÃO

A bactéria *Escherichia coli* é a principal causadora das infecções do trato urinário e acomete homens e mulheres, sendo mais prevalente em mulheres pelo fato de ter o aparelho urinário, mas exposto. Esse patógeno é classificado de acordo com as manifestações clínicas, fatores de virulência da cepa e local anatômico da infecção. A infecção pode se apresentar de forma sintomática e assintomática pelo fator determinante da sua complexidade que varia de acordo com a imunidade da pessoa acometida. A resistência bacteriana é um problema comum na infecção em virtude do uso indiscriminado de antibióticos. O diagnóstico da infecção é feito a partir da história clínica, exames laboratoriais e também se utiliza o diagnóstico por imagem quando necessário.

REFERÊNCIAS

BORTOLOTTI, Lenir Alves et al. Presença de analitos químicos e microscópicos na urina e sua relação com infecção urinária. **Saúde (Santa Maria)**, v. 42, n. 2, p. 89-96, 2016.

CASTILHO, Laura Donadio. Infecção do trato urinário por *Escherichia coli* Uropatogênica resistente a múltiplos antibióticos. 2021.

CASTRO, Fernanda et al. INFECÇÃO URINÁRIA DURANTE A GRAVIDEZ. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 6, n. 3, p. 11-11, 2021.

COSTA, Igor Augusto Costa e et al. Infecção do trato urinário causada por *Escherichia coli*: revisão de literatura. **SALUSVITA, Bauru**, v. 38, n. 1, p. 155-193, 2019.

DA ROCHA BRAGGIATO, Charlene; LAZAR, Carlos Alberto Emílio Leopoldo. Infecção do trato urinário não complicada na mulher: relato de caso e revisão da literatura. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 18, n. 4, p. 231-234, 2016.

DE OLIVEIRA, Luma Lainny Pereira et al. INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO: UMA ABORDAGEM CLÍNICO-TERAPÊUTICA. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 27, 2021.

FLORES-MIRELES, Ana L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FURLAN, Antonio Paulo Favacho et al. Prevalência e perfil de resistência bacteriana nas infecções do trato urinário em hospitais da região norte e nordeste do Brasil: uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 9244-9256, 2021.

MOTA, Mônica Lima da. Patogenia da infecção urinária. 2011.

OLIVEIRA, Anna Laiza Davila et al. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, Fagna Amorim de. Características de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos e estirpes de *Escherichia Coli* Uropatogênica. 2011.

PAGNONCELI, Juliana; COLACITE, Jean. Infecção urinária em gestantes: revisão de literatura. **Revista uningá review**, v. 26, n. 2, 2016.

RODRIGUES-SILVA, Caio et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 37, p. 868-885, 2014.

SANTOS, Thaynara Gonzaga et al. Patotipagem, tipagem filogenética, determinação de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* uropatogênica. 2018.

YANASE, L. E. Padrão da microbiota em uroculturas das gestantes do Hospital Santo Antônio de Blumenau e os padrões de sensibilidade aos antimicrobianos. Rev. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, ACM, v. 47, n. 4, p. 73-79, dez. 2018.

CAPÍTULO 8

RINITE ALÉRGICA E FUNÇÃO PULMONAR POR OSCILOMETRIA DE IMPULSO EM CRIANÇAS PRÉ-ESCOLARES

Data de aceite: 01/11/2021

Décio Medeiros

Meyrian Luana Teles de Sousa Luz Soares

Marco Aurélio de Valois Correia Junior

Pedro Henrique Teotônio Medeiros Peixoto

Rita de Cássia da Silva Costa

RESUMO: Introdução: Entre as mais prevalentes doenças respiratórias destaca-se a rinite alérgica, responsável por impacto negativo na qualidade de vida, inclusive com comprometimento da função pulmonar das pessoas afetadas. Embora a rinite alérgica possa se desenvolver em qualquer idade, sua ocorrência é comum na infância. **Objetivo:** Avaliar a função pulmonar em crianças com rinite alérgica por meio do sistema de oscilometria de impulso. **Métodos:** Estudo transversal com crianças com idade entre 3 e 6 anos, classificados em dois grupos: rinite alérgica, composto por crianças com diagnóstico de rinite alérgica, e um grupo comparativo, composto por crianças sem patologia alérgica respiratória. As crianças foram submetidas a testes de função pulmonar pela oscilometria de impulso. **Resultados:** 82 crianças, sendo 52% do sexo feminino, com média de idade $4,65 \pm 0,25$ e altura $104,64 \pm 5,14$. Não houve diferença em R5 e X5 em relação ao predito entre os grupos, porém a elastância intergrupos foi maior no grupo rinite alérgica pré e pós uso do broncodilatador. Os parâmetros R5, X5 e AX apresentaram diferença quando verificada a relação intragrupo. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo demonstraram que crianças pré

escolares com rinite alérgica podem apresentar comprometimento na função pulmonar, devido ao envolvimento brônquico associado. O sistema de oscilometria de impulso poderá ser utilizado para avaliar a função pulmonar em crianças pré escolares com sintomatologia de rinite alérgica.

PALAVRAS-CHAVE: Rinite, Testes de função respiratória, Oscilometria, Criança.

ALLERGIC RHINITIS AND LUNG FUNCTION BY IMPULSE OSCILLOMETRY IN PRESCHOOL CHILDREN

ABSTRACT: Introduction: Among the most prevalent respiratory diseases, allergic rhinitis stands out, responsible for a negative impact on quality of life, including impairment of lung function in affected people. Although allergic rhinitis can develop at any age, it is common in childhood. **Objective:** To assess lung function in children with allergic rhinitis using the impulse oscillometry system. **Methods:** Cross-sectional study with children aged between 3 and 6 years, classified into two groups: allergic rhinitis, composed of children diagnosed with allergic rhinitis, and a comparative group, composed of children without allergic respiratory pathology. The children underwent pulmonary function tests using impulse oscillometry. **Results:** 82 children, 52% female, mean age 4.65 ± 0.25 and height 104.64 ± 5.14 . There was no difference in R5 and X5 in relation to what was predicted between the groups, but the intergroup elastance was greater in the pre- and post-bronchodilator use allergic rhinitis group. The parameters R5, X5 and AX showed differences when the intragroup relationship was verified. **Conclusion:**

The results of the present study demonstrated that preschool children with allergic rhinitis may have impaired lung function due to the associated bronchial involvement. The impulse oscillometry system can be used to assess lung function in preschool children with symptoms of allergic rhinitis.

KEYWORDS: Rhinitis, Respiratory function tests, Oscillometry, Child.

INTRODUÇÃO

A rinite alérgica (RA) é a mais comum das doenças atópicas e pode se desenvolver em qualquer idade¹. Além dos sintomas clássicos de espirros, coriza, prurido e obstrução nasal, a RA é caracterizada pelo comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e, potencialmente por distúrbios do sono, problemas emocionais, dificuldades nas atividades e no convívio social (1). Segundo a iniciativa ARIA (Allergic rhinitis and its impact on asthma) a rinite alérgica pode ser classificada de acordo com sua ocorrência ao longo do tempo em intermitente e persistente e de acordo com a gravidade, em leve ou moderada/grave (2).

Apesar da rinite alérgica ser uma doença de baixa morbidade, o diagnóstico e o tratamento adequados são considerados temas importantes em saúde pública, devido ao alto impacto que ela pode causar na qualidade de vida e também na associação com a asma (3). Por meio de adequado exame clínico é possível detectar os sinais de RA, os quais são decorrentes de disfunção do epitélio, vasos, glândulas e nervos que, devido ao infiltrado de células inflamatórias e mediadores inflamatórios, prejudicam o processo de aquecimento, umidificação e filtração do ar inspirado (4).

Processos inflamatórios nasais e limitação ao fluxo aéreo apresentam relação com a função pulmonar, o que pode provocar alterações na mecânica respiratória e modificações dos volumes pulmonares de forma negativa em pacientes com RA (5). Apesar do diagnóstico da RA ser basicamente clínico, é importante avaliar as repercussões pulmonares. Os testes de função pulmonar são exames importantes para avaliação das patologias respiratórias em adultos e crianças. O Sistema de Oscilometria de impulso (*Impulse Oscillometry System* - IOS), é uma técnica de avaliação da mecânica respiratória que apresenta importantes vantagens em relação aos outros exames, como a espirometria e a plestimografia de corpo inteiro, pela capacidade de diferenciar obstrução em vias aéreas centrais e periféricas, não exigir manobras de expiração forçada e não necessitar de grande cooperação dos indivíduos, pois requer apenas que o paciente respire em volume corrente (6).

Destaca-se a grande dificuldade da avaliação da função pulmonar por meio de exames consagrados, como a espirometria, em crianças e a divulgação de resultados promissores para esse público envolvendo a IOS, especialmente em asmáticos, com uma carência importante de divulgações envolvendo a rinite alérgica. O objetivo do presente estudo foi avaliar os resultados da oscilometria de impulso em crianças portadoras de rinite.

MÉTODOS

Estudo do tipo clínico transversal e analítico realizado nos Serviços de Alergia e Imunologia, de Pneumologia e de Pediatria do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética institucional sob o parecer de número 413.551 e todos os pais e/ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram avaliadas crianças de ambos os sexos, com idade entre 03 e 05 anos, 11 meses e 29 dias separadas em 2 grupos, sendo um grupo com crianças portadoras de rinite alérgica persistente moderada/grave e o grupo de comparação de crianças sem patologia respiratória alérgica. Não foram incluídas crianças com história de doença pulmonar crônica, inclusive asma ou com sintomas de doença respiratória infecciosa atual (menos de trinta dias), crianças com doenças neurológicas ou osteomusculares. Os responsáveis pelas crianças responderam a um questionário padrão do Ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas HC-UFPE com questões sobre sintomatologia respiratória, história pessoal ou familiar de atopia e sobre o ambiente intradomiciliar da criança.

O diagnóstico da rinite alérgica foi dado pelo médico assistente baseado nas orientações da iniciativa ARIA (*Allergic rhinitis and its impact on asthma*)². Todas as crianças do grupo rinite alérgica estavam fazendo uso de corticoterapia nasal. No momento da avaliação, as crianças com diagnóstico de rinite alérgica não apresentavam exacerbação dos sintomas.

Foi realizada a avaliação dos dados antropométricos (peso e altura), utilizando uma balança antropométrica devidamente calibrada. Em seguida, as crianças foram submetidas ao exame de oscilometria de impulso (IOS) (Master Screen IOS, Erich Jaeger®, Alemanha). O exame foi realizado com as crianças sentadas confortavelmente em cadeira com encosto e os pés apoiados, respirando através de bocal descartável e utilizando clipe nasal⁷. Os equipamentos foram calibrados diariamente antes da coleta dos dados, utilizando-se seringa (1L) calibrada.

Na realização do exame, as crianças foram instruídas a colocar a boca bem ajustada em torno do bocal e a respirar normalmente por 40 segundos (realizadas três tomadas para cada indivíduo), pressionando as bochechas com as mãos para minimizar a perda de pressão oscilatória, decorrente da alta complacência das mesmas. O exame foi repetido 15 minutos após o uso do broncodilatador (200mcg de salbutamol) e considerada resposta positiva se houvesse melhora da resistência a 5Hz > 20% em relação ao momento pré broncodilatador. Foram analisados os parâmetros de resistência total (R5Hz), a diferença entre resistência total e central (R5-R20Hz), a reatância a 5Hz (X5Hz) e a área de reatância (AX). Os valores foram comparados inter e intragrupos. A confiabilidade dos dados foi assegurada por medidas repetidas até que se obtivesse uma coerência a 5Hz e a 20Hz de 0,9 (variação entre as medidas menor que 10%) ou até que fossem realizadas um máximo

de cinco repetições, sendo descartado o exame se a confiabilidade do teste não fosse obtida.

O tamanho da amostra foi estimado por meio de estudo piloto em que foi observado algum efeito aparente da rinite alérgica em parâmetros pulmonares da oscilometria de impulso, e foi utilizada equação para estudo observacional⁸. Foi considerado um nível de confiança de 95%, o erro amostral de 5%. O tamanho da amostra calculada foi de 61 crianças no total.

Para a análise, os resultados referentes aos parâmetros estudados foram expressos em variações médias e desvio padrão. Foi construído o banco de dados na planilha eletrônica Microsoft® Excel e exportada para o software SPSS (*Statistical Package for Social Science* – versão 18) para análise. Na comparação entre parâmetros numéricos, aplicamos teste de hipótese unicaudal simples (Mann whitney test entre os grupos e, entre intra grupos, o teste de Wilcoxon. A associação entre as proporções foram realizadas pelos testes qui quadrado ou exato de Fisher. Os valores de p menores ou iguais a 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Participaram do estudo 82 crianças, sendo 52% era do sexo feminino. O grupo foi dividido em grupo rinite alérgica (RA) com 47/82 (57%) crianças e 35/82 (43%) no grupo controle (C) (**Tabela 1**).

	Rinite n=47(57%)	Controle n=35(43%)	Total N=82
Sexo			
Masculino	28 (59,57)	11 (31,42)	39 (47,57)
Feminino	19 (40,43)	24 (68,58)	43 (52,43)
Idade (Média ± Desvio padrão)	4,36±0,91	4,84±1,16	4,65±0,25
Altura (Média±Desvio padrão)	108,27±8,15	101±8,54	104,64±5,14

Tabela 1. Caracterização da amostra (n 82).

Os dados foram expressos como números absolutos (%) e média ± desvio padrão.

A **Tabela 2** apresenta o total de exames alterados em relação ao predito nos parâmetros de resistência e elastância a 5HZ (R5 e X5) em relação ao predito. Embora os valores do parâmetro pré broncodilatador no parâmetro R5 fosse maior no grupo RA (dados não visualizados), não houve diferença em relação ao grupo controle quando comparados com o predito.

	RA (n 47)	C (n 35)	P
R5 Alterado	17(36,17)	10(28,57)	0,530
Normal	30(63,83)	27(71,43)	
X5 Alterado	13(27,6)	04(11,42)	0,044
Normal	34(72,4)	33(88,58)	

Tabela 2. Exames alterados nos grupos Rinite Alérgica (RA) e Controle (C)

Os dados foram expressos como números absolutos(%). Teste qui quadrado e exato de Fisher

A **Tabela 3** descreve os parâmetros pré e pós broncodilatador nos grupos. Antes da utilização do broncodilatador, a elastância (X5) intergrupos foi maior no grupo RA ($p = 0,0056$). No momento pós broncodilatador, os parâmetros X5 e área sob a curva (AX) do grupo RA apresentaram diferença sobre o grupo controle ($p = 0,013$ e $p = 0,015$, respectivamente).

	RA (n 47) Mediana	C (n 35) Mediana	p
Pré BD			
R5	1,06(0,84/1,18)	0,97(0,87/1,16)	0,8990
X5	-0,33(-0,39/-0,28)	-0,28(-0,34/-0,19)	0,0056*
AX	2,88(2,04/3,94)	2,55(2,11/3,66)	0,5700
Pós BD			
R5	0,88(0,78/1,03)	0,82(0,79/0,88)	0,0900
X5	-0,30(-0,34/-0,23)	-0,25(-0,29/-0,20)	0,0130*
AX	1,90(1,33/2,94)	1,59(1,21/1,83)	0,0150*

Tabela 3. Parâmetros da oscilometria pré e pós broncodilatador (n 82).

Mediana (percentil 25-75%). Teste Mann whitney.

Os parâmetros R5, X5 e AX apresentaram diferença quando verificada a relação intragrupo para os grupos RA e C (**Tabela 4**).

RA (n 47)	Pré BD Mediana	Pós BD Mediana	<i>p</i>
R5	1,06(0,84/1,18)	0,88(0,78/1,03)	0,0002
X5	-0,33(-0,39/-0,28)	-0,30(-0,34/-0,23)	0,0007
AX	2,88(2,04/3,94)	1,90(1,33/2,94)	< 0,0001
C (n 35)			
R5	0,97(0,87/1,16)	0,82(0,79/0,88)	< 0,0001
X5	-0,28(-0,34/-0,19)	-0,25(-0,29/-0,20)	0,0071
AX	2,55(2,11/3,66)	1,59(1,21/1,83)	< 0,0001

Tabela 4. Análise intragrupo nos parâmetros de oscilometria nos momentos pré e pós broncodilatador nos grupos Rinite Alérgica e Controle.

Mediana (percentil 25-75%). Teste de wilcoxon.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que crianças com rinite alérgica (RA) e crianças sem queixas respiratórias (C) apresentavam alteração da função pulmonar pelo sistema de oscilometria de impulso, sem diferença estatística entre eles. No entanto, a elastância a 5Hz (X5) foi mais negativa nos momentos antes e após o uso do broncodilatador no grupo RA, bem como a área de reatância (AX) pós broncodilatador apresentou maior valor neste grupo.

A elastância está relacionada à elasticidade do pulmão e a obstrução em vias aéreas periféricas resulta em perda de recuo elástico demonstrado por X5 mais negativo como observado em doenças que reduzem a elasticidade pulmonar (10). Kim et al estudando crianças com RA verificou que esses parâmetros são mais sensíveis na detecção de alterações na função pulmonar que a espirometria (11). Ciprandi et al demonstraram que pacientes com rinite alérgica apresentavam alteração da função pulmonar e isso estava relacionado ao tempo de duração da rinite. Os seus achados reforçam o conceito de que o envolvimento brônquico é frequente no indivíduo com rinite alérgica, mesmo na ausência de sintomas de asma evidentes (12). Yilmaz et al demonstraram relação da rinite alérgica e recuperação prolongada da obstrução brônquica aguda na asma. Observaram que a extensão da inflamação envolvendo vias aéreas superiores e inferiores poderia ser uma das razões para a recuperação prolongada de função pulmonar (13).

Os processos inflamatórios nasais característicos da rinite alérgica podem aumentar a hiperresponsividade brônquica intensificando a inflamação crônica em todo o trato respiratório (14). Há estreita relação entre a RA e distúrbios das vias aéreas inferiores e a rinite alérgica constitui um fator de risco para asma de início precoce (12)

No geral, os pacientes pediátricos com RA apresentam aumento de três a quatro vezes na incidência de asma em comparação com crianças sem RA (10). O controle clínico e funcional do indivíduo portador de asma e rinite alérgica associada não será satisfatório se não houver abordagem diagnóstica e terapêutica adequada para as manifestações das vias aéreas superiores, pois a provocação apenas nasal com antígenos, é capaz de determinar aumento da resposta brônquica a estímulos inespecíficos e redução do calibre dos brônquios com alterações subclínicas na função pulmonar (12,15,18,19).

Neste estudo, evidenciamos que os valores médios dos parâmetros da oscilometria das crianças com rinite alérgica eram mais altos que os das crianças sem patologia respiratória. Tais circunstâncias exigem avaliação precoce e precisa da função pulmonar, com interesse clínico no diagnóstico, monitoramento e tratamento das condições respiratórias (16). Pacientes com rinite alérgica e obstrução brônquica subclínica poderiam se beneficiar do diagnóstico e tratamento precoce. Tal suposição é sustentada por estudo indicando que em um importante número de pacientes com rinite alérgica perene com valores FEF 25-75% reduzidos, tal desordem foi significativamente revertida com o administração de budesonida endonasal por três meses (17).

A utilização do IOS na faixa etária pediátrica é crescente, por se tratar de um método não-invasivo, acurado e que requer colaboração e entendimento mínimo dos pacientes. Entretanto, poucos são os protocolos envolvendo indivíduos com rinite alérgica, sendo necessária realização de novos estudos que discutam o envolvimento das vias aéreas inferiores dos pacientes portadores desta doença, auxiliando com isso, no melhor manejo clínico dos pacientes.

Embora os valores dos parâmetros R5 e AX fossem mais altos e o de X5 fosse mais negativo no momento pré e pós broncodilatador para o grupo RA, foi demonstrado que em ambos os grupos a mediana do momento pós broncodilatador foi menor que no momento pré broncodilatador, embora, apenas uma criança do grupo RA tenha demonstrado resposta ao broncodilatador, no parâmetro X5. A resposta ao broncodilatador foi baixa se considerada a nova orientação da ERS que definiu em artigo recente o nível de diminuição nos parâmetros R5, X5 e AX de 40%, 50% e 80% respectivamente em relação ao momento pré-broncodilatador (18). É provável que ao adotar um ponto de corte superior ao que outros autores publicaram, algumas crianças com função pulmonar anormal poderiam potencialmente negligenciar um acompanhamento adequado (19). A diminuição da função pulmonar na pré-escola observada pelo IOS poderia identificar um subgrupo de crianças com morbidade persistente, indicando a necessidade de um acompanhamento mais cuidadoso durante a infância (19).

Uma limitação encontrada no decorrer da pesquisa foi a dificuldade em recrutar crianças nessa faixa etária com diagnóstico apenas de rinite alérgica, devido à forte relação existente com a asma. Além do que sintomas de quadros respiratórios infecciosos repetitivos de vias aéreas superiores, comuns em pré-escolares, muitas vezes dificultam e

confundem o diagnóstico da rinite por pediatras sendo frequentemente subdiagnosticado ou ignorado retardando o diagnóstico e acompanhamento adequado (2). Outro fator limitante seria a supervalorização do diagnóstico em crianças atendidas em ambulatório especializado, mas tais limitações foram minimizadas pelo diagnóstico médico ter sido baseado nas orientações da iniciativa ARIA (2).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que crianças pré escolares com rinite alérgica podem apresentar comprometimento na função pulmonar, devido ao envolvimento brônquico associado. Estas possíveis implicações são razões para sugerir que pacientes com rinite alérgica, mesmo na ausência de sintomatologia de asma tenham realizada uma avaliação da função pulmonar. Nesse contexto, o sistema de oscilometria de impulso poderá ser utilizado para avaliar a função pulmonar em crianças pré escolares com sintomatologia de rinite alérgica.

REFERÊNCIAS

1. Caimmi D, Marseglia A, Pieri G, Benzo S, Bosa L, Caimmi S. Nose and lungs: one way, one disease. *Italian Journal of Pediatrics*. 2012; 38(60):1-5.
2. Bousquet J, Bachert C, Canonica G et al. Allergic Rhinitis and its impact on asthma in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN* and AllerGen** Allergy. 2008; 63(86):8-160.
3. Bousquet J and the ARIA workshop group. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:147-336.
4. Togias A. Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111:1171-1183.
5. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A, Milanese M, Tosca MA. Airway function and nasal inflammation in seasonal allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(6): 891-896.
6. Smith HJ, Reinhold P, Goldman MD. Forced oscillation technique and impulse oscillometry. *European Respiratory Monograph*. 2005; 31:72-105.
7. Shiotta S, Katoh M, Fujii M, Aoki S, Matsuoka R, Fukuchi Y. Predictive equations and the reliability of the impulse oscillatory system in Japanese adult subjects. *Respirology*. 2005;10 (3):310-315.
8. Arango HG. Bioestatística: teórica e computacional: com banco de dados reais em disco.- 3 ed. - Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
9. Song J , Ha E , Sheen H , im MA , Lee SW , oon JW , Lee SJ , Jung H , Lee S , Ahn JC , Jee HM , Han M. The association of nasal patency ith small airay resistance in children ith allergic and nonallergic rhinitis. *Clin Respir J*. 2018 Jul;12(7):2264-2270.

10. Kim YH, Park HB, Kim MJ, Kim HS, Lee HS, Han YK, Kim KW, Sohn MH, Kim, KE. Fractional Exhaled Nitric Oxide and Impulse Oscillometry in Children With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014; 6(1): 27-32.
11. Ciprandi, G; Cirillo I. The lower airway pathology of rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(5): 1105-1109.
12. Yilmaz O, Bakirtas A, Ertoy Karagol HI, Topal E, Demirsoy MS. Allergic rhinitis can affect the recovery of lung function tests after moderate/severe exacerbation of asthma in children. *Allergy.* 2014; 69 (5): 652-7
13. Campanha S, Freire L, Fontes M. O impacto da asma, da rinite alérgica e da respiração oral na qualidade de vida de crianças e adolescentes. *Rev CEFAC.* 2008; 10(4): 513-519.
14. Camargos P, Rodrigues M, Solé D, Scheinmann P. Asma e rinite alérgica como expressão de uma única doença: um paradigma em construção. *Jornal de Pediatria.* 2002; 78(2): 123-128.
15. Meraz EG, Nazaren H, Ramos CD, Nava P, Diong B, Goldman MD. Analysis of impulse oscillometric measures of lung function and respiratory system model parameters in small airway-impaired and healthy children over a 2-year period. *BioMedical Engineering OnLine.* 2011;10(21):1-21.
16. Saranz RJ, Lozano A, Valero A, Lozano NA, Bovina Martijena MD, Agresta F,
17. Ianiero L, Ponzio MF. Impact of rhinitis on lung function in children and adolescents without asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2016.
18. King GG, Bates J, Berger KI, et al. Technical standards for respiratory oscillometry. *Eur Respir J* 2020;27;55(2).
19. Knihtilä H, Kotaniemi-Syrjänen A, Mika J, et al. Preschool Oscillometry and Lung Function at Adolescence in Asthmatic Children. *Pediatric Pulmonology* (2015)1.50:1205–1213.

CAPÍTULO 9

DENSIDADE DE INCIDÊNCIA DE *Enterobacterales* MULTIRRESISTENTES NA UNIDADE NEONATAL DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL, DE 2010 A 2020

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 20/09/2021

Felipe Crepaldi Duarte

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5120174525592260>

Gerusa Luciana Gomes Magalhães

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7014276892121341>

Thilara Alessandra de Oliveira

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3957439582033876>

Alisson Santana da Silva

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/9700189395478352>

Gabrielle Feijó de Araújo

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/5610689869048048>

Tiago Danelli

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4587719358362310>

Anna Paula Silva Olak

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3490047519761169>

Marsileni Pelisson

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3898886680922621>

Gilselena Kerbauy Lopes

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Enfermagem
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/9970925580784481>

Jaqueline Dario Capobiango

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Pediatria
Londrina - Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4086610920656645>

Eliana Carolina Vespero

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4592425303792522>

RESUMO: Bebês internados em Unidades de Terapia Neonatal são extremamente vulneráveis, muitas vezes prematuros, são submetidos a procedimentos invasivos e, por consequência, apresentam alto risco de desenvolver infecções que podem resultar em morbidade e mortalidade. O uso contínuo, muitas vezes inadequado, de antimicrobianos tem favorecido a seleção de isolados de Bacilos Gram-negativos multirresistentes. O presente estudo teve por objetivo avaliar a tendência epidemiológica de colonização por patógenos da ordem *Enterobacterales*, em recém-nascidos, internados em unidades neonatais, num período de 11 anos. Foram analisados os resultados de culturas de *swab* de vigilância de janeiro de 2010 a dezembro de 2020, obtidos do sistema de informação do laboratório de microbiologia da instituição do estudo (LABHOS®). Durante este período foram admitidos 8.038 recém-nascidos nas unidades neonatais, que corresponderam a 73.580 pacientes/dia. Foram identificados 553 bacilos gram-negativos pertencentes à ordem *Enterobacterales*. As espécies mais frequentes foram *Klebsiella* sp. (50%), *Serratia marcescens* (21%) e *Enterobacter cloacae* (19%). A maioria das *Enterobacterales*, 95%, eram produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), enquanto 5%, de carbapenemases. A densidade de incidência média foi 3,7 *Enterobacterales*/1.000 pacientes-dia, tendo variado de 1,8 a 10,6 durante o período de estudo. Concluímos que a densidade de incidência de colonização por *Enterobacterales* multirresistentes foi elevada nas unidades neonatais, com flutuações, durante o período analisado e que o gênero *Klebsiella* sp., produtor de ESBL, foi o mais frequente.

PALAVRAS-CHAVE: *Enterobacterales*, microrganismo multirresistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*.

INCIDENCE DENSITY OF MULTIRESTANT *Enterobacterales* IN THE NEONATAL UNIT OF A UNIVERSITY HOSPITAL IN THE SOUTHERN BRAZIL, FROM 2010 TO 2020

ABSTRACT: Hospitalized infants in Neonatal Intensive Care are extremely vulnerable, and some are premature, undergo invasive procedures, and, consequently, they have a higher chance to develop infections, resulting in morbidity and mortality. The continuous and inadequate use of antimicrobials has favoured selection of multiresistent Gram-negative bacillus isolates. The objective of this study was to evaluate the epidemiological tendency colonization of pathogens from the *Enterobacterales* order in newborns hospitalized in the neonatal units, on a 11 years period. Swab culture results from january 2010 to december 2020 from the Institution's microbiology laboratory information system (LABHOS@) were analyzed. During this period, 8,038 newborns were admitted at the neonatal units about 73,580 patients/day. 553 *Enterobacterales* Gram-negative bacillus were identified. The most frequent species were *Klebsiella* sp. (50%), *Serratia marcescens* (21%) and *Enterobacter cloacae* (19%). Most *Enterobacterales*, 95%, were extended spectrum betalactamase

(ESBL) producers, and 5% were carbapenemase producers. The incidence density mean was 3.7 *Enterobacterales*/1.000 patients-day, varying from 1.8 to 10.6 during the period. In conclusion, the multiresistant *Enterobacterales* colonization incidence density was elevated in the neonatal units, with fluctuation within the analyzed period, and the ESBL-producing *Klebsiella* sp. genus was the most frequent.

KEYWORDS: *Enterobacterales*, multiresistant microorganism, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*.

1 | INTRODUÇÃO

A disseminação global de bactérias multirresistentes tornou-se uma preocupação urgente na atualidade. O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) identificou bacilos gram-negativos produtores de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases como (WEINER-LASTINGER et al., 2020) ameaças sérias (CDC, 2019).

Além disso, em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou alguns patógenos como prioritários para o desenvolvimento de antimicrobianos. As bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos, incluindo a ordem *Enterobacterales*, e as espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram consideradas como de prioridade crítica (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

Bacilos gram-negativos, em especial os da ordem *Enterobacterales*, representam uma das principais causas de infecções graves em unidades neonatais e a multirresistência a antimicrobianos agrava ainda mais a situação (URZEDO, 2014). *Enterobacterales* produtoras de ESBL ocorrem no mundo todo, tanto em hospitais quanto na comunidade, e têm sido apontadas por diversos autores em infecções em pacientes pediátricos (BULABULA; DRAMOWSKI; MEHTAR, 2019; SANDS et al., 2021; WEINER-LASTINGER et al., 2020).

As infecções invasivas causadas por bacilos Gram-negativos produtores de ESBL estão aumentando e desafiam as possibilidades de tratamento para infecções neonatais por estes microrganismos (CLOCK et al., 2017; DANINO et al., 2018; NORDBERG et al., 2018). Essas infecções são, em grande parte, adquiridas em hospitais e estão associadas a maior mortalidade e maiores custos de saúde (BULABULA; DRAMOWSKI; MEHTAR, 2019; SANDS et al., 2021).

A colonização por *Enterobacterales* produtoras de ESBL tem sido associadas à infecção subsequente em neonatos. Os pacientes em unidades neonatais são particularmente vulneráveis a infecções potencialmente fatais por esses organismos. No ambiente da terapia neonatal, a internação prolongada, o uso extensivo de antimicrobianos e a utilização de procedimentos invasivos, associados à imaturidade do sistema imunológico, constituem fatores de risco para aquisição de microrganismos multirresistentes em bebês recém-nascidos (CLOCK et al., 2017; DANINO et al., 2018; GHADDAR et al., 2020). Uma população singular e especialmente vulnerável aos microrganismos multirresistentes e a

desenvolver infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) é a dos recém-nascidos de baixo peso (HULTÉN et al., 2018; WEINER-LASTINGER et al., 2020).

Considerando que a colonização assintomática geralmente precede a infecção clínica, os pacientes colonizados agem como um reservatório para *Enterobacterales* resistentes a antimicrobianos em ambiente hospitalar, assim, o conhecimento da colonização por estes microrganismos pode fornecer subsídios para intervenções eficazes de controle de infecção para reduzir doenças infecciosas em neonatos. Dessa forma, este estudo teve por objetivo determinar a densidade de incidência de colonização por *Enterobacterales* em recém-nascidos internados em unidades neonatais, num período de 11 anos.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Este foi um estudo retrospectivo, transversal e descritivo, realizado nas unidades neonatais, de terapia intensiva e de cuidados intermediários, de um hospital terciário da rede pública do sul do Brasil. Dos 410 leitos, 20 são destinados ao atendimento intensivo de neonatos. A maioria dos RN internados nestas unidade são provenientes da maternidade do próprio hospital, que é um serviço de referência para o atendimento de gestantes de alto risco. Ao longo do período avaliado, 2010 a 2020, ocorreram 8.038 admissões nas unidades neonatais, correspondendo a 73.580 pacientes-dia.

Foram incluídas no estudo resultados de culturas de *swab* retal para investigação de colonização por microrganismos gram-negativos, da ordem *Enterobacterales*, resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração (ESBL) e resistentes a carbapenêmicos (CRE). Os resultados das culturas foram obtidos do banco de dados do Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS®, do Laboratório de Análises Clínicas (LAC/HU).

Os microrganismos foram identificados previamente por metodologia padronizada por (JORGENSEN et al., 2015) e a sensibilidade a antimicrobianos de acordo com o CLSI. A determinação da produção de (ESBL) foi avaliada pelo método de aproximação de discos e a resistência a carbapenêmicos foi determinada por disco difusão.

A densidade de incidência de colonização foi obtida pela razão entre o número de casos novos e o número de pacientes-dia que estiveram internados nestas unidades, no mesmo período, multiplicando-se por 1.000, de acordo com o setor de estatística hospitalar.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o CAAE número 43013315.8.0000.5231.

3 | RESULTADOS

No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2020 foram admitidos 8.038 recém-nascidos nas unidades neonatais, que corresponderam a 73.580 pacientes/dia. Foram identificados 693 microrganismos multirresistentes colonizando neonatos no período, sendo que 631 (91%) eram bacilos gram-negativos e, destes, 553 pertencentes à ordem *Enterobacterales*.

Como pode ser verificado na figura 1, as espécies mais frequentemente identificadas foram *Klebsiella* sp. (277 – 50%), *Serratia marcescens* (118 – 21%) e *Enterobacter cloacae* (106 – 19%). O mecanismo de resistência mais frequente entre estas bactérias foi a produção das betalactamases. A maioria das *Enterobacterales*, 524 (95%), eram produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL), enquanto 29 (5%) eram produtoras de carbapenemases.

Embora os gêneros *Klebsiella* sp, *S. marcescens* e *E. cloacae* tenham sido os microrganismos multirresistentes mais frequentemente isolados, verifica-se que a distribuição entre os anos não foi uniforme, como pode ser visualizado na figura 2. *Klebsiella* sp. foi prevalente em quase todo período, sendo que os maiores percentuais foram identificados em 2013, 2019 e 2020. Por outro lado, de 2016 a 2017, a maior frequência foi de *S. marcescens* devido a surtos ocorridos por este bacilo nas unidades neonatais neste período.

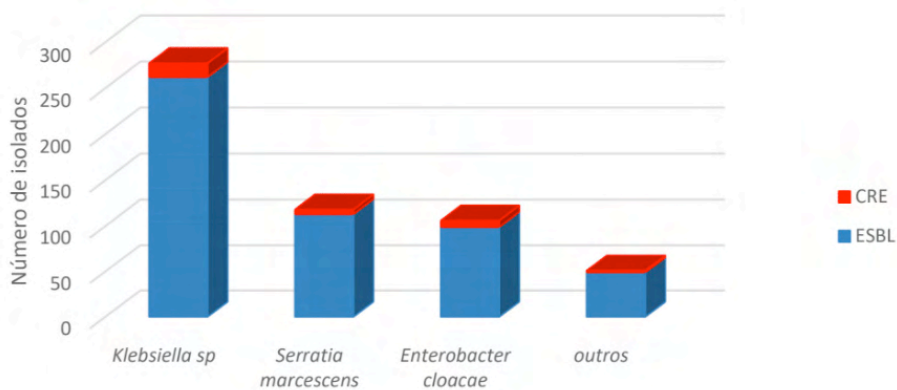


Figura 1 – Frequência dos principais gêneros entre 553 Enterobacterales, isolados de culturas de vigilância para microrganismos multirresistentes, de Neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva de um hospital terciário da região sul do Brasil, entre os anos 2010 e 2020.

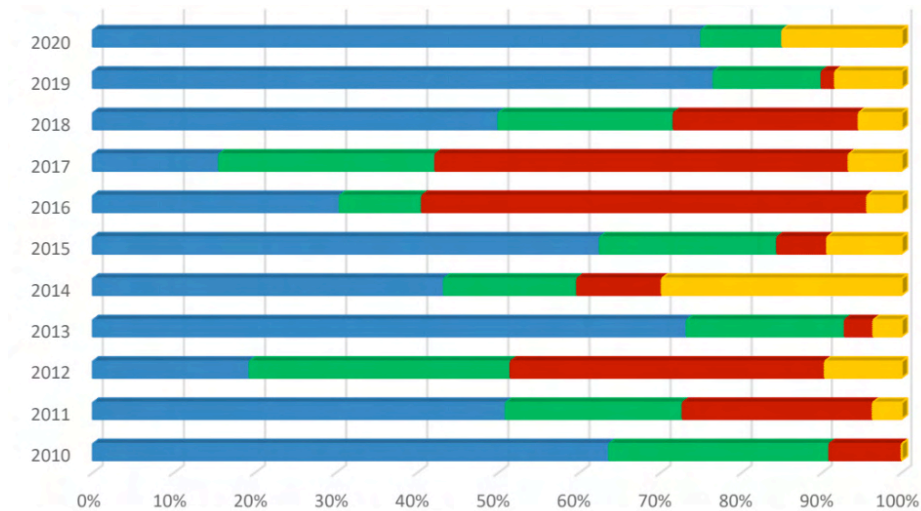


Figura 2 – Percentual de colonização, por *Enterobacterales* multirresistentes, de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva de um hospital terciário da região sul do Brasil, entre os anos 2010 e 2020.

A figura 3 mostra a densidade de incidência de colonização por *Enterobacterales* multirresistentes, ano a ano. Verifica-se que ocorreu uma flutuação nas taxas de isolamento destas bactérias ao longo do período. A densidade de incidência média foi de 6,6 *Enterobacterales* por 1.000 pacientes-dia, tendo apresentado os valores mais baixos em 2010 (1,8) e em 2020 (2,9) e os maiores em 2014 (10,6), 2016 (10,1) e em 2018 (10,2).

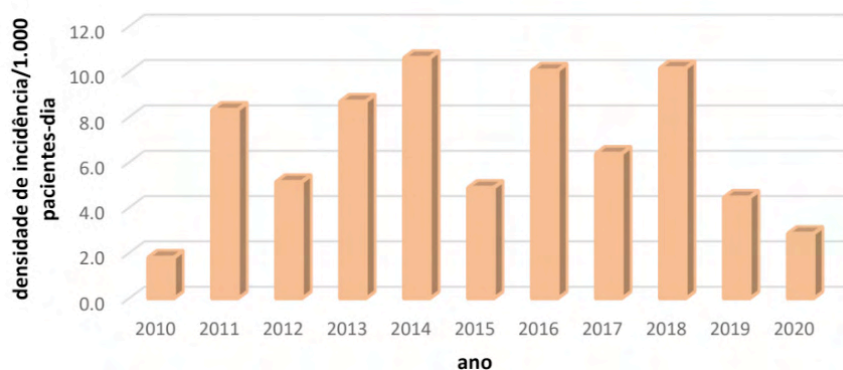


Figura 3 – Percentual de colonização, por *Enterobacterales* multirresistentes, de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva de um hospital terciário da região sul do Brasil, entre os anos 2010 e 2020.

Até o ano 2010 a frequência de colonização por bacilos gram-negativos multirresistentes nas unidades neonatais era baixa porém, a partir deste ano, a identificação

de *Enterobacterales* produtoras de ESBL e de carbapenemases aumentou gradativamente, tornando-se endêmicas. A densidade de incidência de colonização média de *Klebsiella* sp. foi de 3,7, a de *E. cloacae* de 1,4 e a de *S. marcescens* de 1,6/1.000 pacientes-dia. As maiores taxas de incidência para *Klebsiella* sp foram verificada em 2013 (6,4), 2015 (6,3), 2018 (5,1) e 2019 (5,8). Para *S. marcescens* os maiores índices foram verificados em 2016 (5,5) e em 2017 (3,3). *E. cloacae* produtor de ESBL foi o gênero que apresentou as menores taxas de incidência/1.000 pacientes-dia. Os maiores índice não ultrapassaram 2,2 em 2015 e em 2018, como pode ser observado na figura 4.

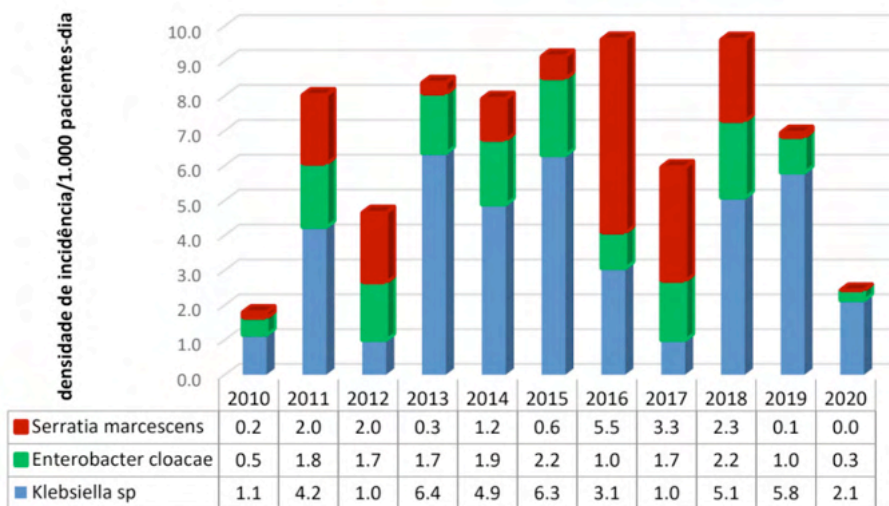


Figura 4 – Densidade de incidência de colonização por *Klebsiella* sp, *E. cloacae* e *S. marcescens* multirresistentes por 1.000 pacientes-dia, de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva de um hospital terciário da região sul do Brasil, entre os anos 2010 e 2020.

4 | DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou uma elevada frequência de colonização de recém-nascidos por *Enterobacterales*, nas unidades neonatais do hospital. A tendência de aumento na densidade de incidência foi impulsionada pela disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL, em especial por *K. pneumoniae*.

Diversos estudos têm evidenciado um aumento na prevalência de bacilos Gram-negativos da ordem *Enterobacterales* colonizando recém-nascidos internados em UTN (OLIVEIRA et al., 2020; ROBERTS et al., 2019).

Dados da Rede Nacional de Segurança da Saúde Americana (*National Healthcare Safety Network – NHSN*), referentes aos anos 2015 a 2017, apontam as bactérias da ordem *Enterobacterales* como os patógenos mais comuns em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), nos Estados Unidos. *S. aureus* foi responsável por 15,4%

das infecções seguido por *E. coli* (12,3%), *K. pneumoniae* (9,3%), *Enterococcus* spp. (8,7%), *Enterobacter* spp. (8,5%) e *P. aeruginosa* (5,8%). No nosso estudo, ao contrário, a frequência foi maior (76%) para as Gram-negativas multirresistentes como *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*, mas bem menor para *E. coli* (WEINER-LASTINGER et al., 2020).

Numa revisão sistemática que incluiu 6.363 neonatos, verificou-se que 1.825 (28,7%) foram colonizados e que 157 (7,9%) desenvolveram infecção de corrente sanguínea por bacilos Gram-negativos. No presente estudo, da mesma forma, a maioria dos microrganismos que colonizaram os RN eram bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de quarta geração (FOLGORI et al., 2018).

O Brasil, os países latino-americanos e outros países em desenvolvimento, em geral, têm níveis mais elevados de resistência bacteriana em comparação com os da Europa e Estados Unidos, especialmente entre *Enterobacterales* produtoras de ESBL (GHADDAR et al., 2020; NORDBERG et al., 2018). *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL positivo isolados a partir de países da América Latina são um problema bem reconhecido, responsável pelas altas taxas de resistência a cefalosporinas de amplo espectro (AKTURK et al., 2016; BEREZIN; SOLÓRZANO, 2014; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Da mesma forma, no Paquistão, num estudo realizado com neonatos saudáveis da comunidade, a colonização por bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL também foi elevada. No entanto, ao contrário do nosso estudo onde os RN foram colonizados preferentemente por *K. pneumoniae*, a espécie mais frequente foi *E. coli* (84%), enquanto *K. pneumoniae* foi identificada em 10% dos isolados e *Enterobacter* spp. em 6%. Uma possível explicação seria o fato de nossos isolados serem de origem hospitalar (SALEEM et al., 2020).

Estudos realizados na Europa têm reportado índices menores de *Enterobacterales* multirresistentes. Na Itália, (GIUFFRÉ et al., 2016) relataram taxas de colonização de 28%. Na Alemanha, numa avaliação retrospectiva conduzida por Haase et al. (2014), verificou-se que 4,9% dos recém-nascidos desenvolveram infecções associadas a algum microrganismo multirresistente. A densidade de incidência de colonização por enterobactérias MR verificada nesse estudo foi de 3,5/1.000 pacientes-dia, no ano 2012, semelhante à identificada em nosso estudo entre 2010 e 2012. Nos anos seguintes, no entanto, a frequência de *Enterobacterales* foi maior com uma tendência de aumento ao longo do período. Embora em taxas menores do que as nossas, em outro estudo alemão as bactérias gram-negativas foram mais frequentes (26%).

O surgimento e disseminação de resistência a carbapenêmicos tem sido evidenciada como uma tendência global e são variáveis de acordo com o local e período de estudo. Roberts et al. (2019) avaliaram 97 recém-nascidos na Tailândia e identificaram resistência em 57% dos *A. baumannii* e 52% das *K. pneumoniae*, índices superiores aos verificados em nossa pesquisa. *K. pneumoniae* produtoras de KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase)

foi relatado pela primeira vez em 2008 em recém-nascidos em Karachi, Paquistão e em 2011, 72% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes aos carbapenems. No presente estudo, os primeiros isolados Enterobacterales resistentes a carbapenem (CRE) foram identificados a partir de 2012, entre elas *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*. No entanto, nossos dados indicam uma frequência menor do que a verificada em outros países.

A utilização de culturas de vigilância em UTN tem sido apontada como intervenção simples na tentativa de conter surtos em diversos estudos (HEINRICH et al., 2011; HUANG, et al., 2002;). A prevenção, segundo Moreira et al. (2011), é o principal recurso para evitar a colonização dessas bactérias em UTN/UCI, já que o tratamento é difícil devido a sua alta resistência a antimicrobianos.

Em conclusão, a densidade de incidência de colonização por *Enterobacterales* multirresistentes era baixa no início do período avaliado mas aumentou gradativamente, com flutuações, ao longo dos anos e que o gênero *Klebsiella* sp., produtor de ESBL, foi o mais frequente. Por esse fato, deve-se atentar ao monitoramento contínuo das unidades neonatais para a identificação de microrganismos e realização de medidas de prevenção e controle de infecções.

REFERÊNCIAS

AKTURK, H. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: Risk factors for progression to infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 134–140, 1 mar. 2016.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 942–953, 13 ago. 2014.

BULABULA, A. N. H.; DRAMOWSKI, A.; MEHTAR, S. Transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from colonized mothers to their infants : a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, n. xxxx, 2019.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 1, p. 1–113, 2019.

CLOCK, S. A. et al. Colonization with antimicrobial-resistant Gram-negative bacilli at neonatal intensive care unit discharge. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 219–226, 2017.

DANINO, D. et al. Mother to Child Transmission of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae. **Journal of Hospital Infection**, 2018.

DE OLIVEIRA, P. M. N. et al. Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–7, 2019.

- FOLGORI, L. et al. The relationship between Gram-negative colonization and bloodstream infections in neonates: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 251–257, 2018.
- GHADDAR, N. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by *Escherichia coli* Colonizing Pregnant Women. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2020, p. 1–7, 23 jan. 2020.
- GIUFFRÉ, M. et al. The increasing challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli: results of a 5-year active surveillance program in a neonatal intensive care unit. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 10, 4 mar. 2016.
- HAASE, R. et al. Colonization and Infection due to Multi-resistant Bacteria in Neonates: A Single Center Analysis. **Klinische Pädiatrie**, v. 226, n. 01, p. 8–12, 28 out. 2014.
- HULTÉN, K. G. et al. Analysis of Invasive Community-Acquired Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections During a Period of Declining Community Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections at a Large Children's Hospital. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 3, p. 235–241, mar. 2018.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.
- NORDBERG, V. et al. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 10–15, 2018.
- ROBERTS, T. et al. Antimicrobial-resistant Gram-negative colonization in infants from a neonatal intensive care unit in Thailand. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 151–155, out. 2019.
- SALEEM, A. F. et al. The Gut of Healthy Infants in the Community as a Reservoir of ESBL and Carbapenemase-Producing Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 286, 27 maio 2020.
- SANDS, K. et al. Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 512–523, 1 abr. 2021.
- WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with pediatric healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 19–30, 25 jan. 2020.
- WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. p. 1–83, 2017.

CAPÍTULO 10

A INFLUÊNCIA DA ORIENTAÇÃO NUTRICIONAL NA DIETA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN

Data de aceite: 01/11/2021

Data da submissão: 08/09/2021

Ingrid da Silva Santos

Graduanda em Nutrição Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Botucatu
Botucatu, São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/9812691539195222>

Amanda Daniel

Nutricionista, Residente em Atenção Clínica
Especializada em Neonatologia
Instituto da Criança do Hospital das Clínicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo
São Paulo, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4983833040998875>

Natália Tonon Domingues

Endocrinologista Pediátrica, Doutoranda
Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina de Botucatu, Departamento de
Pediatria
Botucatu-São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/9124018871932308>

Lidia Raquel de Carvalho

Matemática, Professora Assistente Doutora
Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu
Botucatu-São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/6507858203899415>
ORCID:0000-0003-0575-2263.

Alice Yamashita Prearo

Pediatra, Professora Assistente Doutora
Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina de Botucatu, Departamento de

Pediatria

Botucatu - São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/1108177066681738>

ORCID iD: 0000-0002-4356-0599

Cristina Helena Lima Delambert

Pediatra, Mestranda
Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina de Botucatu, Departamento de
Pediatria
Botucatu, São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/5598394833274130>
ORCID iD:0000-0002-9316-4316

Cátia Regina Branco da Fonseca

Pediatra, Professora Assistente Doutora
Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina de Botucatu, Departamento de
Pediatria
Botucatu, São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/7412061392510911>
ORCID iD: 0000-0001-7067-3209

RESUMO: A alimentação variada e equilibrada é essencial para o crescimento e a saúde de crianças e adolescentes com Síndrome de Down (SD). A adequada orientação nutricional será capaz de promover uma dieta balanceada e individualizada, beneficiando a nutrição, o crescimento e o desenvolvimento destes. Assim, objetivando avaliar a adequação da dieta e o estado nutricional, de crianças e adolescentes com SD em seguimento ambulatorial em um serviço de saúde, com intuito de melhorar a sua qualidade de vida através das orientações nutricionais, um estudo clinico transversal foi desenvolvido entre agosto de 2019 a junho de

2021, incluindo todos os pacientes com SD em seguimento no Serviço ambulatorial de Pediatria Genética de um hospital universitário. Foram aplicados recordatório diário (R24) e de frequência alimentar (QFA) e, realizada avaliação antropométrica, com classificação em curvas específicas para os que tem SD. O Programa de Apoio a Nutrição – NutWin foi usado para o cálculo da ingestão calórica, de macro e micronutrientes, considerando-se a recomendação de ingestão da Dietary Reference Intakes. Os resultados obtidos das 53 crianças e adolescentes com média de idade de 55,2 meses, mostram tempo de aleitamento materno exclusivo e o tempo total de aleitamento materno, respectivamente $3,8\pm 3,1$ meses e $8,7\pm 10,7$ meses e, um atraso no início da dieta sólida. A maioria dos incluídos apresentou peso e estatura adequados para a idade, 72,9% e 92,5% respectivamente e, segundo o Índice de Massa Corporal 69,8% estavam eutróficos. Evidenciamos que o consumo de alimentos “in natura” foi comum entre as crianças e adolescentes. Concluimos que a orientação nutricional em uma proposta de seguimento integral e individualizado às crianças e adolescentes com SD é fundamental para a obtenção de hábitos alimentares saudáveis e para o seu adequado estado nutricional.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome de Down, Criança, Adolescente, Educação Alimentar e Nutricional, Dieta.

THE INFLUENCE OF NUTRITIONAL GUIDANCE ON THE DIET OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DOWN SYNDROME

ABSTRACT: The varied and balanced diet is essential for the growth and maintenance of health of children and adolescents with Down Syndrome (DS). Adequate nutritional guidance will be able to promote a balanced and individualized diet, benefiting their nutrition, growth and development. Thus, aiming to assess the adequacy of the diet, and the nutritional status, of children and adolescents with DS, in outpatient follow-up at a health service, in order to improve their quality of life through nutritional guidelines, a cross-sectional clinical study was carried out in August from 2019 to June 2021, including all DS patients followed up at the Pediatric Genetics outpatient service of a university hospital. Daily recall (R24) and food frequency (FFQ) were applied, and an anthropometric assessment was performed, with classification on specific curves for those with DS. The Nutrition Support Program – NutWin was used to calculate the caloric, macro and micronutrient intake, considering the intake recommendation of the Dietary Reference Intakes. The results obtained from 53 children and adolescents with a mean age of 55.2 months show exclusive breastfeeding time and total breastfeeding time, respectively 3.8 ± 3.1 months and 8.7 ± 10.7 months and, a delay in starting the solid diet. Most of those included had adequate weight and height for their age, 72.9% and 92.5% respectively and, according to the Body Mass Index, 69.8% were eutrophic. We evidence that the consumption of fresh food was common among children and adolescents. We conclude that nutritional guidance in a proposal for comprehensive and individualized follow-up to children and adolescents with DS is essential for obtaining healthy eating habits and for their adequate nutritional status.

KEYWORDS: Down syndrome, Child, Adolescent, Food and Nutrition Education, Diet.

1 | INTRODUÇÃO

Descrita pela primeira vez pelo médico John Langdon Down, a síndrome de Down (SD) apresentou avanços através de pesquisas genéticas, em meados do século XX, com o médico francês Jerome Lejeune, que identificou tratar-se de uma alteração cromossômica causada pela presença de um cromossomo adicional no par 21 em 95% dos casos, o que justificou a nomeação de síndrome de Down (SD) ou Trissomia 21. Atualmente sabe-se que há 5% dos casos da SD decorrentes de translocação no cromossomo 14 ou por mosaïcismo nas células (WUO, 2007; SBP,2020; NDSS,2020).

A alimentação variada e equilibrada é essencial para o crescimento e a manutenção da saúde das crianças e adolescentes com a SD. E, aprender a comer de forma saudável desde os primeiros anos é fundamental e, pode trazer resultados importantes para os que tem a SD, pois com a hipotonia que apresentam como característica logo ao nascimento, há uma propensão a menor atividade e a menor gasto energético, levando à uma tendência à obesidade ao longo da vida (AQUINO, 2016, SANCHOTENE,2020). Também há maior incidência de constipação intestinal crônica nestas crianças. As alterações metabólicas e genéticas presentes nos que tem SD, propiciam o estresse oxidativo celular, por formação de radicais livres e, por conseguinte contribuem para o envelhecimento precoce. Portanto, uma adequada orientação nutricional desde os primeiros anos de vida promovendo uma dieta balanceada e individualizada para os que têm a SD promoverão inúmeros benefícios à saúde e à nutrição destes (SBP,2020, SAGHAZADEH et al.,2017).

O leite materno é sempre o melhor alimento para o bebê e, entre as suas várias qualidades e funções está também a de prevenir a obesidade. Para as crianças com a SD o aleitamento materno será capaz de promover o consumo recomendado em zinco e selênio, antioxidantes que fortalecem o sistema imunológico, além de ser sempre a melhor fonte de vitaminas e outros micronutrientes (AQUINO, 2016, MUSTACHI et al.,2017).

As recomendações mais recentes para a ingestão de macro e micronutrientes foram estabelecidas pela Food and Nutrition Board (2002), estipulando as DRI (Dietary Reference Intakes) de acordo com idade e sexo, sem, no entanto, haver especificidade para os que tem a síndrome de Down. A alimentação variada e equilibrada é essencial para o crescimento e a manutenção da saúde das crianças e adolescentes com a SD. Aprender a comer de forma saudável desde os primeiros anos é fundamental e, pode trazer resultados importantes para os que tem a SD, pois estes, apresentam hipotonia ao nascimento, assim, com uma tendência a menor atividade e a menor gasto energético, levando à uma tendência à obesidade ao longo da vida (AQUINO, 2016, SANCHOTENE,2020), sendo a maior incidência de constipação intestinal crônica nestas crianças, também, característica da síndrome. As alterações metabólicas e genéticas presentes nos que tem SD, propiciam o estresse oxidativo celular, por formação de radicais livres e, por conseguinte contribuem para o envelhecimento precoce. Portanto, uma adequada orientação nutricional desde

os primeiros anos de vida promovendo uma dieta balanceada e individualizada para os que tem a SD promoverão inúmeros benefícios à saúde e à nutrição destes (SBP,2020, SAGHAZADEH et al.,2017).

O leite materno é sempre o melhor alimento para o bebê e, entre as suas várias qualidades e funções está também a de prevenir a obesidade. Para as crianças com a SD o aleitamento materno será capaz de promover o consumo recomendado em zinco e selênio, antioxidantes que fortalecem o sistema imunológico, além de ser sempre a melhor fonte de vitaminas e outros micronutrientes (AQUINO, 2016, MUSTACHI et al.,2017).

As recomendações mais recentes para a ingestão de macro e micronutrientes foram estabelecidas pela Food and Nutrition Board (2002), estipulando as DRI (Dietary Reference Intakes) de acordo com idade e sexo, sem, no entanto, haver especificidade para os que tem a síndrome de Down.

Uma das formas de obter informações sobre a dieta é a utilização do recordatório de 24horas (R24), que quantifica o consumo alimentar por meio de uma entrevista conduzida por um profissional capacitado (WILLETT, 1998). É um método que descreve uma grande variedade de alimentos, e pode ser utilizado para a comparação da média da ingestão de vários nutrientes e energia de diferentes populações (BUZZARD, 1998, GIBSON, 2005), tendo como vantagens sua aplicação rápida, capaz de promover a lembrança recente da ingestão alimentar e de sua fácil aplicabilidade e, de não propiciar alteração no comportamento alimentar (BUZZARD, 1998; VILLAR, 2001). Os dados obtidos são quantificados em macro e micronutrientes através de um programa de apoio nutricional – NutWin (ANÇÃO et al., 2016). Este programa apoia, através dos resultados dos nutrientes ingeridos a elaboração dos planos alimentares individualizados.

Para uma adequada orientação nutricional, a análise da frequência de consumo de determinados alimentos é importante, pois alimentos consumidos em excesso ou em falta podem comprometer a qualidade da dieta e a saúde da criança e dos adolescentes, assim o questionário de frequência alimentar –QFA, pode ser um grande aliado para esta finalidade (FISBERG et al., 2009, PALMA et al., 2009). O QFA é comumente utilizado em investigações epidemiológicas e permite obter estimativas da ingestão usual (MOREIRA; CHIARELLO, 2008).

Em janeiro de 2009 foi publicada a Portaria nº 81 instituindo no âmbito do SUS a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica, mas a Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) não divulgou as medidas necessárias para a plena implantação desta Política. Assim, há ainda uma lacuna muito grande no atendimento aos que tem afecções congênitas e genéticas no Brasil (RASKIN,2010), e comprovadamente a estruturação destes serviços é fundamental para o adequado crescimento e desenvolvimento destas crianças.

Assim, descreveremos aqui um estudo que objetivou avaliar a adequação da dieta e o estado nutricional, de crianças e adolescentes com SD em seguimento ambulatorial em um serviço de saúde, com intuito de melhorar a sua qualidade de vida através das

orientações nutricionais específicas.

2 | METODOLOGIA

O estudo foi realizado no serviço de Pediatria Genética do Hospital das Clínicas de Botucatu (HCBo), hospital universitário da Faculdade de Medicina de Botucatu, no interior do Estado de São Paulo, com ambulatório referenciado para a assistência, e produz pesquisas e conhecimentos voltados para crianças e adolescentes com SD e, que consta de equipe multiprofissional, incluindo pediatras, assistente social, psicólogo e nutricionista. O serviço de Pediatria Genética do HCBo foi iniciado em 2008 e estruturado efetivamente a partir do ano de 2016.

Trata-se de um estudo clínico transversal com crianças e adolescentes com SD de um ano de idade até 15 anos incompletos¹. Os dados foram coletados de agosto de 2019 a junho de 2021 de todos os pacientes com SD que se consultaram no Ambulatório de Puericultura Genética do HCBo. Os pacientes foram incluídos na pesquisa após a explicação da proposta e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo responsável, caso fosse um adolescente entre 12 a 17 anos, 11 meses e 29 dias e, com capacidade de entendimento, o Termo de Assentimento também era assinado por ele.

O protocolo de coleta aplicado constava de dados de nascimento, patologias, informações sobre a mastigação, a deglutição, alergias e preferências alimentares. Foram também aplicados o R24 e o QFA e, realizada avaliação antropométrica.

A aferição do peso corporal e estatura, utilizou-se balança digital antropométrica, com capacidade de até 150kg e precisão de até 100g e com divisão de 0,5 cm. E, o comprimento foi aferido com régua antropométrica pediátrica. O diagnóstico nutricional foi realizado através do software PedZ com os padrões de referência das curvas do Center for Diseases Control, considerando “Down syndrome” (ZEMEL et al., 2015), segundo sexo e idade, calculado através do software PedZ (www.pedz.de).

O recordatório de 24h de dois dias anteriores a consulta foi aplicado, contendo um dia típico e um dia de final de semana. Para o cálculo do consumo alimentar diário será utilizada a média do consumo alimentar dos dois dias referidos, com o uso de utensílios caseiros para alimentos (copos, xícaras, colheres) para evitar divergências entre a quantidade ingerida e a referida.

O cálculo da ingestão calórica, de macronutrientes e micronutrientes foi realizado através do Programa de Apoio a Nutrição – NutWin (ANÇÃO et al., 2016) e os resultados obtidos foram comparados com a recomendação de ingestão presente nas Dietary Reference Intakes (DRIs), preconizadas pelo National Research Council (2002). A taxa

¹ Os dados apresentados neste artigo são parte dos dados do projeto de Iniciação científica “Avaliação do consumo alimentar e da ingesta de nutrientes de crianças e adolescentes com Síndrome de Down: estudo caso-controle”, com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo: 2019/11656-0.

metabólica basal de cada incluído na pesquisa foi calculada segundo faixa etária e sexo de acordo com as equações propostas pela FAO/OMS/ONU (1985) - citada por Carvalho et al. (2012)- e comparada com a ingestão calórica.

Considerou-se como uma dieta com quantidade adequada de carboidratos aquela que fornecesse entre 45 e 65% do total de energia ingerida diariamente para as crianças a partir de um ano. Para as proteínas, a distribuição o consumo foi considerado adequado quando estava entre cinco e 20% das calorias para crianças de um a três anos de idade e de 10 a 30% para as maiores. Em relação aos lipídeos, a ingestão foi tida como adequada quando correspondia de 30 a 40% do total de calorias para as crianças de um a três anos e de 25 a 35% para as maiores (BONOTTO et al., 2012).

A ingestão de calorias, carboidrato, proteína, lipídio, zinco, cálcio, ferro, vitamina A, C, B9 e B12 foi avaliada e classificada como insuficiente, adequada ou excessiva, considerando a quantidade adequada quando havia uma variação de até 10% da recomendação (BARBOSA et al., 2007).

O QFA foi dividido em duas partes, a primeira referente ao consumo diário de frutas ou suco de frutas; legumes e hortaliças; carnes e ovos e, a segunda referente ao consumo semanal de arroz e feijão; doces; salgados (lanches, pizza, coxinha, pastel, entre outros) e, bebidas açucaradas.

Após todas as análises do R24 e do QFA, uma proposta de adequação nutricional foi elaborada, e individualmente conversada com os responsáveis pela criança ou adolescente, na consulta subsequente, ou pelo telefone (devido a pandemia COVID-19). Promovendo assim uma orientação nutricional a partir da dieta analisada.

Para análise estatística dos dados coletados, foram realizadas a análise de variância, e para comparações múltiplas entre as médias foi realizado o teste de Tukey, foram utilizados os testes t de Student e do qui-quadrado, considerando significância se $p < 0,05$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), conforme Resolução 466/12-CNS-MS (BRASIL,2012), com nº CAAE: 62014216.0.0000.5411/2017.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos 53 crianças e adolescentes, sendo 43,4% do sexo feminino (n=23) e 56,6% do sexo masculino (n=30). A média de idade foi de 55,2 meses (quatro anos e seis meses), a variação de idade foi de um até 14 ano, sendo, portanto, 86,8% crianças de 13,2% adolescentes, conforme a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1986).

O tempo gestacional médio foi $36,9 \pm 2,2$ sendo 21 pacientes prematuros (39,6%). A maioria dos incluídos na pesquisa apresentou peso normal ao nascer (50,9%).

Como esperado entre os que tem SD, neste estudo apresentaram hipotireoidismo 43,4% dos incluídos, sendo 9,4% hipotireoidismo subclínico e, 32,0% apresentaram doença cardíaca ao nascimento. Estas são as comorbidades mais frequentes nesta população, e que corroboram a necessidade de um seguimento regular e, com equipe multiprofissional (SBP,2020; NDSS,2020).

Quanto ao tempo de aleitamento materno exclusivo (AME) e o tempo total de aleitamento materno, a média, em meses, foi respectivamente $3,8\pm 3,1$ e $8,7\pm 10,7$ (tabela 1). Evidenciando dados inferiores aos recomendados pela OMS.

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo (AME) até os seis meses de idade e como complemento até 24 meses ou mais, uma vez que os benefícios do aleitamento tanto para o bebê quanto para a mãe são muitos (SANTOS et al., 2019). Apesar de melhorias na duração do aleitamento no mundo, em países de baixa e média renda apenas 37% dos lactentes com menos de seis meses de idade são amamentados exclusivamente e, em países da América Latina e do Caribe as taxas de AME mostram valores variados em análises (de 7,8% a 68,3%, respectivamente) (MOREIRA et al., 2019).

Uma revisão de literatura com artigos originais publicados de 2015 a 2019 realizados no Brasil mostrou que prevalência de AME em crianças com até seis meses é baixa e que a duração média de AME foi, em muitos estudos, de quatro meses (GENIO et al., 2020), semelhante à encontrada em nosso estudo entre as crianças com a SD.

A idade média, em meses, da introdução de outros alimentos pastosos para as crianças com SD foi $6,6\pm 6$, enquanto que na introdução de alimentos sólidos foi $14,4\pm 12$ (tabela 1). Estes resultados mostram uma introdução mais tardia em relação ao recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL,2021) no Guia alimentar para crianças brasileiras menores de dois anos. Nos primeiros anos de vida é possível notar que as habilidades alimentares das crianças com a SD são atrasadas, quando comparadas às demais crianças. Podendo apresentar dificuldades na coordenação de sucção, deglutição e respiração. Além disso, alguns fatores físicos também dificultam o processo de alimentação como a, hipotonia orofacial e dificuldade de mastigação, pequena cavidade oral, protrusão lingual, mandíbulas pequenas, dentição tardia ou inadequada assim como a congestão nasal, frequentes nestas crianças (SILVA, SILVA e SOUZA, 2017; SBP, 2020).

Variável	Média (meses)	Mediana (meses)	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
AME*	3,8	4,0	3,1	0	12
ALM**	8,7	6,0	10,7	0	48
Introdução dieta pastosa	6,6	6,0	2,2	4,0	14
Introdução alimentos sólidos	14,4	12,0	8,3	7,0	36,0

Tabela 1. Tempo de aleitamento e idade de introdução dos novos alimentos, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

*AME: Aleitamento Materno Exclusivo; **ALM: Aleitamento Materno.

A introdução progressiva de alimentos na dieta do lactente é essencial para que suas necessidades nutricionais sejam atendidas. É de suma importância considerar, na oferta da alimentação complementar, a variedade nos tipos de alimentos, em tempo oportuno e com variada frequência de oferta; relacionar a consistência das preparações com a idade do lactente, pois fatores como a mastigação, deglutição e ingestão, são influenciados no avanço da consistência dos alimentos ofertados. Segundo Santos et al. (2019), numa vertente mais tradicional da oferta de alimentos complementares, dos seis aos oito meses as preparações devem ser em forma de papas ou purês e após os oito meses os mesmos alimentos que a família consome podem ser oferecidos à criança, porém devem ser desfiados, cortados em pequenos pedaços ou amassados. Os alimentos nunca devem ser liquidificados, exceto no caso de sucos.

Os hábitos alimentares saudáveis devem ser incentivados desde a infância e, havendo possibilidade, introduzidos à rotina familiar. A atenção alimentar deve ser precoce para evitar o ganho de peso excessivo e adequar à alimentação em função das possíveis doenças associadas nas crianças com SD (SBP, 2020).

Analisando a classificação nutricional, verificamos que a maioria dos incluídos apresentou peso e estatura adequados para a idade, 72,9% e 92,5% respectivamente (gráficos 1 e 2); segundo o Índice de Massa Corporal (IMC), 69,8% estavam eutróficos (gráfico 3).

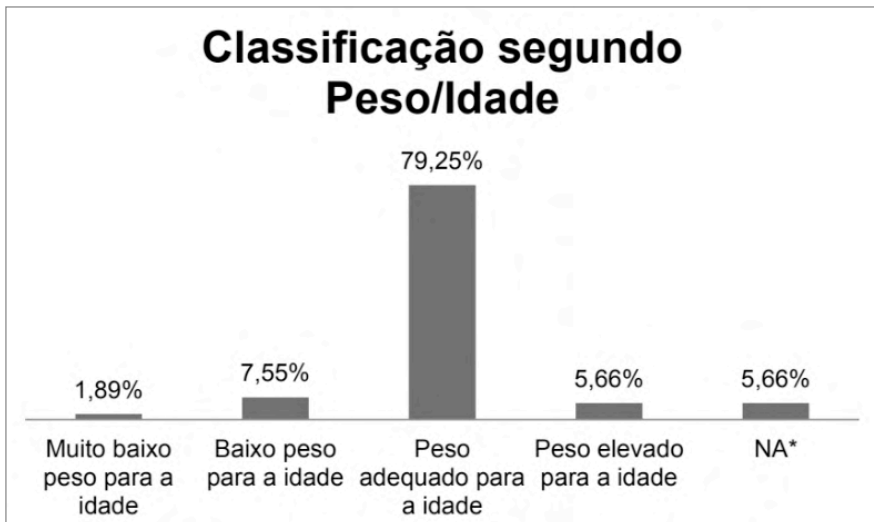


Gráfico 1. Distribuição percentual da classificação quanto ao peso para a idade, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

NA*: A variável não é considerada para adolescentes.

Podemos considerar relevante para estes resultados: primeiro, a adequada classificação nutricional, com o uso de curvas específicas para os que tem SD na prática clínica, uma vez que são tendência da SD o baixo peso nos primeiros meses de vida e sobrepeso nas demais etapas do desenvolvimento (SBP,2020); e, segundo o adequado seguimento destas crianças desde o seu nascimento, bem como um calendário de consultas regulares, com pediatras e outros especialistas, uma vez que estas crianças podem apresentar malformações cardíacas, com frequência, e hipotireoidismo, que precisam ser adequadamente acompanhados e tratados se necessário (NDSS,2020; SBP,2020), podendo alterar seu perfil nutricional e, por último, os estudos e orientações nutricionais individualizados realizados pela equipe do serviço de Pediatria Genética, que vem ocorrendo desde 2016, com a presença de estudantes do curso de nutrição, bem como com o apoio de nutricionistas do serviço.

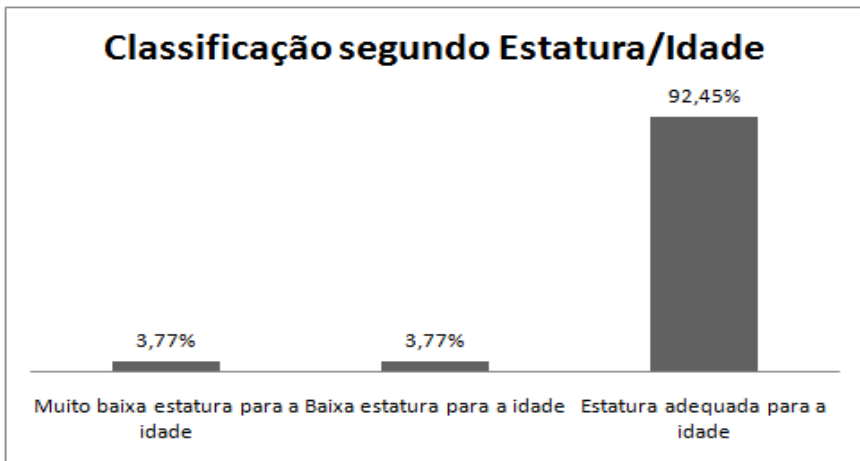


Gráfico 2. Distribuição percentual da classificação quanto à estatura para a idade, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

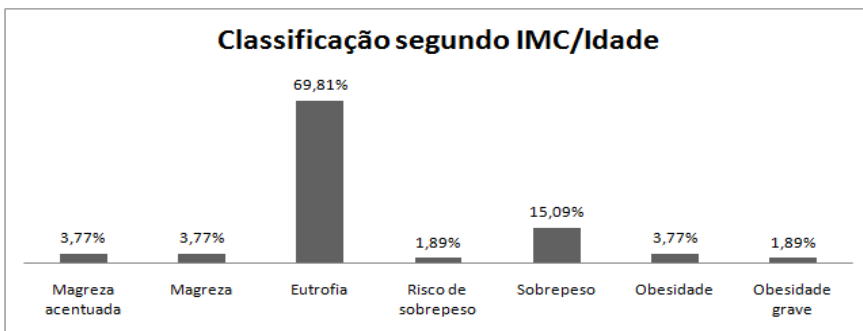


Gráfico 3. Distribuição percentual da classificação segundo IMC, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

O consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos, mostrado na tabela 2, indica a porcentagem média referente à ingestão calórica total dos pacientes incluídos na pesquisa. A porcentagem média do grupo estudado encontra-se dentro da referência usada e já citada no trabalho (BONOTTO et al., 2012).

Variável	Média	Mediana	Desvio-padrão
Carboidratos	63,5%	54,7%	63,3
Proteínas	21,8%	18,4%	24,5
Lipídios	29,6%	27,8%	11,9

Tabela 2. Distribuição da média do consumo diário de carboidrato, proteína e lipídeos, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

A tabela 3 mostra a porcentagem de crianças e adolescentes que apresentaram

ingestão adequada de calorias (quando compara a taxa metabólica basal, segundo sexo e idade) e a adequação da proporção dos macronutrientes, em relação à ingestão energética.

Nutriente	Adequação		Média	Mínimo	Máximo
	%	N			
Calorias	45,3	24	1682 kcal	295,62 kcal	1833,43 kcal
Carboidrato	98,1	52	54,82%	39%	66,2%
Proteína	98,1	52	18,33%	10,56%	25,35%
Lipídio	84,9	45	27,36%	15,28%	39,03%

Tabela 3. Distribuição percentual da adequada ingestão, ingestão média e valores mínimo e máximo encontrados de calorias e macronutrientes, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

A tabela 4 mostra que uma baixa porcentagem de adequação, abaixo de 60%, para as calorias e Cálcio, sendo adequada para a maioria das crianças e adolescentes do estudo em macro e micronutrientes.

Nutriente	Adequação	
	%	N
Fibra alimentar	90,6	48
Zinco	98,1	52
Ferro	96,2	51
Cálcio	50,9	27
Vitamina A	73,6	39
Vitamina C	77,4	41
Ácido fólico (Vit.B9)	84,9	49
Vitamina B12	96,2	51

Tabela 4. Distribuição percentual da adequada ingestão de fibra alimentar e micronutrientes, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

A ingestão de zinco, adequada em 98,1% das crianças e adolescentes. A importância do zinco para os que tem a SD destaca-se pelo fato de que esse mineral está envolvido como um cofator da desidrase tipo II, uma das enzimas que regulam a conversão da tiroxina em triiodotironina, um hormônio que regulador da função tireoidiana e que na SD apresenta-se desregulado na maioria das vezes. Além disso, o estado nutricional alterado desse mineral contribui para a ocorrência de distúrbios clínicos com influências negativas no estresse oxidativo e no sistema imunológico, e a deficiência desse mineral pode levar,

entre outras coisas, ao retardo do crescimento, imaturidade sexual do esqueleto e distúrbios neuropsiquiátricos (Sandri et al., 2020).

Segundo ao QFA, a maioria das crianças e adolescentes apresentou consumo diário de fruta ou suco de fruta, legumes e verduras, carnes e ovos de 1 a 2 vezes por dia e, consumo de leite e derivados na maioria dos indivíduos foi maior que 2 vezes por dia para 52,8% dos incluídos (tabela 4).

A frequente e adequada ingestão dietética de legumes, frutas e hortaliças através do método que utilizamos, semelhante ao estudo realizado em outro município do interior de São Paulo, entre crianças e adolescentes de cinco a 18 anos, avaliando também os aspectos dietéticos destas (Ribeiro et al., 2019).

A despeito da elevada frequência de crianças e adolescentes com diagnóstico de eutrofia em nosso estudo, foi verificado alto consumo de alimentos ricos em carboidratos simples e consumo adequado de frutas, legumes e verduras diariamente (tabela 4).

Alimento	Não consome ou consome <1x/dia	1 a 2x/dia	Mais que 2x dia
	N(%)	N(%)	N(%)
Fruta ou suco de fruta	2 (3,8)	29 (54,7)	22 (41,6)
Legumes e verduras	10 (18,8)	40 (75,5)	3 (5,7)
Carnes e ovos	4 (7,5)	48 (89,6)	1 (1,9)
Leite e derivados	1 (1,9)	24 (45,3)	28 (52,8)

Tabela 4. Frequência do consumo diário de fruta ou suco de fruta; legumes e verduras; carnes e ovos; leite e derivados, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

Segundo o QFA, o consumo semanal de arroz e feijão foi frequente para quase a totalidade dos incluídos (89,9%) e, o consumo de doces do grupo foi mais comum de uma a três vezes por semana (52,9%). A maioria dos indivíduos não consome ou come menos de uma vez por semana salgados e bebidas açucaradas (tabela 5). Estes dados demonstram novamente uma boa orientação alimentar para estas crianças e adolescentes em seguimento neste serviço de saúde, bem estruturado para a sua assistência e com equipe multiprofissional, composta com profissionais da nutrição atuando nele desde 2016.

Alimento	Não consome ou consome <1x/semana	1 a 3x/semana	4 a 6x/semana	Diariamente
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Arroz e feijão	1 (1,9)	7 (13,2)	8 (15,1)	37 (69,8)
Doces	23 (43,4)	28 (52,9)	1 (1,9)	1 (1,9)
Salgados	36 (67,9)	17(32,1)	0(0,0)	0(0,0)
Bebidas açucaradas	28 (52,8)	13 (24,5)	2 (3,8)	10 (18,9)

Tabela 5. Frequência do consumo de arroz, feijão, doces, salgados e bebidas açucaradas, crianças e adolescentes com a SD, Botucatu/SP, 2019-21 (n=53).

Mudanças nos padrões alimentares ocorreram nas últimas décadas. Houve um aumento notável no consumo de bebidas açucaradas, como refrigerantes e sucos artificiais. Tais bebidas vêm sendo apontadas como contribuintes para o aumento calórico das dietas (VEGA et al., 2015), além de serem fontes de corantes e conservantes, também prejudiciais à saúde. O uso de corantes em alimentos é motivo de polêmica; geralmente a utilização tem como finalidade tornar o produto mais atrativo esteticamente. Além disso, estudos já mostram a ocorrência de reações adversas a curto e longo prazo, decorrente do consumo de alimentos que possuem esses aditivos. A população infantil constitui o grupo mais vulnerável em relação às reações adversas aos aditivos. Isso é decorrente da quantidade ingerida ser maior, em relação ao peso corporal, na criança do que no adulto. Outro ponto importante é o fato das crianças se encontrarem em um período de alto metabolismo e desenvolvimento de suas defesas naturais e não apresentam capacidade de autocontrole no consumo de alimentos ricos em aditivos (SCHUMANN et al., 2008).

Evidenciamos que o consumo de alimentos “in natura” foi comum entre as crianças e adolescentes, diferente do que tem sido encontrado como frequente na população brasileira nos últimos anos com a substituição de uma alimentação caseira e natural por alimentos industrializados (ROCHA; EDGES, 2019). A disponibilidade de produtos prontos para o consumo cresceu entre indivíduos de todos os níveis de renda, devido ao aumento dos produtos ultraprocessados, também presente em nosso estudo, o que não deveria ser, uma vez que Segundo o Guia alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2014) a ingestão desses alimentos deve ser evitada.

4 | CONCLUSÕES

A manutenção do aleitamento materno exclusivo e complementar conforme as recomendações da OMS, em benefício à adequada alimentação infantil, continua sendo um desafio na nutrição infantil.

As crianças com SD apresentam fatores que podem levar ao atraso na introdução

da alimentação complementar, sendo relevante no seu seguimento a estimulação e acompanhamento a fim de minimizar o impacto nutricional que isto pode causar.

O uso de curvas de crescimento apropriadas para a classificação nutricional dos que tem a SD são importantes na prática clínica, aliado às orientações regulares e direcionadas aos conteúdos de suas dietas.

Uma adequada orientação nutricional, juntamente com políticas públicas de nutrição no país devem se concentrar na redução do consumo de alimentos ultraprocessados, com excessos de calorias e pobre em micronutrientes.

A orientação nutricional em uma proposta de seguimento integral e individualizado às crianças e adolescentes com SD é fundamental para a obtenção de hábitos alimentares saudáveis e para o seu adequado estado nutricional.

5 | REFERÊNCIAS

Anção MS, Cuppari L, Draibe SA, Sigulem D. **Programa de apoio à nutrição NutWin. Version 1.5 software [on-line]**. São Paulo: Departamento de Informática em Saúde, Unifesp/EPM; Last Update: 2016 July 1 [citado em 1 nov 2020]. Disponível em: <https://www2.unifesp.br/dis/produtos/nutwin/index.htm>.

Aquino C. **Pesquisas sobre síndrome de Down no mundo**. Disponível em: <<http://www.movimentodown.org.br/2013/01/pesquisas-sobre-sindrome-de-down-no-mundo/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

Aquino C. **Alimentação de crianças com síndrome de Down**. Disponível em: <<http://www.movimentodown.org.br/2013/02/alimentacao-de-criancas-com-sindrome-de-down/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 156 p. :il.

Brasil. Ministério da Saúde. **Guia Alimentar para crianças brasileiras menos de dois anos**. Ministério da Saúde. Brasília-DF, 2021.

Buzzard M. **24-hours dietary recall and food record methods**. In: Willett WC. Nutritional Epidemiology. 2nd.ed. Oxford: Oxford University Press; 1998. p.50-73.

Carvalho FG, Monteiro BA, Goulart-de-Andrade DE, Brónzi ES, Oliveira MRQ. **Método de avaliação de necessidades nutricionais e consumo de energia em humanos**. Rev. Simbio-Logias, V.5, n.7, Dez/2012.

Fiesberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. **Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica**. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 53/5, 2009.

Genio CA, Marques JM, Machado JF. **A Introdução da Alimentação Complementar no Brasil**. Revista Multidisciplinar da Saúde (RMS), v. 2, n.01, ano 2020, p. 65-79, 2020.

Gibson RS. **Principles of nutritional assessment**. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2005.

Moreira EAM, Chiarello PG. **Inquéritos para avaliação do consumo alimentar: aplicabilidade na prática clínica. Nutrição e Metabolismo – Atenção dietoterápica em adultos**, capítulo 3, 2008.

Moreira LCQM, Oliveira EB, Lopes LHK, Bauleo ME, Sarno F. **Introdução de alimentos complementares em lactentes**. Publicação Oficial do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo 17(3):1-6, 2019.

Mustacchi Z, Salmona P, Mustacchi R. **Trissomia 21 (Síndrome de Down): nutrição, educação e saúde**. São Paulo: Memnon; 2017.

National Down Syndrome Society. Down syndrome [on-line]. New York: NSDD; 2020 [citado em 1 nov 2020]. Disponível em: <https://www.ndss.org/about-down-syndrome/down-syndrome/>

Palma D, Escrivão MAMS, Oliveira FLC. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Nutrição clínica na infância e na adolescência**. Editora Manole, 2009.

Perondi C, Sandri G, Machado C, Tonel D, Roversi K, Souza LGT, et al. **Blood zinc levels and oxidative stress parameters in children and adolescents with Down Syndrome**. J Syndromes [on-line]. 2018 [citado em 20 fev 2021]; 4 (1) : 1-6. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324824903_Blood_Zinc_Levels_and_Oxidative_Stress_Parameters_in_Children_and_Adolescents_with_Down_Syndrome.

Raskin S. **Raras e subdiagnosticadas: um dia para as raras**. Gazeta do Povo [Internet]. 3 Mar 2010 [citado 28 Abr 2020]. Disponível em: <https://www.gazetadopovo.com.br/opinio/artigos/raras-e-subdiagnosticadas-bfmoddv6waoovtu5u3ruqtse/>.

Ribeiro MSP, Neves TS, Balmant BD. **Estado Nutricional, percentual de gordura e aspectos dietéticos de crianças e adolescentes com síndrome de Down**. Colloq. Vitae, jan-abr; 11(1): 7-16, 2019.

Rocha TN, Edges BI. **Consumo de alimentos industrializados e estado nutricional de escolares**. Revista Perspectivas Online: Biológicas & Saúde. Vol.9, nº 29, p.21-32, 2019.

Sadri G, Perondi C, Muller DA, Benvegnú DM. **Síndrome de Down e suplementação com zinco: uma revisão sistemática**. Rev. Saúde e Biol., v.15, n.3, p.75-81, set./dez., 2020.

Saghazadeh A, Mahmoudi M, Ashkezari AD, Rezaie NO, Rezaei N. Systematic review and meta-analysis shows a specific micronutrient profile in people with Down Syndrome: lower blood calcium, selenium and zinc, higher red blood cell copper and zinc, and higher salivar calcium and sodium. PLoS One. 2017; 12 (4) : e0175437. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175437>.

Sanchotene I, Bergmann G. Obesidade em crianças com síndrome de Down. SIEPE [on-line]. 2020 [citado em 20 fev 2021]; 11 (1). Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/87288>.

Santos AM, Vieira RM, Silva TKR, Mazur CE, Schwarz K, Silva CC, Vieira DG. **Alimentação complementar: práticas e orientações Nutricionais de profissionais da saúde**. Saúde (Santa Maria), Vol. 45, n. 1, p. 1-15, janeiro/abril, 2019.

Santos EM, Silva LS, Rodrigues BFS, Amorim TMAX, Silva CS, Borba JMC, Tavares FCLP. **Avaliação do aleitamento materno em crianças até dois anos assistidas na atenção básica do Recife, Pernambuco, Brasil.** Ciênc. saúde colet. 24 (3) Mar, 2019.

Schumann SP A, Polônio MLT, Gonçalves ECBA. **Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares.** Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.28 n°3, Campinas July/Sept, 2008.

Silva JCA, Silva RCC, Sousa FCA. **A importância da alimentação em pessoas com síndrome de Down – uma revisão.** Reon. Facema. Jul-Set; 3(3):636-641, 2017.

Sociedade Brasileira de Pediatria. Diretrizes de atenção à pessoa com Síndrome de Down. São Paulo: Departamento Científico de Genética; 2020. 24 p.

Vega JB, Problacion AP, Taddei JA. **Fatores associados ao consumo de bebidas açucaradas entre pré-escolares brasileiros: inquérito nacional de 2006.** Ciênc. saúde coletiva [online], vol.20, n.8, pp.2371-2380, 2015.

VILLAR, B.S. **Desenvolvimento e validação de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar para adolescentes.** São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2001.

World Health Organization. Young people's health - a challenge for society: report of a WHO Study Group on Young People and Health for All [on-line]. Geneva: WHO; 1986 [citado em 20 fev 2021]. (Technical Report Series 731). Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41720>.

Willet WC. **Food frequency methods.** In: Willett WC. Nutritional Epidemiology. New York: Oxford University Press 1998.

Zemel BS, Papanicolaou M, Stallings VA, Hall W, Schadt K, Freedman DS, et al. Growth charts for children with Down syndrome in the United States. Pediatrics. 2015; 136 (5): e1204-11. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2015-1652>.

CAPÍTULO 11

POTENCIAL PATOGENICO E TIPAGEM MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES ISOLADAS EM VÁRIOS PAÍSES

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 25/10/2021

André Pitondo da Silva

Programas de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental e Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3539676071345227>

Mariana de Oliveira-Silva

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8479644236012424>

Rafael Nakamura da Silva

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4336488005201804>

Miguel Augusto de Moraes

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7628471267237369>

Rafael da Silva Goulart

Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9260128265599923>

Amanda Kamyla Ferreira da Silva

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2629562933213153>

Gisele Peirano

Departamento de Patologia e Laboratório de Medicina, Universidade de Calgary
Calgary, AB, Canada
<http://lattes.cnpq.br/2864400393347593>

Johann DD Pitout

Departamento de Patologia e Laboratório de Medicina, Universidade de Calgary
Calgary, AB, Canada
<https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Johann-D-D-Pitout-16009351>

Resumo: *Klebsiella pneumoniae* é responsável por grande parte das infecções hospitalares, sendo um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Este estudo investigou a patogenicidade de 65 *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamase, isoladas de casos clínicos e infecções nosocomiais nos cinco continentes. Foram utilizadas diferentes técnicas fenotípicas e moleculares para investigar a susceptibilidade aos antimicrobianos, fatores de virulência e realizar a tipagem molecular, investigando a prevalência e disseminação mundial de clones epidêmicos com essas características. A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão, o fenótipo de hiper mucoviscosidade foi investigado pelo teste *string*. A detecção dos genes de virulência foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR), a caracterização epidemiológica dos isolados foi realizada pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Dos 65 isolados, 52% (n = 34) foram classificados como multirresistentes (MDR) e 51% (n = 33) apresentaram o fenótipo de hiper mucoviscosidade. Os genes de virulência encontrados em 83,33% (n = 54) dos isolados foram *entB*, *mrkD*, *fimH*, *ycfM*, *kpN* e *mrkA*. As análises de MLST demonstraram a presença de 29 STs diferentes, dos quais ST4672, ST4673 e ST4674 foram descritos pela primeira vez neste estudo. A maioria dos STs (26) encontrados pertence ao grupo clonal 258 (CG258) que é associado a bactérias multirresistentes.

PALAVRAS-CHAVE: *K. pneumoniae*, patogenicidade, multirresistência antimicrobianos, epidemiologia molecular.

PATHOGENIC POTENTIAL AND MOLECULAR TYPING OF *Klebsiella pneumoniae* STRAINS PRODUCING β -LACTAMASES ISOLATED IN SEVERAL COUNTRIES

ABSTRACT: *Klebsiella pneumoniae* is responsible for a large part of hospital infections, being one of the main public health problems worldwide. This study investigated the pathogenicity of 65 β -lactamase-producing *K. pneumoniae* isolated from clinical cases and nosocomial infections on five continents. Different phenotypic and molecular techniques were used to investigate antimicrobial susceptibility, virulence factors and perform molecular typing, investigating the worldwide prevalence and spread of epidemic clones with these characteristics. The antimicrobial susceptibility was performed by the disk-diffusion method, the hypermucoviscosity phenotype was investigated by string test. The detection of virulence genes was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR), the epidemiological characterization of the isolates was performed by the Multilocus Sequence Typing (MLST). Among the 65 isolates, 52% (n = 34) were classified as multiresistant (MDR) and 51% (n = 33) presented the hypermucoviscosity phenotype. The virulence genes found in 83.33% (n = 54) of the isolates were *entB*, *mrkD*, *fimH*, *ycfM*, *kpN* and *mrkA*. MLST analyzes demonstrated the presence of 29 different STs, of which ST4672, ST4673 and ST4674 were described for the first time in this study. Most STs (26) found belong to clonal group 258 (CG258) which is associated with multi-resistant bacteria.

KEYWORDS: *K. pneumoniae*, virulence, antimicrobials, multidrug resistance, molecular epidemiology.

1 | INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, com formato de bacilo que está entre os mais importantes patógenos causadores de infecções dentro e fora do ambiente hospitalar, especialmente, entre indivíduos imunocomprometidos. *K. pneumoniae* é um dos patógenos infecciosos mais preocupantes e disseminados em hospitais. Os problemas clínicos causados por *K. pneumoniae* podem levar a graves complicações, incluindo infecções do trato urinário, pneumonia, septicemia e morte (HUANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2020).

O perfil de patogenicidade de *K. pneumoniae* deve-se a vários fatores de virulência

que permitem superar a resposta imunológica do hospedeiro e causar infecções. Dentre esses vários fatores, destacam-se: presença de cápsula, hiper mucoviscosidade, lipopolissacarídeos, adesinas, sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) e formação de biofilmes (YU *et al.*, 2007). Além disso, embora *K. pneumoniae* seja geralmente descrito como microrganismo não hemolítico, a detecção e determinação do efeito hemolítico de certos isolados têm sido relatados (ALBESA *et al.*, 1985, SEKOWSKA *et al.*, 2006).

A cápsula está entre os fatores de virulência mais importantes para a patogenicidade de *K. pneumoniae* e existem pelo menos 78 sorotipos de polissacarídeo capsular caracterizados para a espécie. Porém, os sorotipos K1 e K2 estão particularmente associados a cepas mais virulentas (PAN *et al.*, 2008). Algumas cepas *K. pneumoniae* produzem uma hipercápsula que é um exopolissacarídeo mucoviscoso que reveste a bactéria mais robustamente do que a cápsula comum e são chamadas de *K. pneumoniae* hiper mucoides (hmKp) (LIU *et al.*, 2017). Existem cepas hmKp que abrigam vários genes de virulência e são denominadas hipervirulentas (hvKP) e estas cepas têm sido cada vez mais reportadas e têm despertado preocupação, pois podem causar infecções sérias adquiridas inclusive em indivíduos da comunidade. As hvKP possuem potencial para infecções em indivíduos saudáveis, progredindo para abscessos hepáticos, endoftalmite, meningites e bacteremia, estando associadas a altas taxas de mortalidade (TURTON *et al.*, 2008, SHON *et al.*, 2013, CAMPOS *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2021).

O surgimento de múltiplas resistências a antibióticos associadas aos inúmeros fatores de virulência de *K. pneumoniae* é um problema global e sua identificação precoce é primordial, principalmente, para o controle de infecções hospitalares (ELLEM *et al.*, 2011). Os beta-lactâmicos compreendem a classe de antibióticos mais utilizados no combate a infecções bacterianas, devido à sua elevada eficácia e baixa toxicidade para o homem. Pertencem à classe dos beta-lactâmicos, as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY *et al.*, 2013). Desse modo, as bactérias produtoras de enzimas β -lactamases, que têm a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico, são muito preocupantes do ponto de vista clínico.

O objetivo do estudo foi investigar o potencial patogênico e caracterizar os clones de 65 *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases provenientes de países dos cinco continentes, incluindo o Brasil e Canadá (Américas); Holanda (Europa); África do Sul (África), Índia (Ásia) e Nova Zelândia (Oceania).

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleção bacteriana

Neste estudo foram analisadas 65 *K. pneumoniae* isoladas de casos clínicos e infecções hospitalares, de países dos cinco continentes incluindo Brasil e Canadá (América); Holanda (Europa); África do Sul (África), Índia (Ásia) e Nova Zelândia (Oceania).

As espécies isoladas fora do Brasil, foram previamente estudadas quanto à resistência aos antimicrobianos e apresentam as mais diversas β -lactamases incluindo carbapenemases e metalo- β -lactamases, dentre elas: NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) e OXA-48 (Oxacillinases) (PEIRANO *et al.*, 2011; PEIRANO *et al.*, 2012a; PEIRANO *et al.*, 2012b; DAUTZENBERG *et al.*, 2014; FREEMAN *et al.*, 2014).

Todos os isolados foram identificados, inicialmente pelo sistema automatizado de identificação Vitek 2 (Biomérieux) e, confirmadas pelo método de *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF MS) usando o equipamento MALDI-TOF VITEK MS (bio Mérieux, Inc., Durham, NC), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2 Teste de susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados por disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (Oxoid) de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Foram testados 36 diferentes antibióticos diferentes, distribuídos em 11 classes de antimicrobianos (Figura 1).

Com base nos resultados de susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados foram classificados como susceptíveis (S) ou multirresistentes (MDR), de acordo com Magiorakos *et al.* (2012).

2.3 Fenótipo de hiper mucoviscosidade

O fenótipo de hiper mucoviscosidade (Hm) foi investigado pelo teste *string* conforme descrito por Wiskur *et al.* (2008). Os isolados foram inoculados em placas de Ágar Muller-Hinton (MH) e incubadas por 18 h à 37 °C. Posteriormente, com auxílio de uma alça bacteriológica, uma colônia isolada de cada cepa foi tocada e levantada verticalmente para checagem do fenótipo Hm. O fenótipo Hm foi considerado positivo quando houve a formação de um filamento de muco igual ou maior que 5 mm (WISKUR *et al.*, 2008).

2.4 Detecção de genes de virulência

Foram investigados 24 genes de virulência por PCR 24 diferentes, sendo eles: *allS*, *magA*, *kfu*, *rmpA*, *entB*, *iutA*, *mrkD*, *k2A*, *ybtS*, *fimH*, *ycfm*, *ecpA*, *kpN*, *irp-1*, *irp-2*, *aerobactin2*, *fimA*, *fyuA*, *cnf-1*, *iroN*, *traT*, *hly-A*, *mrkA* e também o antígeno capsular *wzi*.

Os primers e protocolos utilizados nas reações de PCR seguiram as referências descritas pelos respectivos autores Alcántar-Curiel *et al.* (2013), Ma *et al.* (2005), Yu *et al.* (2008), Fertas-Aissani *et al.* (2012), Sahly *et al.* (2008), Mamlouk *et al.* (2006) e Schubert *et al.* (2000).

Um amplicon de cada gene detectado foi aleatoriamente selecionado e sequenciado

utilizando o sequenciador ABI 3500XL GeneticAnalyser (Applied Biosystems), para confirmação da identidade.

As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para comparação com sequências homólogas depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

2.5 Tipagem capsular

O gene *wzi* foi amplificado e sequenciado para todos os isolados, utilizando *primers* descritos por Brisse *et al.* (2013) e analisados pelo esquema estabelecido no Instituto Pasteur *K. pneumoniae* BIGSdb database (<http://bigsdb.pasteur.fr/>). Com base no sequenciamento, para cada cepa foi atribuída a um *locus* de síntese capsular (K-loci; KL), quando disponível no banco de dados. (K-loci; KL). Sorotipos K2 foram confirmados por PCR e sequenciamento (YU *et al.*, 2007).

2.6 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Todos os isolados deste estudo foram caracterizados por MLST utilizando o protocolo 2 do banco de dados de MLST para *K. pneumoniae* (<https://bigsdb.pasteur.fr/>) para determinação dos Tipos de Sequência (do inglês *Sequence types* - STs). A determinação das relações clonais e epidemiológicas, bem como a formação de Grupos Clonais (GCs), foi realizada com o auxílio do programa goeBURSTv3 (FEIL *et al.*, 2004), disponível online (<http://eburst.mlst.net/>).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo analisou 65 *K. pneumoniae* isoladas de casos clínicos e de pacientes internados em hospitais de diferentes países, provenientes de fontes distintas, incluindo sangue, urina, escarro (Tabela 1). Alguns isolados foram previamente estudados com relação aos genes de resistência (PEIRANO *et al.*, 2011; PEIRANO *et al.*, 2012; PEIRANO *et al.*, 2012; DAUTZENBERG *et al.*, 2014; FREEMAN *et al.*, 2014), sendo o objetivo principal deste estudo, caracterizar o potencial patogênico destes isolados e avaliar suas relações clonais. No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi observado uma elevada quantidade de isolados MDR, sendo 46,15% (n=30). Os isolados foram classificados como não-susceptíveis (resistência e resistência intermediária) a 83% (n=54) dos antibióticos testados, apresentando os maiores índices para a classe dos inibidores da via de folato: sulfonamida (100%, n=64), sulfametazol+trimetoprim (95%, n=61) e trimetoprim (89%, n=57), seguidos das cefalosporinas: cefaclor 79% (n=51), cefalotina (79%, n=51) e cefazolina (78%, n=50) e, por fim, a nitrofurantoína com não-susceptibilidade a 92% (n=59) dos isolados. Todos os isolados foram susceptíveis ao doripenem (Figura 1).

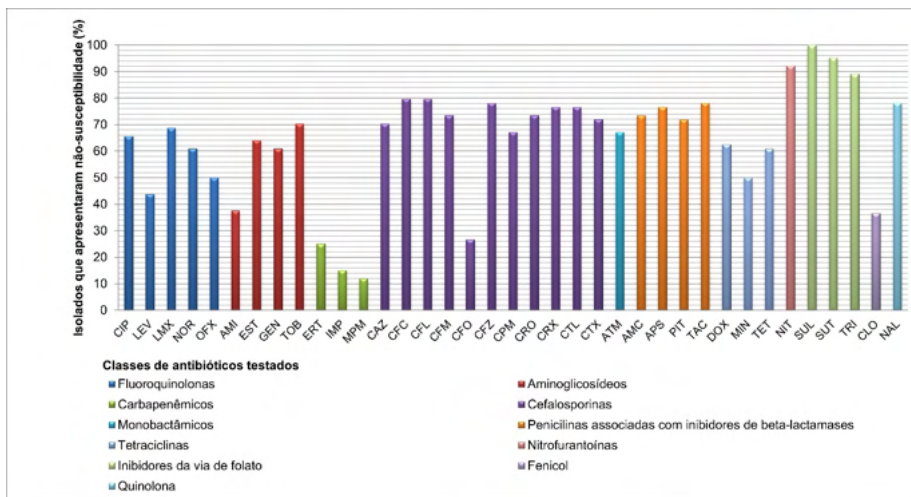


Figura 1 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (%) dos 65 isolados *K. pneumoniae* estudados.

Gráfico de teste de antibiograma mostrando frequência de não-susceptibilidade encontrada nos 65 isolados de *K. pneumoniae* estudados. Antimicrobianos testados: ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), lemovloxacina (LMX), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX), amicacina (AMI), estreptomina (EST), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), ertapenem (ERT), imipenem (IMP), meropenem (MPM), ceftazidima (CAZ), cefaclor (CFC), cefalotina (CFL), cefixima (CFM), cefoxitina (CFO), ceftazolidina (CAZ), cefepima (CFM), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CRX), ceftarolína (CTL), aztreonam (ATM), amoxicilina+clavulanato (AMC), ampicilina+sulbactam (APS), piperacilina+tazobactam (PIT), ticarcilina+clavulanato (TAC), doxiciclina (DOX), minociclina (MIN), tetraciclina (TET), nitrofurantoina (NIT), sulfonamida (SUL), sulfametazol+trimetoprim (SUT), trimetoprim (TRI), cloranfenicol (CLO), ácido nalidixico (NAL).

Sotgiu *et al.* (2018) apontam que infecções por *K. pneumoniae* MDR (KP-MDR) são responsáveis pelo aumento em 50% de riscos de mortalidade por bacteremias, choque séptico e uso inadequado de antibioticoterapias. Além disso, a identificação de pacientes infectados com KP-MDR ainda é um desafio para a clínica, uma vez que muitos desses pacientes são pré-colonizados com cepas MDR (GORRIE *et al.*, 2017). Em um estudo realizado no Brasil por Azevedo *et al.* (2019), foram analisados 48 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de exames de urina de pacientes não hospitalizados, foi constatado que 60,4% dos isolados eram MDR, indicando a dispersão de cepas KP-MDR na comunidade.

Aproximadamente a metade dos isolados (50,76%, n=33) apresentaram o fenotípico de hiper mucoviscosidade. Em um estudo realizado por Cortés *et al.* (2002) em modelos murinos, foi demonstrado que os animais infectados por cepas de *K. pneumoniae* não capsuladas não desenvolveram pneumonia ou bacteremia, enquanto os infectados com cepas modificadas para superexpressar a cápsula, desenvolveram pneumonia e bacteremia. A expressão da cápsula pode ser aumentada em resposta aos estímulos externos como, por exemplo, por concentrações aumentadas de glicose. Por outro lado, altas concentrações de ferro extracelular resultam na regulação negativa da produção de cápsulas (PACZOSA e MECSAS, 2016).

A síntese da cápsula em *K. pneumoniae* está relacionada a um conjunto de genes, incluindo o gene *wzi*. As diferentes variantes de polissacarídeos compõem as capsulas são chamadas de antígenos. Atualmente, o sequenciamento dos genes *wzi* se tornou a principal metodologia para realizar a tipagem capsular de *K. pneumoniae* e mais de 130 variantes já foram identificadas (CHOBY *et al.*, 2019; WYRES *et al.*, 2016). Neste estudo, foram identificados 21 alelos *wzi*, sendo os alelos *wzi-651*, *wzi-652*, *wzi-653* e *wzi-654* descritos pela primeira vez neste estudo (Tabela 1). Além disso, oito alelos foram associados a K sorotipos: *wzi-84-K28*, *wzi-50- K15/K17/K50/K51/K52*, *wzi-105-K47*, *wzi-24-K24*, *wzi-64-K14/K64*, *wzi-2/K2*, *wzi-39-K39*, *wzi-27/K27*. Segundo Catalan-Najera *et al.* (2017), o sorotipo K2 está dentre os oito K-tipos considerados mais patogênicos e têm sido mais comumente identificados nas Américas e na Europa, esse sorotipo foi encontrado na cepa KBr1 (*wzi-K2/KL2KL30*) (Tabela 1).

Os genes de virulência detectados nos 65 isolados de *K. pneumoniae* foram *fimH* (98,46%, n=64), *mrkA* (89,06%, n=57), *mrkD* (88,88% , n=33), *kpN* (87,50%, n=56), *entB* (83,33%, n=30), *ycfM* (72,3%, n=47), *fimA* (32,81%, n=21), *irp-1* (21,87%, n=14), *fyuA* (20,31%, n=13), *ecpA* (20,31%, n=13), *kfu* (15,38%, n=10), *ybtS* (12,3%, n=17), *irp-2* (1,53%, n=1), *aerobactin 2- iroN* (1,53%, n=1), K2 (1,53%, n=1) e *hlyA* (1,53%, n=1). Somente sete genes de virulência não foram detectados nos isolados estudados, sendo eles: *allS*, *magA*, *rmpA*, *iutA*, *cnf-1*, *iroN* e *traT*. Tais resultados indicam um alto potencial patogênico entre os isolados. No entanto, nenhuma cepa foi classificada como hipervirulenta, pois não apresentaram os principais marcadores moleculares característicos destas cepas que incluem *iroB*, *iucA*, *peg-344*, *rmpA*, *and rmpA2* e *irp-2*, encontrados nos plasmídeos pLVPK (RUSSO *et al.*, 2018; RUSSO e MARR, 2019).

A tipagem molecular por MLST demonstrou que foram encontrados 29 STs distintos nos isolados estudados, sendo três deles descritos pela primeira vez nesse estudo: ST4674 (isolado Kpw 10), ST4673 (Kpw 12) e ST4672 (K2) (Tabela 1). Com a tipagem por MLST, foi possível identificar que o isolado Kpw10 que apresentou o novo ST4674, pertence a outra espécie do gênero *Klebsiella*, a *K. quasipneumoniae*. Dentre os STs já descritos, os que apresentaram maior frequência entre os isolados analisados foram ST48, ST1087, ST573, ST20, ST17, ST147, ST11, ST395 e ST327 pertencente ao grupo clonal 258 (CG258) (Figura 2).

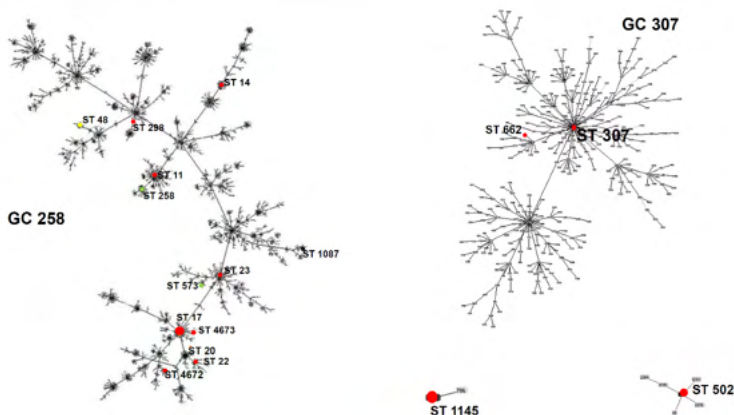


Figura 2 – Grupos clonais (GC) determinados por goEburst e respectivos *sequence types* (STs) encontrados entre os isolados de *K. pneumoniae* do estudo.

Fonte: autores.

O ST11 e o ST48, pertencentes ao GC258, estão se disseminando com facilidade em diversas partes do mundo e são associados à *K pneumoniae* produtoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Ambos os STs 11 e 48 pertencem ao GC258, que é reconhecido por possuir clones classificados de alto risco de disseminação, uma vez que produtores de carbapenemases. Clones pertencentes ao GC258 tiveram os primeiros relatos nos anos 2000 e, desde então, houve uma rápida dispersão por diversas partes do mundo (PITOUT *et al.*,2015).

Dos 65 isolados caracterizados no atual estudo, 43 (33,84%) são produtoras de β -lactamases, apresentaram alto potencial patogênico a maioria pertencente ao GC258. Gu *et al.* (2019) descreveram KpHv produtoras de carbapenemases pertencentes ao ST11 dispersadas em ala hospitalar, apontando o iminente ameaça à saúde humana, uma vez que esses isolados são simultaneamente resistentes aos antimicrobianos e carregam muitos genes de virulência, com alto potencial de disseminação.

4 | CONCLUSÃO

Os resultados do estudo mostram alto potencial de patogênico nos isolados de *K pneumoniae* produtores de β -lactamases distribuídos nos cinco continentes do globo. Além do potencial patogênico, esses isolados são multirresistentes e pertencem, em sua grande maioria, ao GC258, um grupo clonal conhecido por possuir clones com alto potencial de disseminação e, por consequência, alto risco à saúde pública mundial. Portanto, uma rápida identificação de clones multirresistentes e potencialmente patogênicos de *K. pneumoniae* pela combinação de técnicas fenotípicas moleculares é de suma importância para o controle

da disseminação desses isolados em ambientes hospitalares e na comunidade.

ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo recebeu aprovação ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brasil), aprovação no. CEP / FCFRP 362; CAEE 36031914.9.0000.5403.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP [Processo N°. 2013/22581-5]. M.O.S, R.N.S e R.S.G são doutorandos com bolsas financiadas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), portanto, este estudo foi parcialmente financiado pela CAPES [processo nº 88887.601821/2021-00, 88882.365161/2019-01 e 88887.493929/2020-00, respectivamente].

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às equipes do Instituto Pasteur pela curadoria e manutenção dos bancos de MLST e tipagem capsular, disponíveis em <http://bigsd.b.pasteur.fr/>.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não possuírem conflitos de interesse

Isolado	País	Data de Isolamento	Origem	Class.	Antígeno Capsular		β-lactamases	Virulência	Hm	ST
					Alelo	Sorotipo KL				
1	Kpw 1 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	167	KL124	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE} <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	48
2	Kpw 2 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	33	KL64	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	+	20
3	Kpw 3 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	33	KL64	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE}	<i>entB</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	+	20
4	Kpw 4 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	167	KL124	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	+	48
5	Kpw 5 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	364	KL132	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE}	<i>entB</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>mrkA</i> ,	+	1087
6	Kpw 6 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	+	18
7	Kpw 7 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	33	KL64	<i>bla</i> _{OXA-1-LIKE} , <i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{GIM}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	+	20
8	Kpw 8 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{CTXM-8}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	2654
9	Kpw 9 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	167	KL124	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	+	48
10	Kpw 10 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	653	ND	<i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>kfu</i> , <i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>aero2</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	4674
11	Kpw 11 Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	33	KL64	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	17

12	Kpw 12	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i>	+	4673
13	Kpw 13	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i>	-	17
14	Kpw 14	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i>	-	17
15	Kpw 15	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	364	KL132	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>mrkA</i>	+	1087
16	Kpw 16	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	364	KL132	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>mrkA</i>	+	1087
17	Kpw 17	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	167	KL124	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	+	48
18	Kpw 18	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	654	ND	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>mrkA</i>	+	1087
19	Kpw 19	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	364	KL132	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	+	1087
20	Kpw 20	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>hly-A</i> , <i>mrkA</i>	+	17
21	Kpw 21	Auckland, Nova Zelândia (Oceania)	2009-2011	Sangue	MDR	167	KL124	<i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	-	48
22	Kpw 22	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	343	KL109	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	+	573
23	Kpw 23	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	343	KL109	<i>bla</i> _{KPC}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	+	573

24	Kpw 24	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	84	KL28	<i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{CTXM-9}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	20
25	Kpw 25	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{CTXM-9}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	17
26	Kpw 26	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	420	KL10	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	147
27	Kpw 27	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	84	ND	<i>bla</i> _{CTXM-2} , <i>bla</i> _{CTXM-9}	<i>mrkD</i> , <i>k2</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	+	20
28	Kpw 28	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	343	KL109	<i>bla</i> _{CTXM-9} , <i>bla</i> _{GIM}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	+	573
29	Kpw 29	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	75	KL105	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	11
30	Kpw 30	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	420	KL10	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{GIM}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> ,	+	147
31	Kpw 31	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	141	KL25	Nenhum	<i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	17
32	Kpw 32	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	84	KL28	Nenhum	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	+	20
33	Kpw 33	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	420	KL10	Nenhum	<i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	-	147
34	Kpw 34	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	141	KL25	<i>bla</i> _{CTXM-8}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>irp-1</i> , <i>fimA</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	17

35	Kpw 35	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>fimA</i> , <i>mrkA</i>	-	575
36	Kpw 36	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	75	KL105	Nenhum	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>irp-1</i> , <i>mrkA</i>	-	11
37	Kpw 37	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>entB</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	+	575
38	Kpw 38	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	+	575
39	Kpw 39	Calgary, Canadá (América)	2000-2009	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	<i>bla</i> _{CTXM-8}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>mrkA</i>	+	11
40	Kpw 40	Holanda (Europa)	2009-2011	NI	MDR	105	KL108	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	-	395
41	Kpw 41	Holanda (Europa)	2009-2011	NI	MDR	105	KL108	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ecpA</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	-	2674
42	Kpw 42	Holanda (Europa)	2009-2011	NI	MDR	105	KL108	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	-	395
43	Kpw 43	Holanda (Europa)	2009-2011	NI	MDR	105	KL108	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	+	395
44	Kpw 44	Holanda (Europa)	2009-2011	NI	MDR	105	KL108	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i>	-	395
45	Kpw 45	Gauteng, África do Sul (África)	2011	Abcesso abdominal	MDR	24	KL24KL 54KL55	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTXM-1}	<i>kfU</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ecpA</i>	-	569
46	Kpw 46	Mumbai, Índia (Ásia)	2011	Urina	MDR	64	KL64	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{OXA-1-like} , <i>bla</i> _{VIM-1} Plasmídeos: <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrS</i>	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i>	+	147

47	Kpw 47	Nova Delhi, Índia (Ásia)	2010	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	<i>bla</i> _{NDM-1} ⁺ <i>bla</i> _{CTX-M-15} ⁺ <i>bla</i> _{SHV-12} ⁺ <i>bla</i> _{OXA-1-like} ⁺ Plasmídeos: <i>ac(6')-Ib-cr</i>	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>irp-1</i> , <i>fyuA</i> , <i>mrkA</i> ,	-	340
48	KBr 1	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	2	KL2KL30	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>kfU</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	1145
49	KBr 2	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	651	ND	Nenhum	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>ybtS</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>epaA</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	4672
50	KBr 3	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	349	KL147 KL112	Nenhum	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	22
51	KBr 4	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	39	KL39KL13	<i>bla</i> _{KPC}	<i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	1868
52	KBr 5	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>epaA</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	+	502
53	KBr 6	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	39	KL39KL13	Nenhum	<i>kfU</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	327
54	KBr 8	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	652	ND	Nenhum	<i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	-	834
55	KBr 9	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	364	KL132	Nenhum	<i>kfU</i> , <i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> , <i>mrkA</i> ,	+	327
56	KBr 11	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	39	KL39KL13	Nenhum	<i>kfU</i> , <i>entB</i> , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ycfM</i> , <i>kpN</i> ,	-	327

57	KBr 12	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	39	KL39KL13	Nenhum	<i>kfU, mrkD, fimH, ycfM, kpN, aero2, mrkA,</i>	+	327
58	KBr 14	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>entB, mrkD, fimH, ycfM, ecpA, kpN, aero2, mrkA,</i>		502
59	KBr 15	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	420	KL10	Nenhum	<i>entB, mrkD, fimH, ycfM, kpN, mrkA,</i>		147
60	KBr 18	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	385	KL22KL37	Nenhum	<i>mrkD, fimH, ycfM, kpN, mrkA,</i>		289
61	KBr 21	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	27	KL27	Nenhum	<i>entB, mrkD, fimH, ycfM, ecpA, kpN,</i>	+	298
62	KBr 24	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	27	KL27	Nenhum	<i>entB, mrkD, ybtS, fimH, ycfM, kpN, irp-2, mrkA,</i>		11
63	KBr 27	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	2	ND	Nenhum	<i>kfU, mrkD, K2, ecpA, kpN,</i>	+	14
64	KBr 33	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	NC	413	KL61	Nenhum	<i>kfU, entB, mrkD, fimH, ycfM, kpN,</i>		662
65	KBr 34	Brasil (América do Sul)	2013	Urina	MDR	50	KL15KL17 KL51KL52	Nenhum	<i>kfU, mrkD, fimH, ecpA, kpN, mrkA,</i>	+	678

Tabela 1 – Dados gerais das 65 *Klebsiella pneumoniae* caracterizadas no presente estudo.

Hm: hiper mucoviscosidade; MDR: multirresistente; NC: não classificado; ND: não determinado; NI: não informado; ST: Sequence Type.

REFERÊNCIAS

1. ALCÁNTAR-CURIEL, D. M.; BLACKBURN, D.; SALDAÑA, Z.; GAYOSSO-VÁZQUEZ, C.; IOVINE, N.; LACRUZ, M. A.; GIRÓN, J. A. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 129-138, 15 fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.22974>.
2. AZEVEDO, P. A. A.; FURLAN, J. P. R.; GONÇALVES, G. B.; GOMES, C. N.; GOULART, R. S.; STEHLING, E. G.; PITONDO-SILVA, A. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S.L.], v. 18, p. 74-79, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.025>.
3. BASSETTI, M.; RIGHI, E.; CARNELUTTI, A.; GRAZIANO, E.; RUSSO, A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 749-761, 19 set. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2018.1522249>.
4. BRISSE, S.; PASSET, V.; HAUGAARD, A. B.; BABOSAN, A.; KASSIS-CHIKHANI, N.; STRUVE, C.; DECRE, D. Wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 51, n. 12, p. 4073-4078, 2 out. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01924-13>.
5. CAMPOS, A. C.; ALBIERO, J.; ECKER, A. B.; KURODA, C. M.; MEIRELLES, L. E. F.; POLATO, A.; TOGNIM, M. C.B.; WINGETER, M. A.; TEIXEIRA, J. J. V. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: a systematic review. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 44, n. 11, p. 1374-1380, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>.
6. CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1111-1123, 3 maio 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>.
7. CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*—clinical and molecular perspectives. **Journal of Internal Medicine**, [S.L.], v. 287, n. 3, p. 283-300, 21 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13007>.
8. CORTÉS, G.; BORRELL, N.; ASTORZA, B.; GÓMEZ, C.; SAULEDA, J.; ALBERTÍ, S. Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. **Infection and Immunity**, [S.L.], v. 70, n. 5, p. 2583-2590, maio 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.5.2583-2590.2002>.
9. DAUTZENBERG, M. J.; OSSEWAARDE, J. M.; KRAKER, M.; ZEE, A.; VAN BURGH, S.; GREEFF, S. C.; A BIJLMER, H.; GRUNDMANN, H.; STUART, J. W. C.; FLUIT, A. C. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 19, n. 9, 6 mar. 2014. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20723>.
10. DU, L.; ZHANG, J.; LIU, P.; LI, X.; SU, K.; YUAN, L.; ZHANG, Z.; PENG, D.; LI, Y.; QIU, J. Genome sequencing and comparative genome analysis of 6 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in China. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 6, p. 3125-3133, 3 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02263-0>.

11. ELLEM, J.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. Efficient Direct Extended-Spectrum-Lactamase Detection by Multiplex Real-Time PCR: accurate assignment of phenotype by use of a limited set of genetic markers. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 8, p. 3074-3077, 25 maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02647-10>.
12. FENG, Y.; LU, Y.; YAO, Z.; ZONG, Z. Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of Sequence Type 36. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 62, n. 7, jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02644-17>.
13. FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M.; HANAGE, W. P.; SPRATT, B. G. EBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 186, n. 5, p. 1518-1530, mar. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004>.
14. FERTAS-AISSANI, R. E.; MESSAI, Y.; ALOUACHE, S.; BAKOUR, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 209-216, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>.
15. FREEMAN, J. T.; RUBIN, J.; MCAULIFFE, G. N.; PEIRANO, G.; ROBERTS, S.; DRINKOVIĆ, D.; PITOUT, J. D. Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [S.L.], v. 3, n. 1, 1 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-3-27>.
16. TURTON, J. F.; BAKLAN, H.; SIU, L.K.; KAUFMANN, M. E.; PITT, T. L. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 284, n. 2, p. 247-252, jul. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01208.x>.
17. GONÇALVES, G. B.; FURLAN, J. P. R.; VESPERO, E. C.; PELISSON, M.; STEHLING, E. G.; PITONDO-SILVA, A. (2017). Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 56, 1–7. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.011
18. GORRIE, C. L.; MIRCETA, M.; WICK, R. R.; EDWARDS, D. J.; THOMSON, N. R.; STRUGNELL, R. A.; PRATT, N. F.; GARLICK, J. S.; WATSON, K. M.; PILCHER, D. V. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 208-215, 24 mar. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cix270>.
19. GU, B.; BI, R.; CAO, X.; QIAN, H.; HU, R.; MA, P. Clonal dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST48 clone among multiple departments in a tertiary teaching hospital in Jiangsu Province, China. **Annals of Translational Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 23, p. 716-716, dez. 2019. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2019.12.01>.
20. GU, D.; DONG, N.; ZHENG, Z.; LIN, D.; HUANG, M.; WANG, L.; CHAN, E. W.; SHU, L.; YU, J.; ZHANG, R. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 37-46, jan. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30489-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30489-9).
21. HUANG, Y.; LIAO, H.; WU, C.; PENG, H. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Research in Microbiology**, [S.L.], v. 160, n. 1, p. 71-79, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2008.10.009>.

22. ALBESA, I.; BARBERIS, L. I.; PAJARO, M. C.; FARNOCHI, M. C.; ERASO, A. J. A thiol-activated hemolysin in Gram-negative bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 297-300, 1 mar. 1985. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m85-055>.
23. LEPUSCHITZ, S.; HAUSER, K.; SCHRIEBL, A.; SCHLAGENHAUFEN, C.; STÖGER, A.; CHAKERI, A.; VÖTSCH, K.; PEKARD-AMENITSCH, S.; SPRINGER, B.; ALLERBERGER, F. Fecal *Klebsiella pneumoniae* Carriage Is Intermittent and of High Clonal Diversity. **Frontiers in Microbiology**, [S.L.], v. 11, 24 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.581081>.
24. LIU, Y.; LIU, P.; WANG, L.; WEI, D.; WAN, L.; ZHANG, W. Capsular Polysaccharide Types and Virulence-Related Traits of Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Chinese University Hospital. **Microbial Drug Resistance**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 901-907, out. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0222>.
25. MA, L.; FANG, C.; LEE, C.; SHUN, C.; WANG, J. Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 192, n. 1, p. 117-128, jul. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/430619>.
26. MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 268-281, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
27. MAMLOUK, K.; BOUBAKER, I. B.; GAUTIER, V.; VIMONT, S.; PICARD, B.; REDJEB, S. B.; ARLET, G. Emergence and Outbreaks of CTX-M β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains in a Tunisian Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 11, p. 4049-4056, nov. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01076-06>.
28. Murray, P. R., Rosenthal, K.S; Pfaller, M.A. **Medical microbiology** consultant, JMI Laboratories. —8th edition. 2013
29. PACZOSA, M. K.; MECASAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 629-661, set. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mubr.00078-15>.
30. PAN, Y.; FANG, H.; YANG, H.; LIN, T.; HSIEH, P.; TSAI, F.; KEYNAN, Y.; WANG, J. Capsular Polysaccharide Synthesis Regions in *Klebsiella pneumoniae* Serotype K57 and a New Capsular Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 7, p. 2231-2240, jul. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01716-07>.
31. PEIRANO, G.; MOOLMAN, J.; PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J. D. D. The characteristics of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from South Africa. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 74-78, 28 set. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2011.614276>.
32. PEIRANO, G.; PILLAI, D. R.; PITONDO-SILVA, A.; RICHARDSON, D.; PITOUT, J. D.D. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 106-109, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.013>.

33. PEIRANO, G.; SANG, J. H. K.; PITONDO-SILVA, A.; LAUPLAND, K. B.; PITOUT, J. D. D. Molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over a 10-year period in Calgary, Canada. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 1114-1120, 14 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks026>.
34. PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone st131 o25. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 316-321, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>.
35. PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 13 jul. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01019-15>.
36. RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 32, n. 3, 19 jun. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00001-19>.
38. RUSSO, T. A.; OLSON, R.; FANG, C.; STOESEER, N.; MILLER, M.; MACDONALD, U.; HUTSON, A.; BARKER, J. H.; LAHOZ, R. M.; JOHNSON, J. R. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 9, set. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00776-18>.
39. SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; HAY, A.; CARMELI, Y.; PODSCHUN, R.; HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C.; OFEK, I. Extended-Spectrum β -Lactamase Production Is Associated with an Increase in Cell Invasion and Expression of Fimbrial Adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 9, p. 3029-3034, set. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00010-08>.
40. Sekowska A., Gospodarek E., Janicka G., Jachna-Sawicka K., Sawicki M. Hydrolytyczna. Hydrolytic and haemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. **Med Dosw Mikrobiol**. v.58, n.2, p.135-141. 2006. Polish. PMID: 17133907.
41. SHON, A. S.; BAJWA, R. P.S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 107-118, 15 fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.22718>.
42. SOTGIU, G.; ARE, B. M.; PESAPANE, L.; PALMIERI, A.; MURESU, N.; COSSU, A.; DETTORI, M.; AZARA, A.; MURA, I. I.; COCUZZA, C. Nosocomial transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian university hospital: a molecular epidemiological study. **Journal of Hospital Infection**, [S.L.], v. 99, n. 4, p. 413-418, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.033>.
43. TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y. Discovery, research, and development of new antibiotics: the who priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 318-327, mar. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30753-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30753-3).
44. WANG, B.; PAN, F.; WANG, C.; ZHAO, W.; SUN, Y.; ZHANG, T.; SHI, Y.; ZHANG, H. Molecular epidemiology of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. **International Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 93, p. 311-319, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.009>.

45. Wen-Liang Yu, Chang-Phone Fung, Wen-Chien Ko, Yin-Ching Chuang, Causing Abscesses of the Liver and Other Sites Polymerase Chain Reaction Analysis for Detecting Capsule Serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 195, Issue 8, 15 April 2007, Page 1235, <https://doi.org/10.1086/512686>

46. WISKUR, B. J.; HUNT, J. J.; CALLEGAN, M. C. Hypermucoviscosity as a Virulence Factor in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S.L.], v. 49, n. 11, p. 4931, 1 nov. 2008. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). <http://dx.doi.org/10.1167/iov.08-2276>.

47. WYRES KL, WICK RR, GORRIE C, JENNEY A, FOLLADOR R, Thomson NR, Holt KE. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. **Microb Genom.** v.2, n.12. p.e000102. Dec 2016. doi: 10.1099/mgen.0.000102.

48. YU, V. L.; HANSEN, D. S.; KO, W. C.; SAGNIMENI, A.; KLUGMAN, K. P.; VON-GOTTBERG, A.; GOOSSENS, H.; WAGENER, M. M.; BENEDI, V. J. Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 986-993, jul. 2007. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1307.070187>.

CAPÍTULO 12

DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS HOSPITALARES DE *Staphylococcus aureus*

Data de aceite: 01/11/2021

Data submissão: 20/09/2021

Tiago Danelli

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4587719358362310>

Felipe Crepaldi Duarte

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas
e Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/5120174525592260>

Thilara Alessandra de Oliveira

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3957439582033876>

Ana Paula Dier

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/0814393315862933>

Maria Alice Galvão Ribeiro

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/6965738487681558>

Stefani Lino Cardim

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/6650418160269686>

Gerusa Luciana Gomes Magalhães

Hospital Universitário da Universidade Estadual
de Londrina,
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7014276892121341>

Guilherme Bartolomeu Gonçalves

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4192373348304511>

Marsileni Pelisson

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/3898886680922621>

Eliana Carolina Vespero

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e
Toxicológicas
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/4592425303792522>

Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Universidade Estadual de Londrina,
Departamento de Microbiologia
Londrina – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/1783272660304122>

RESUMO: Para o tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), os glicopeptídeos são antimicrobianos de primeira escolha, no entanto, a pressão seletiva que esses fármacos exercem, pode induzir o surgimento de isolados com sensibilidade diminuída à vancomicina, conhecidos como hVISA e VISA. O presente estudo teve por finalidade investigar a sensibilidade à vancomicina de isolados clínicos de *S. aureus*, no período de 2010 a 2015, de um hospital terciário do sul do Brasil. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por Etest® para 335 isolados e a análise do Perfil Populacional-Área Sob a Curva (PAP-AUC) para 80. A CIM variou de 0,5 a 8,0 µg/mL sendo que as concentrações mais frequentes foram 1,5 µg/mL com 31,9% (107/335) e 2,0 µg/mL com 29,6% (99/335). O percentual de isolados não sensíveis foi de 20,8% em 2010 a 2012 e de 17,1% em 2013 a 2015. Verificou-se que para 31,6% (12/38) das amostras obtidas entre 2010 e 2014 e que para 42,9% (18/42) das amostras de 2015, a relação PAP/AUC foi >0,9, classificando-as como não sensíveis. Verifica-se que o percentual de isolados não sensíveis à vancomicina foi elevado neste estudo, entretanto, os valores obtidos foram divergentes entre os métodos analisados. A técnica de PAP-AUC, considerada o padrão ouro, evidenciou as maiores frequências de hVISA e VISA, no entanto, é muito trabalhosa o que inviabiliza sua utilização em laboratórios clínicos de rotina. Por outro lado, embora fácil de realizar, o método de Etest® também tem suas limitações, o custo é elevado e não é tão sensível quanto o PAP-AUC para identificação de *S. aureus* não sensíveis, especialmente hVISA.

PALAVRAS-CHAVES: Vancomicina. Concentração inibitória. hVISA. VISA. PAP- AUC.

VANCOMYCIN-SUSCEPTIBILITY DETERMINATION IN NOSOCOMIAL CLINICAL ISOLATES OF *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT: To treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections, glycopeptides are the antimicrobials of first choice. However, the selective pressure exerted by these drugs can lead to the emergence of isolates with reduced susceptibility to vancomycin (hVISA and VISA). This study aimed at investigating the antimicrobial susceptibility profile of *S. aureus* clinical isolates, from 2010 to 2015, in a tertiary hospital in southern Brazil. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using Etest® for 335 isolates, and the population analysis profile-area under the curve (PAP-AUC) method, for 80 isolates. MIC values ranged from 0.5 to 8.0 µg/mL; 1.5 and 2.0 µg/mL were the most frequent concentrations, found in 31.9% (107/335) and 29.6% (99/335) of the isolates, respectively. The percentage of vancomycin non-susceptible isolates was 20.8% (from 2010 to 2012) and 17.1% (from 2013 to 2015). It was observed that for 31.6% (12/38) of the isolates obtained between 2010 and 2014, and 42.9% (18/42) of the isolates from 2015, the PAP-AUC ratio was >0.9, which

allowed us to classify them as non-susceptible to vancomycin. In this study, a high rate of vancomycin non-susceptible isolates was observed, but the values differed according to the method applied. PAP-AUC, considered the golden standard, was more efficient in detecting hVISA and VISA. However, it is a very laborious test, which makes its usage impractical in routine clinical laboratories. Finally, although easy to be carried out, Etest® has limitations regarding its cost, and it is not as sensitive as PAP-AUC for the identification of vancomycin non-susceptible isolates, especially hVISA.

KEYWORDS: Vancomycin. Minimum inhibitory concentration. hVISA. VISA. PAP-AUC.

1 | INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus são bactérias responsáveis por uma grande variedade de infecções, que vão desde lesões de pele superficiais até doenças graves e potencialmente fatais, como pneumonia necrotizante, osteomielite, endocardite e sepse e são considerados como um dos principais patógenos humanos nas infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) na atualidade. Sua elevada ocorrência se dá, não apenas pela sua virulência, como também pela capacidade de disseminação e versatilidade em adquirir resistência (WEINER-LASTINGER et al., 2020).

Como outros patógenos, *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos emergiram com a descoberta e disseminação do uso de diferentes classes destes fármacos. Entre estas, a mais preocupante foi a resistência à meticilina, que também torna o microrganismo resistente aos antimicrobianos mais utilizados clinicamente, os beta-lactâmicos (HOWDEN et al., 2010).

Atualmente, variações importantes na prevalência de resistência a meticilina em *S. aureus* (MRSA - *Methicillin-resistant S. aureus*), de 1 a 50%, têm sido evidenciadas por diversos pesquisadores, em países de todo continente (WEINER-LASTINGER et al., 2020). No Brasil, a frequência de MRSA varia de 29 a 46%, quando se analisam isolados de pacientes internados em hospitais (DUARTE et al., 2018; MARRA et al., 2011; SADER; FLAMM; JONES, 2013) Latin America, and selected countries in the Asia-Pacific Region (2011. Na União Europeia, verifica-se uma tendência decrescente de MRSA entre 2015 e 2018, variando de 0% a 43,0% entre os países (ECDC, 2019). Apesar desse desenvolvimento positivo, MRSA continua sendo um patógeno importante e uma das causas mais comuns de infecções bacterianas graves, tendo uma responsabilidade elevada em termos de morbidade e mortalidade (CASSINI et al., 2019).

Para o tratamento das infecções causadas por MRSA, os glicopeptídeos são antimicrobianos de primeira escolha, no entanto a pressão seletiva que esses fármacos exercem, podem induzir o surgimento de isolados com sensibilidade diminuída à vancomicina, conhecidos como *Vancomycin-Intermediate S. aureus* (VISA). Os primeiros relatos ocorreram pela primeira vez no Japão em meados da década de 1990 (HIRAMATSU et al., 1997). Essa forma geralmente surge pós exposição prolongada à vancomicina, no

qual uma pequena subpopulação de microrganismos com sensibilidade reduzida conhecido como hétéro-VISA (hVISA), cujo mecanismo não está totalmente entendido, embora saiba-se que provavelmente ocorram alterações nos genes reguladores que levam ao espessamento da parede celular e atividade auto lítica, bem como um excesso de resíduos de D-ala-D-ala (CAMERON et al., 2017).

S. aureus resistentes à vancomicina, do inglês *Vancomycin-Resistant S. aureus* (VRSA), foram reportados pela primeira vez em 2002 nos Estados Unidos pela aquisição do gene *vanA* de *Enterococcus faecalis Vancomycin-Resistant* (VRE) (CDC, 2002; CHANG et al., 2003). Felizmente, novos casos deste tipo de resistência permanecem raros na atualidade, tendo sido identificados apenas 52 casos em diversos países como Estados Unidos, Índia, Irã, Paquistão, Brasil e Portugal (CONG; YANG; RAO, 2020).

Poucos estudos têm determinado a prevalência de *S. aureus* não sensíveis à vancomicina no Brasil. Assim, o presente estudo teve por finalidade determinar a frequência de sensibilidade diminuída à vancomicina de isolados clínicos de *S. aureus* de um hospital terciário da região sul do Brasil.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 335 isolados de *S. aureus* obtidos de diversos materiais clínicos como sangue, pele e partes moles, secreções respiratórias, líquidos cavitários, urina, entre outros, provenientes de pacientes de um hospital terciário da região Sul do Brasil, no período de 2010 a 2015.

Os isolados estocados previamente em caldo triptona de soja (TSB) acrescido de 30% de glicerina e 0,5 µg/ml de vancomicina, sob refrigeração a -20 °C, foram obtidos do Banco de Bactérias do setor de Microbiologia. Os mesmos foram reativados utilizando caldo TSB e incubados por 24-48 horas a 35±2 °C.

A identificação dos microrganismos foi confirmada por metodologia manual padronizada por Jorgensen et al. (2015) ou automatizada utilizando o Sistema Vitek® (bioMérieux), de acordo com orientações do fabricante.

A CIM de vancomicina foi determinada por Etest® (bioMérieux) de acordo com orientações do fabricante. Para este teste utilizou-se uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland em ágar Mueller-Hinton sobre o qual foram depositadas fita plásticas de Etest® contendo gradiente de concentração de vancomicina (0,016 a 256 µg/mL) e incubadas a 35±2 °C durante 72 horas. Como controles positivos foram utilizadas as cepas de *S. aureus* Mu3 ATCC 700698 (hVISA), Mu50 ATCC® 700699 (VISA) e *E. faecalis* ATCC® 51299 e como negativo, *S. aureus* ATCC® 29213. Foram considerados *S. aureus* sensíveis à vancomicina (*Vancomycin-susceptible S. aureus* – VSSA) os isolados que apresentaram CIM ≤ 2 µg/mL, isolados as que apresentam CIM de 4-8 µg/mL foram considerados VISA, e isolados VRSA foram os que se desenvolveram em CIM ≥ 16 µg/mL. Foram calculadas

as CIM₅₀ e CIM₉₀, que indicam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados, respectivamente.

As amostras foram submetidas à Análise do Perfil Populacional-Área Sob a Curva (PAP-AUC), conforme descrito por Wootton et al. (2001) com modificações. Foi determinado o número de colônias que se desenvolveram nas diferentes concentrações de vancomicina e plotado em uma escala semi-logarítmica, usando o *software* Prism 5 (GraphPad Software). O gráfico obtido foi então utilizado para calcular a área sob a curva (AUC). *S. aureus* ATCC® 29213 (glicopeptídeo sensível), *S. aureus* ATCC® 700698 Mu3 (hVISA) e *S. aureus* ATCC® 700699 Mu50 (VISA) foram usados como controles (HIRAMATSU et al., 1997) ISBN: 0305-7453 (Print. O critério usado para a classificação dos isolados foi $\geq 0,9$ e $\leq 1,3$ para hVISA e $>1,3$ para VISA, tendo como base a relação entre a AUC do isolado dividido pela AUC das cepas de referência Mu3 e Mu50.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o CAEE número 0015.0.268.000-11.

3 | RESULTADOS

Dos 335 isolados analisados, 125 eram do período de 2010 a 2012 e 210 do período de 2013 a 2015. De maneira geral a CIM variou de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$ sendo que as concentrações mais frequentes foram 1,5 $\mu\text{g/mL}$ com 31,9% (107/335) e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ com 29,6% (99/335).

Analisando-se os períodos separadamente verifica-se que no primeiro período a CIM variou de 0,5 a 4,0, tendo apresentado a maior frequência para a CIM 2,0 $\mu\text{g/mL}$ em 39 %, enquanto que no período de 2013 a 2015 a variação foi de 0,5 a 8,0, embora a CIM 1,5 tenha sido identificada mais frequentemente em 23,9 % dos isolados, como pode ser verificado na figura 1.

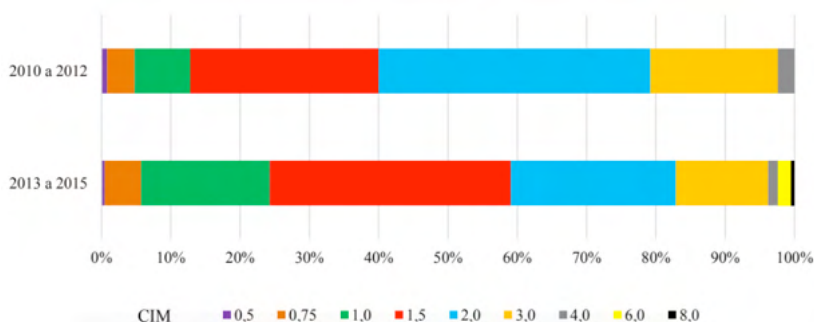


Figura 1 – Percentual de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$) determinadas por Etest®, para 335 isolados de *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar.

Fonte: Os próprios autores.

A Tabela 1 mostra as CIM₅₀ e CIM₉₀ verificadas para vancomicina, bem como os percentuais de isolados não sensíveis determinados para as todas as amostras de *S. aureus* incluídas no estudo pelo método de Etest®. Verificou-se que as CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 2,0 e 3,0 µg/mL para 125 isolados no período de 2010 a 2012 e de 1,5 e 3,0 µg/mL para 210 do período 2013 a 2015. O percentual de isolados não sensíveis variou de 20,8%, no primeiro período a 17,1%, no segundo período.

Período	CIM ₅₀	CIM ₉₀	NS (%)	Total de amostras
2010 a 2012	2,0	3,0	20,8	125
2013 a 2015	1,5	3,0	17,1	210

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀ e CIM₉₀) de vancomicina (µg/mL) e percentual de isolados não sensíveis, determinadas por Etest® para 335 amostras de *Staphylococcus aureus*.

Legenda: Não Sensível (CIM ≥ 3 µg/mL). Fonte: os próprios autores

A análise do PAP/AUC foi realizada para 80 isolados de *S. aureus*, dos quais 38 do período 2010 a 2014 e 42 do período 2015. Verificou-se que para 31,6% (12/38) das amostras obtidas entre 2010 e 2014 e que para 42,9% (18/42) das amostras de 2015, a relação PAP/AUC foi ≥ 0,9, classificando-as como não sensíveis. Dentro deste grupo, no período de 2010 a 2014, 83,3% (10/12) e 16,7% (2/12) foram classificadas como hVISA e VISA, respectivamente. Ainda no grupo de não sensíveis, no período de 2015, 72,2% (13/18) e 27,8% (5/18) foram considerados hVISA e VISA, respectivamente. Se compararmos os resultados de hVISA e VISA em relação ao número total de isolados em que o PAP/AUC foi realizado, teremos que, hVISA representa 28,7% (23/80) e VISA 8,7% (7/80) (tabela 2).

Período	NS PAP/AUC % (n)	NS Etest® % (n)
2010 a 2014	31,6 (12/38)	27,0 (40/148)
2015	42,9 (18/42)	11,8 (22/187)

Tabela 2 – Comparação dos percentuais de isolados não sensíveis de *S. aureus*, determinados por Etest® e por PAP/AUC

Legenda: NS: Não Sensíveis. PAP/AUC: Perfil de análise populacional/Área sob a Curva. n: Número de isolados.

Fonte: Os próprios autores.

4 | DISCUSSÃO

Este estudo determinou a CIM de vancomicina de isolados de *S. aureus* de origem hospitalar, num período de 6 anos (2010 a 2015), por duas metodologias e verificou divergência entre elas.

Isolados com CIM de 1 a 3 µg/mL tem uma alta frequência de acordo com Wang

et al. (2012)"<http://www.mendeley.com/documents/?uuid=76e9eb66-7123-48a0-9239-d5631e20cc8a>"},"mendeley":{"formattedCitation": "(WANG et al., 2012, corroborando assim com os resultados encontrados neste estudo. Nas duas metodologias foram encontrados isolados hVISA e VISA e nenhum VRSA. De acordo com Alam et al. (2014) é mais comum encontrarmos cepas VISA e hVISA do que cepas VRSA.

A CIM50 e CIM90 indicam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados, respectivamente. Oliveira et al. (2015) MRSA isolated from different sources of hospitalized patients was characterized by molecular and phenotypic methods. Methodology: A total of 123 *S. aureus* isolates were characterized according to their genetic relatedness by repetitive element sequence based-PCR (REP-PCR) determinaram a CIM50 e CIM90 para vancomicina pelo método de microdiluição em caldo (MDC), sendo a CIM50 de 2,0 µg/mL e a CIM90 de 4,0 µg/mL.

A verdadeira prevalência de hVISA ainda é desconhecida, alguns estudos apontam índices que variam de 2 a 20% entre isolados de *S. aureus* resistente a meticilina (ADAM et al., 2010) e relacionam a falha terapêutica com vancomicina à presença de cepas hVISA (VAN HAL; PATERSON, 2011) with hVISA infections associated with a 2.37-times-greater failure rate (95% confidence interval [CI], 1.53 to 3.67).

A frequência de hVISA em estudos epidemiológicos, de acordo com Van Hal e Paterson (2011) with hVISA infections associated with a 2.37-times-greater failure rate (95% confidence interval [CI], 1.53 to 3.67) pode variar de 0 a 73%. Essa variação pode ser atribuída a diversos fatores como metodologia empregada, população de pacientes, fonte da amostra, variação na pressão seletiva por vancomicina e instabilidade do fenótipo em amostras estocadas em freezer (HIRAMATSU et al., 2014; HOWDEN et al., 2010; WOOTTON et al., 2007) and particularly hGISA, will only be obvious when a definitive detection method is available. A few novel GISA and hGISA detection methods have been proposed; however, their validity has never been tested on a significant scale and in different laboratories. This study compares three screening methods for detecting GISA and hGISA strains in 12 laboratories, using a blind panel of 48 strains with known glycopeptide susceptibilities. The three screening methods used were brain heart infusion agar with 6 mg/liter vancomycin (BHIA6V).

As metodologias tradicionais de determinação da CIM, como a MDC, ágar diluição (ADL) e Etest® têm levado a resultados duvidosos, pois o inóculo utilizado está abaixo do limiar requerido para detectar heterorresistência (HOWDEN et al., 2010; WOOTTON et al., 2007) (HIRAMATSU et al., 2014; HOWDEN et al., 2010).

Uma vez que não existem marcadores genéticos para heterorresistência, o PAP-AUC é utilizado como padrão ouro e mais confiável método para a detecção de heterorresistência (WOOTTON et al., 2001), no entanto este método é muito trabalhoso e demorado, o que limita a sua utilização. Como consequência, vários testes de triagem, incluindo o Etest® GRD, foram desenvolvidos utilizando inóculos maiores, maior tempo de incubação e meio

de cultura mais nutritivos (HOLMES; JOHNSON; HOWDEN, 2012; HOWDEN et al., 2010).

5 | CONCLUSÃO

Neste estudo a frequência de isolados não sensíveis foi elevada, entretanto, os valores obtidos foram divergentes entre os métodos analisados. A técnica de PAP-AUC, considerada o padrão ouro, evidenciou as maiores frequências de hVISA e VISA, no entanto, trata-se de uma metodologia muito trabalhosa e demorada, o que inviabiliza sua utilização em laboratórios clínicos de rotina. Já o método de Etest®, embora mais prático e fácil de realizar, também tem suas limitações, o custo é elevado e não é tão sensível quanto o PAP-AUC para identificação de *S. aureus* não sensíveis, especialmente hVISA. A falta de um método rápido e confiável pode acarretar falha terapêutica, uma vez que isolados não sensíveis, especialmente os hVISA podem não ser identificados pelos métodos utilizados na atualidade, evidenciando a necessidade de mais pesquisas que tragam resultados rápidos e fidedignos na determinação da sensibilidade à vancomicina.

REFERÊNCIAS

- ADAM, H. J. et al. Detection and Characterization of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates in Canada: Results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995-2006. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 945–949, fev. 2010.
- ALAM, M. T. et al. Dissecting Vancomycin-Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus* Using Genome-Wide Association. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 1174–1185, maio 2014.
- CAMERON, D. R. et al. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 10, p. 767–773, 2017.
- CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.
- CDC. *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin --- United States, 2002. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 51, n. 26, p. 265–267, jul. 2002.
- CHAMON, R. C. et al. Genome Sequence of a Highly Virulent *pvl*-positive Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 30. **Current Genomics**, v. 21, n. 2, p. 128–137, maio 2020.
- CHANG, S. et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342–1347, abr. 2003.
- CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, jan. 2020.

DUARTE, F. C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 3, p. 232–238, jul. 2018.

ECDC. **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018**. Stockholm: [s.n.].

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–136, jul. 1997.

HIRAMATSU, K. et al. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 213–224, dez. 2014.

HOLMES, N. E.; JOHNSON, P. D. R.; HOWDEN, B. P. Relationship between vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2548–2552, 2012.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

HUANG, S. et al. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012–2013. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 5, p. 701–707, out. 2016.

JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 1 maio 2011.

OLIVEIRA, C. F. DE et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 07, p. 743, 30 jul. 2015.

SADER, H. S.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Antimicrobial activity of daptomycin tested against Gram-positive pathogens collected in Europe, Latin America, and selected countries in the Asia-Pacific Region (2011). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 4, p. 417–422, abr. 2013.

VAN HAL, S. J.; PATERSON, D. L. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 405–410, 2011.

WANG, S.-H. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 239-III, Ohio, USA, 2007–20091. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1557–1565, out. 2012.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with pediatric healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 19–30, 25 jan. 2020.

WILCOX, M. et al. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : consensus by an International Working Group. **Future Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 345–352, mar. 2019.

WOOTTON, M. et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 399–403, abr. 2001.

WOOTTON, M. et al. A Multicenter Study Evaluating the Current Strategies for Isolating *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Glycopeptides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 329–332, fev. 2007.

CAPÍTULO 13

ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Kielmeyera coriacea* MART. & ZUCC. NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* L

Data de aceite: 01/11/2021

Carla Spiller

<http://lattes.cnpq.br/7936073417997169>

Maria de Fatima Barbosa Coelho

<http://lattes.cnpq.br/5849881961625121>

Elisangela Clarete Camili

<http://lattes.cnpq.br/7599429487582546>

Ludmila Porto Piton

<http://lattes.cnpq.br/2061008404565953>

Sharmely Hilares Vargas

<http://lattes.cnpq.br/0209990601833550>

RESUMO: *Kielmeyera coriacea* é uma espécie típica do Cerrado, com potencial alelopático. O objetivo do estudo foi verificar o efeito do extrato aquoso de diferentes partes órgãos de *K. coriacea* de Chapada dos Guimarães-MT e Jardim Botânico de Brasília sob a germinação de alface. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram os extratos de folhas jovens verdes, pericarpo de frutos verdes, sementes, cortiça, córtex, pericarpo de frutos maduros e testemunha (água destilada). A germinação de sementes de alface foi alta (65 a 92%) e não é afetada pelos extratos das duas procedências. O índice alelopático negativo ocorre ao se utilizar o extrato do pericarpo do fruto seco de Chapada dos Guimarães e o extrato do pericarpo do fruto verde do Jardim Botânico de Brasília. A porcentagem de plântulas

anormais e o tempo médio de germinação são maiores no extrato do pericarpo do fruto seco de Chapada dos Guimarães. O extrato de sementes *K. coriacea* do Jardim Botânico de Brasília causa alta porcentagem de plântulas anormais. Os extratos de folhas, sementes, cortiça e córtex de *K. coriacea*, apresentam potencial alelopático positivo e estimulante no crescimento e desenvolvimento de plântulas da alface.

PALAVRAS-CHAVE: Pau-santo. Alface. Aleloquímicos

ALELOPATIC POTENTIAL OF AQUEOUS EXTRACT OF DIFFERENT ORGANS OF *Kielmeyera coriacea* MART. & ZUCC. OF TWO PROCEDURES IN THE GERMINATION AND GROWTH OF *Lactuca sativa* L

ABSTRACT: *Kielmeyera coriacea* is a typical Cerrado species with allelopathic potential. The aim of the present study was to verify the effect of the aqueous extract of different organs of *K. coriacea* from the Chapada dos Guimarães-MT and Botanic Gardens of Brasilia under the germination of lettuce, A completely randomized design with seven treatments and four replications was used. The treatments were extracts of young green leaves, pericarp of green fruits, whole seeds, cork, cortex, ripe fruit pericarp open in dispersion and control (distilled water). Germination of lettuce seeds was high (65 to 92%) and not affected by the extracts from both sources. The negative allelopathic index occurs when the extract of the ripe fruit pericarp from Chapada dos Guimarães and the extract of the pericarp of the green fruit of the Botanical Garden

of Brasília are used. The percentage of abnormal seedlings and the mean germination time are higher in ripe fruit pericarp of Chapada dos Guimarães. The extract of *K. coriacea* seeds from the Botanical Garden of Brasília causes a high percentage of abnormal seedlings. The extracts of leaves, seeds, cork and cortex of *K. coriacea* present positive and stimulating allelopathic potential in the growth and development of lettuce seedlings.

KEYWORDS: Pau-santo. Lettuce. Allelochemicals

INTRODUÇÃO

A alelopatia é um fenômeno natural que ocorre no ambiente envolvendo vegetais e microrganismos mediante a liberação de substâncias que podem causar efeitos benéficos ou prejudiciais, diretos ou indiretos nos indivíduos (Pinto et al., 2016). O potencial de ação alelopática é condicionado pelas espécies testadas e sua sensibilidade ocorre pela presença de compostos secundários presentes em cada espécie estudada (Matias, et al., 2018).

Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes e todos os órgãos das plantas têm potencial para armazenar aleloquímicos, mas a quantidade e o caminho pelos quais são liberados para o ambiente diferem de espécie para espécie (Borella et al., (2010), como constatado por Coelho et al., (2011) em *Ziziphus joazeiro* e Oliveira et al., (2012) com *Erythrina velutina*.

A alface está entre as espécies-teste mais utilizadas em ensaios de alelopatia, correspondendo a 24 % em relação as e isso ocorre, possivelmente, por e ser uma espécie com rápida germinação, crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e, insensibilidade aos potenciais osmóticos das soluções (Silva et al., 2018).

As pesquisas sobre alelopatia vêm ganhando maior espaço no meio científico ao longo dos anos, ocorrendo o aumento no número de trabalhos publicados, sendo o bioma Cerrado o que representa predomínio das espécies estudadas para este fim (Silva et al., 2018).

Kielmeyera coriacea é uma espécie típica do Cerrado, conhecida popularmente como pau-santo, sendo utilizada pela medicina popular no tratamento de doenças tropicais como malária, esquistossomose, infecção por bactérias, fungos, leishmaniose, dentre outras (Pinheiro et al., 2003).

Os extratos e óleos essenciais de *K. coriacea* têm sido estudados e se destacam por apresentarem propriedades fungicidas e atuarem como uma possível fonte de compostos antidepressivos, antiulcerosos, ansiolíticos e antitumor (Caddah, 2011; Lemes et al., 2017). Em estudo recente, Gonçalves et al. (2016) verificaram potencial alelopático no desenvolvimento das plântulas de alface de extratos de folhas de *K. coriacea*.

Assim, o presente estudo teve o objetivo de verificar o potencial alelopático de diferentes órgãos de duas procedências de *K. coriacea* sobre a germinação e crescimento da alface.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes (LAAS) da Faculdade de Agronomia e Zootecnia (FAAZ) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) campus de Cuiabá-MT. Com material botânico de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. coletado de indivíduos adultos de duas procedências, sendo essas, escolhidas, de acordo com a ocorrência e presença da espécie nas áreas.

A primeira procedência é oriunda de uma área particular, situada no condomínio Florada da Serra, no município de Chapada dos Guimarães-MT, cujas coordenadas geográficas são 15°26'720"S e 055°44'800"W, e a coleta ocorreu no mês de julho de 2018. A segunda originária do Jardim Botânico de Brasília-DF (JBB) situado nas coordenadas geográficas 15°53'192"S e 047°51'568"W, e a coleta ocorreu no mês de agosto de 2018. Ambas regiões possuem clima do tipo Aw, segundo classificação Köppen.

Antes do preparo do extrato, o material botânico utilizado passou por assepsia permanecendo por 5 minutos em recipiente contendo 2% de hipoclorito de sódio, sendo posteriormente lavado em água destilada e seco com papel toalha. Em seguida, o material vegetal foi triturado em liquidificador, na proporção de 50 g de material vegetal para 1.000 mL de água destilada, logo em seguida, filtrado em papel filtro comum. Todos os extratos foram preparados na concentração 75% ou seja, 750 mL de extrato mais 250 mL de água destilada para atingir 1.000 mL.

Após o preparo, os extratos ficaram armazenados durante 48 horas em béqueres revestidos com papel alumínio e temperatura de cerca de 18°C. Ao final do preparo foram medidos a condutividade elétrica e o pH da solução. A partir dos valores de condutividade elétrica (CE) determinou-se o potencial osmótico (P.O) de acordo com a fórmula proposta por Ayers e Westcot (1999): Potencial osmótico, em atmosfera (atm) = - 0,36 x CE. Os dados em atm foram transformados para Mega Pascal (MPa).

O extrato do material botânico procedente de Chapada dos Guimarães-MT foi preparado imediatamente após a coleta, enquanto o material botânico do Jardim Botânico de Brasília-DF foi armazenado em gelo durante o transporte até o laboratório onde se efetuou o preparo.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Os diferentes órgãos da planta de cada procedência foram utilizados na obtenção dos extratos (tratamento), sendo eles: T1-extrato das folhas jovens verdes; T2-extrato do pericarpo de frutos verdes; T3-extrato das sementes inteiras (com embrião + alas); T4-extrato da cortiça (parte externa); T5-extrato do córtex (parte interna); T6-extrato do pericarpo de frutos maduros abertos em dispersão; T7-extrato testemunha (água destilada).

Em cada bioensaio foram utilizadas 50 sementes de alface, as quais foram colocadas em caixas plásticas transparentes tipo gerbox (11x11x3 cm) sobre duas folhas

de papel mata-borrão umedecidas com os extratos de cada tratamento, na quantidade de duas vezes e meia a massa seca do papel. As caixas foram tampadas e vedadas com filme plástico e, mantidas em incubadora do tipo B.O.D a 20 °C, em fotoperíodo de 12 horas.

Diariamente anotou-se o número de sementes germinadas para determinação do tempo médio de germinação (TMG) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG). O tempo médio de germinação foi calculado a partir da fórmula $TMG = (\sum ni ti) / \sum ni$; em que: ni = número de sementes germinadas por dia, ti = tempo de incubação, $i = 1 \square 7$ dias. O índice de velocidade de germinação foi determinado pela expressão: $IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$, onde: G_1 = número de sementes germinadas na primeira contagem, N_1 = número de dias decorridos até a primeira contagem, G_2 = número de sementes germinadas na segunda contagem, N_2 = número de dias decorridos até a segunda contagem, n = última contagem.

Transcorridos sete dias após a instalação do experimento, as plântulas da alface foram classificadas em normais ou anormais de acordo com as especificações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Para tanto foram consideradas anormais aquelas que não mostraram potencial para continuar o desenvolvimento, com sistemas radiculares ou aéreos apodrecidos, ausentes ou totalmente atrofiadas, e normais, plântulas com pequenos defeitos como danos limitados ou pequenos, retardamento no crescimento no sistema radicular ou sem defeitos. Com esses dados calculou-se a porcentagem de plântulas anormais.

Em seguida, as plântulas normais foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e comprimento da raiz. Obtendo-se também a massa fresca mediante a pesagem das plântulas em balança analítica. A massa seca foi obtida depois da secagem das plântulas em estufa de circulação de ar a 60 °C durante 72h, com apresentação dos valores em gramas.

O índice de efeito alelopático foi calculado de acordo com a fórmula: $RI = 1 - C/T$ ($T \geq C$) ou $RI = T/C - 1$ ($T < C$), onde: C = velocidade de germinação do controle e T = velocidade de germinação do tratamento (Gao et al., 2010).

Todas as variáveis do estudo foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos extratos

O pH e o potencial osmótico dos extratos aquosos de *K. coriacea* de Chapada dos Guimarães e do Jardim Botânico de Brasília se enquadraram na faixa considerada ideal para germinação. Segundo Gatti et al. (2010) soluções com potencial osmótico menores ou próximos de -0,2 MPa não interferem na germinação de aquênios de alface e o pH ideal fica

na faixa entre 4 e 7. Assim, pode-se considerar que a acidez do extrato e a concentração de solutos não interferiram nos resultados (Tabela 1).

Extratos aquosos	Chapada dos Guimarães		Jardim Botânico de Brasília	
	pH	P.O (MPa)	pH	P.O (MPa)
Folhas	4,29	-0,0163	4,00	-0,0137
Pericarpo do fruto verde	5,45	-0,0207	4,36	-0,0173
Sementes	6,70	-0,0061	6,00	-0,0211
Cortiça	6,50	-0,0044	6,78	-0,0041
Córtex	6,25	-0,0134	6,12	-0,0148
Pericarpo do fruto seco	5,00	-0,0442	5,79	-0,0182
Testemunha	7,00	-0,0002	7,00	-0,0002

Tabela 1. Características físico-químicas dos extratos aquosos de diferentes órgãos de *Kielmeyera coriacea* procedentes de Chapada dos Guimarães e do Jardim Botânico de Brasília. pH* (potencial Hidrogeniônico), P.O (potencial osmótico).

Os extratos aquosos podem apresentar solutos que alteram as propriedades da água, resultando em pressão osmótica diferente de zero na solução (Villela et al., 1991). Assim, o controle de pH e da concentração do extrato é fundamental para a realização de ensaios alelopáticos, uma vez que podem estar presentes substâncias como açúcares e aminoácidos, entre outros (Taiz et al., 2017).

Procedência de Chapada dos Guimarães - MT

Não houve diferença significativa para a porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e raiz, massa seca da plântula e IVG, mas verifica-se que a porcentagem de plântulas anormais e o tempo médio de germinação foram afetados pelos extratos de *K. coriacea* (Tabela 2).

Fonte de Variação	GL	PG	PA	CPA	CRA	MSP	TM	IVG
Tratamentos	6	314,86	2,30'	0,098 ^{ns}	0,137 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,622'	1,31 ^{ns}
Erro	17	379,58	0,497	0,053	0,147	0,001	0,296	1,06
CV (%)		23,88	38,49	13,57	32,45	3,52	12,67	18,38

Tabela 2. Quadrado médio da porcentagem de germinação (PG), porcentagem de plântulas anormais (PA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRA), massa seca da plântula (MSP), tempo médio de germinação (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG).

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ^{ns} não significativo

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento da plântula, pois as substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns (Taiz et al., 2017). A presença de anormalidade em raízes parece ser um bom indicativo de alelopatia, pois este órgão é mais sensível à ação alelopática que a parte aérea.

A porcentagem de germinação da alface foi alta e variou de 65 e 90,50%. A porcentagem de plântulas anormais e o tempo médio de germinação foram maiores no extrato de pericarpo do fruto seco de *K. coriacea* (Tabela 3).

Extratos aquosos	PG %	PAN* %	CPA* cm	CRA cm	MSP mg	TM* dias	IVG
Folhas	78,5A	6,6(2,7) AB	1,15(1,46) A	1,12 A	1,01 A	4,44(2,33) AB	5,39 A
Pericarpo do fruto verde	90,5A	6(2,4) AB	2,24(1,79) A	1,18 A	1,02 A	4,25(2,29) AB	5,94 A
Sementes	89,0A	5(2,3) AB	2,60(1,88) A	1,43 A	1,04 A	4,12(2,26) AB	6,02 A
Cortiça	90,0A	5(2,3) AB	2,38(1,83) A	1,29 A	1,04 A	3,70(2,16) B	6,25 A
Córtex	73,3A	5,3(2,3) AB	2,16(1,74) A	0,94 A	1,09 A	4,31(2,30) AB	5,39 A
Pericarpo do fruto seco	65,0A	16(3,9) A	1,17(1,46) A	0,79 A	1,02 A	5,29(2,50) A	4,16 A
Testemunha	72,0A	0(1,0) B	1,70(1,63) A	1,29 A	1,03 A	4,49(2,34) AB	5,16 A

Tabela 3. Porcentagem de germinação (PG), porcentagem de plântulas anormais (PA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRA), massa seca da plântula (MSP), tempo médio de germinação (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG) de plântulas de alface em extrato aquoso de diferentes órgãos de plantas de *Kielmeyera coriacea* procedentes de Chapada dos Guimarães, MT. 2018.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey.

*Entre parênteses estão os valores originais transformados em raiz de quadrada de $(x+1)$

O aumento no tempo médio de germinação pode ser vantajoso pois se a germinação das sementes sofre atraso, pode não haver desenvolvimento satisfatório das plantas, o que torna o controle químico exercido pelos compostos alelopáticos uma opção ecologicamente correta de controle de plantas invasoras, uma vez que assim não há necessidade de utilização de herbicidas sintéticos, diminuindo os impactos sobre o meio ambiente e para o ser humano, causados pelo uso de compostos sintéticos na agricultura (Inoue et al., 2010).

O índice de atividade alelopática indica estímulo de crescimento quando apresenta valores positivos em relação à testemunha e inibição do crescimento quando apresentam valores negativos (Gao et al., 2009). O índice alelopático negativo ocorreu no extrato do pericarpo do fruto seco (T6), indicando que esse extrato inibiu o crescimento e desenvolvimento das plântulas de alface, enquanto que, nos demais extratos o índice alelopático foi positivo, indicando estímulo e crescimento (Figura 1).

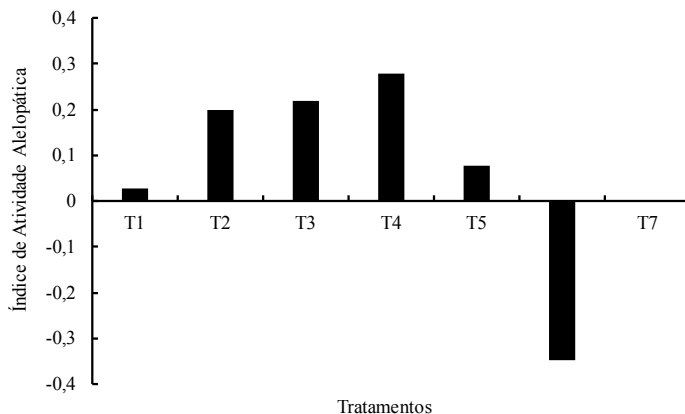


Figura 1. Índice alelopático de *Kielmeyera coriacea* procedente de Chapada dos Guimarães-MT: T1-folhas, T2-pericarpo do fruto verde, T3-sementes, T4-cortiça, T5-córtex, T6-pericarpo do fruto seco, T7-testemunha (água destilada).

Dados semelhantes aos encontrados no presente estudo, em que houve alto índice de germinação das sementes de *L. sativa*, foram observados em extrato de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, que estimulou a germinação e crescimento das plântulas de *L. sativa* (Turnes et al. 2014) e nos extratos aquosos de frutos e folhas de *Pityrocarpa moniliformis* que não afetaram a germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia*, entretanto provocaram efeito alelopático negativo sobre a velocidade e o crescimento inicial das plântulas de *M. caesalpiniiifolia* (Pacheco et al., 2017).

Procedência do Jardim Botânico de Brasília

Os efeitos alelopáticos dos extratos de *K. coriacea* foram significativos para a porcentagem de plântulas anormais de alface e as demais características não foram afetados pelos extratos (Tabela 4).

Fonte de Variação	GL	PG	PA	CPA	CRA	MSP	TM	IVG
Tratamentos	6	120,90 ^{ns}	2,62*	0,29 ^{ns}	0,070 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,40 ^{ns}	69,94 ^{ns}
Erro	17	62,23	0,66	0,77	0,075	0,0009	0,38	46,81
CV (%)		9,11	31,66	38,66	31,55	35,02	15,76	18,78

Tabela 4. Quadrado médio da porcentagem de germinação (PG), porcentagem de plântulas anormais (PA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRA), massa seca da plântula (MSP), tempo médio de germinação (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG).

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ns não significativo

A porcentagem de germinação de alface variou de 78 a 92%, a porcentagem de plântulas anormais foi mais alta no extrato de sementes e as demais características não

apresentaram variação entre os extratos (Tabela 5).

Extrato aquoso	PG %	PAN cm	CPA cm	CRA cm	TMG dias	IVG
Folhas	90,0 A	4,5 BC	2,11 A	0,75 A	4,0 A	37,98 A
Pericarpo do fruto verde	78,0 A	4,5 BC	2,36 A	0,73 A	3,31 A	29,81 A
Sementes	85,0 A	14,5 A	2,81 A	1,06 A	3,57 A	40,71 A
Cortiça	88,5 A	11,5 AB	2,36 A	0,73 A	3,59 A	37,52 A
Córtex	92,0 A	5,5 ABC	2,1 A	0,93 A	3,64 A	39,25 A
Pericarpo do fruto seco	92,0 A	4,0 BC	2,2 A	0,97 A	4,04 A	38,52 A
Testemunha	81,0 A	2,0 C	1,9 A	0,90 A	4,30 A	31,26 A

Tabela 5. Porcentagem de germinação (PG), porcentagem de plântulas anormais (PA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CRA), massa seca da plântula (MSP), tempo médio de germinação (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG) de plântulas de alface em extrato aquoso de diferentes órgãos de plantas de *Kielmeyera coriacea* procedentes do Jardim Botânico de Brasília. 2018.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey.

*Entre parênteses estão os valores originais transformados em raiz de quadrada de $(x+1)$

As plântulas anormais apresentaram-se deformadas, com raízes necrosadas e inversão do gravitropismo, como também observaram Coelho et al. (2011) com extratos aquosos de sementes de juazeiro e Oliveira et al (2012) com extratos de cascas e flores de *Eritryna mulungu*.

O índice alelopático negativo na germinação da alface ocorreu apenas ao se utilizar o extrato do pericarpo do fruto verde (T2), indicando que esse extrato inibiu o crescimento e desenvolvimento dessas plântulas, enquanto que, nas plântulas submetidas aos demais extratos, o efeito alelopático foi positivo, indicando estímulo (Figura 2).

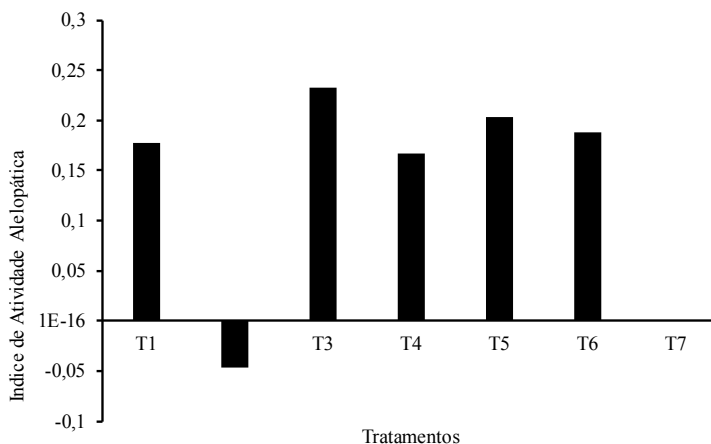


Figura 2. Índice de atividade alelopática de *Kielmeyera coriacea* procedente do Jardim Botânico de Brasília, em Brasília – DF. T1-folhas, T2-pericarpo do fruto verde, T3-sementes, T4-cortiça, T5-córtex, T6-pericarpo do fruto seco, T7-testemunha (água destilada).

Resultados semelhantes com o índice de efeito alelopático foram observados com extratos de *Siparuna guianensis* em alface (Gonçalves et al., 2017), de *Kielmeyera coriacea* em alface (Gonçalves et al., 2016), de *Himatanthus obovatus* em alface (Gonçalves et al., 2015) e *Ziziphus joazeiro* em milho, melão e feijão (Oliveira et al., 2014).

Souza Filho (2014) relata alguns exemplos de espécies nativas brasileiras que apresentam forte atividade alelopática e enfatiza a importância de estudos com esse tema considerando as novas e incentivadas formas de exploração agrícola, como os sistemas agroflorestais e silvipastoris. Nestes sistemas, as plantas arbóreas são cultivadas em consórcio com culturas anuais ou frutíferas, assim, há grandes possibilidades de interações alelopáticas dentro da comunidade vegetal, e podem afetar o desenvolvimento de plantas com interesse comercial primário. Além disso, poderá fornecer compostos bioativos para o controle de plantas invasoras.

CONCLUSÕES

A germinação de sementes de alface não é afetada pelos extratos das duas procedências.

A porcentagem de plântulas anormais e o tempo médio de germinação são maiores no extrato do pericarpo do fruto seco de Chapada dos Guimarães. O extrato de sementes do Jardim Botânico de Brasília causa alta porcentagem de plântulas anormais.

O extrato do pericarpo do fruto seco de Chapada dos Guimarães e o pericarpo do fruto verde do Jardim Botânico de Brasília têm índice alelopático negativo.

Os extratos de folhas, sementes, cortiça e córtex têm potencial alelopático

positivo e estimulante no crescimento e desenvolvimento de plântulas da alface nas duas procedências.

REFERÊNCIAS

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **Water quality for agriculture**. FAO, Roma, Itália. 1999. 97p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CADDAH, M. K. et al. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 168, n. 1, p. 101-115, 2011.

COELHO MFB; MAIA SSS; OLIVEIRA AK; DIÓGENES FEP. 2011. Atividade alelopática de extrato de sementes de juazeiro. *Horticultura Brasileira* 29: 108-111.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. In: Revista symposium. p. 36-41. 2014.

GAO X.; LI M.; GAO Z.; LI C.; SUN Z. Allelopathic effects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. **Weed Biology and Management**, v. 9, p. 243-249, 2009.

GATTI, A. B. et al. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotelochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Botanica Brasiliica*, v. 24, n. 2, p. 454-461, 2010.

GONÇALVES, V. D.; CAMILI, E. C.; COELHO, M. F. B. Allelopathic potential of *Himatanthus obovatus* leaf extract on lettuce germination. **Journal of Global Biosciences**, v. 4 p. 2985-2989, 2015.

GONÇALVES, V. D.; CAMILI, E. C.; COELHO, M. F. B. Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Revista Internacional de Ciências**, v. 6, p. 160-170, 2016.

GONÇALVES, V. D.; CAMILI, E. C.; COELHO, M. F. B.; PITON, L. P.; AZEVEDO, R. A. B. Bioassay to evaluate the allelopathic potential of leaves of *Siparuna guianensis* Mart. & Zucc. **International Journal of Agriculture and Environmental Research**, v. 3, p. 2302-2309, 2017.

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E.; PEREIRA, M. J. B.; PEREIRA, K. M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: Efeitos sobre plantas daninhas. *Planta Daninha, Viçosa*, v. 28, n. 3, p. 489-498, 2010.

LEMES, R. S. et al. Óleos essenciais dos frutos e folhas de *Kielmeyera coriacea*: atividade antitumoral e estudo químico. *Rev Virtual Quim*, v. 9, p. 1245-1257, 2017.

MATIAS, R. et al. Potencial alelopático do extrato etanólico de *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado) na germinação e formação de plântulas de alface, tomate e fedegoso. *Gaia Scientia*, v. 12, n. 2, 2018.

OLIVEIRA, A. K. et al. Alelopatia de extratos de diferentes órgãos de mulungu na germinação de alface. *Horticultura Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 480-483, 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; COELHO, M. F. B.; DIÓGENES, F. E. P.; TORRES, S. B.; AZEVEDO, R. A. B. Germination of maize, cowpea and melon under seed extracts of *Ziziphus joazeiro*. **Journal of Global Biosciences**, v. 3, p. 1094-1101, 2014.

PACHECO, M.V.; FELIX, F.C.; MEDEIROS, J.A.D.; NUNES, S.L.; CASTRO, M.L.L.; LOPES, A.L.S.; SOUZA, W.M.A.T. Potencial alelopático dos extratos de folhas e frutos de *Pityrocarpa moniliformis* sobre a germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Agroecosistemas, v. 9, n. 2, p. 250 – 262, 2017.

PINHEIRO, Lucimar et al. Antibacterial xanthones from *Kielmeyera variabilis* mart.(Clusiaceae). *Memórias do instituto oswaldo cruz*, v. 98, n. 4, p. 549-552, 2003.

PINTO, E. do N. F. et al. Crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) em solo oriundo de um povoamento de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 11, n. 2, p. 33-38, 2016.

SILVA, E. S. et al. Cenário das pesquisas sobre alelopatia no Brasil e seu potencial como estratégia na diminuição da utilização de pesticidas que provocam poluição ambiental: uma revisão integrativa. *Diversitas Journal*, v. 3, n. 2, p. 442-454, 2018.

SOUZA FILHO, A. P. S. Alelopatia: princípios básicos e mecanismos de interferências. In: Monquero, P.A. **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. Rima, São Carlos, Brasil. 2014. 430p

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOELLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 2017. 888p.

TURNES, J.M., BONETTI, A.F., KRAUSE, M.S., CANTELI, V.C.D., PAULA, C.S., DUARTE, M.R., ZANIN, S.M.W., DIAS, J.F.G., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae. *Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada*; 35(3):459-467,2014

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968,1991.

CAPÍTULO 14

RELATOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 29/10/2021

Eduardo Henrique Santos Guedes

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi - TO
<http://lattes.cnpq.br/7033782840996923>

André Leonardo dos Santos

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Seropédica - RJ
<http://lattes.cnpq.br/2466938040003278>

Andréia Ibiapina

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - TO
<http://lattes.cnpq.br/3809206567442725>

Camila Mariane da Silva Soares

Universidade Federal de Lavras
Lavras - MG
<http://lattes.cnpq.br/5493759969452726>

Aynaran Oliveira de Aguiar

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - TO
<http://lattes.cnpq.br/2183503410111466>

Patrícia Oliveira Vellano

Universidade do Norte do Paraná
Centro Universitário Tocantinense- Presidente
Antônio Carlos
Araguaína - TO
<http://lattes.cnpq.br/9931168383019751>

Lucas Samuel Soares dos Santos

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi - TO

<http://lattes.cnpq.br/7420913912477527>

Gessiel Newton Scheidt

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi - TO
<http://lattes.cnpq.br/6662648331555347>

Marcos Giongo

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi - TO
<http://lattes.cnpq.br/5712134838373036>

Aloísio Freitas Chagas Junior

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi - TO
<http://lattes.cnpq.br/9286795171322846>

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi realizar uma pesquisa bibliográfica sobre a utilização de resíduos agroindústrias como substrato para produção de lipase microbiana, identificando os principais microrganismos, tempo de fermentação e a inclusão de indutores ao meio. Trinta trabalhos foram selecionados e formaram um banco de dados. Pesquisas no Brasil representaram 60% das publicações utilizadas, o resíduo (torta e borra) de dendê e soja foram os mais relatados representando 13,3%, os fungos filamentosos foram os mais estudados, o gênero *Aspergillus* foi o mais encontrado totalizando 36,6% e em especial a espécie *A. niger*, que foi estudada por oito pesquisadores. Em relação ao tempo, as fermentações variaram de 20 a 336 h, sendo que o tempo de 48 h foi utilizado por sete pesquisadores. Dentre as 30 publicações foi possível verificar que em 13 (43%) delas os autores não utilizaram nenhum tipo de

indutor para suplementar o resíduo agroindustrial, porém a utilização de fontes lipídicas e principalmente de nitrogênio aumentaram significativamente a produção de lipase. A maioria das pesquisas foram conduzidas em FES (73,3%). Utilizar resíduos agroindustriais e suplementar o meio com indutores com preços mais baixos, além de potencializar a produção pode tornar o produto final mais barato.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase, Microrganismos, Fermentação, Resíduo agroindustrial.

REPORTS ON THE USE OF AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AS A SUBSTRATE TO PRODUCE MICROBIAL LIPASES

ABSTRACT: The objective of this work was to carry out bibliographic research on the use of agro-industrial waste as a substrate to produce microbial lipase, identifying the main microorganisms, fermentation time and the inclusion of inducers in the medium. Thirty papers were selected and formed a database. Research in Brazil accounted for 60% of the publications used, the palm oil and soy residue (cake and sludge) were the most reported representing 13.3%, the filamentous fungi were the most studied, the *Aspergillus* genus was the most found totaling 36.6 % and the species *A. niger*, which was studied by eight researchers. Regarding the time, fermentations ranged from 20 to 336h, and the time of 48 h was used by seven researchers. Among the 30 publications it was possible to verify that in 13 (43%) of them the authors did not use any type of inducer to supplement the agro-industrial residue, however the use of lipid sources and mainly of nitrogen significantly increased the production of lipase. Most surveys were conducted in solid state fermentation (FES) (73.3%). Using agro-industrial waste and supplementing the environment with lower priced inducers, in addition to boosting production can make the final product cheaper.

KEYWORDS: Lipase, Microorganisms, Fermentation, Agro-industrial waste.

11 INTRODUÇÃO

A agroindústria e a indústria de alimentos são as maiores produtoras de resíduos líquidos e sólidos, com isso esses dejetos representam um grande problema quanto ao tratamento final e potencial poluente. Porém a conscientização ecológica vem mudando ao longo dos tempos e, ao contrário do que acontecia no passado, os resíduos agroindustriais passaram a ser considerados subprodutos de alto valor agregado, não sendo mais destinado aos aterros sanitários, ração animal ou adubo, pois passaram a ser vistos como subprodutos ricos em biomassa com nutrientes de alto valor (PINTO et al., 2005).

Utilizando técnicas biotecnológicas, os resíduos agroindustriais podem se converter, através de microrganismos, em bioprodutos de grande interesse industrial, como as enzimas através das fermentações em estado sólido ou fermentações submersas (FARIAS et al., 2014).

Atualmente a fermentação em estado sólido (FES) vem sendo a mais utilizada, pois muitos subprodutos agroindustriais podem ser aproveitados como substratos para a produção de enzimas, tal fato está relacionado principalmente por colaborar para a redução do custo operacional da produção enzimática e dispor de atributos físicos e químicos que

beneficiam o crescimento microbiano (FERREIRA et al., 2011). A figura 1 exemplifica a fermentação em estado sólido do bagaço do cajá como substrato pelo *Bacillus* sp. para produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas .



Figura 1 - Fermentação em estado sólido do bagaço do cajá como substrato pelo *Bacillus* sp.

Fonte: ANDRADE et al. (2018)

Segundo Treichel et al. (2010), utilizar resíduos agroindustriais fornece opções em substratos e podem auxiliar a resolver problemas de poluição, que caso contrário, pode ser causado pela sua eliminação, dessa forma é essencial a escolha de um bom resíduo pois seu potencial é um dos fatores mais importantes no processo fermentativo, além do mais a escolha está relacionada ao custo e a sua disponibilidade e ainda à natureza do composto para produzir a enzima de interesse.

Por possuírem açúcares, fibras, materiais hidrolisáveis e fermentáveis, houve um interesse em valorizar os resíduos e assim novos olhares foram conferidos a folhas, caules, sementes, palhas, bagaços, cascas, farelos, polpas, águas residuais e outros, tornando-se subprodutos com valor agregado e em substituição de substratos comumente utilizados (TAKEYAMA et al., 2020).

Os microrganismos, como bactérias, leveduras e bolores, são reconhecidos como potenciais em produção de lipases extracelulares (TREICHEL et al., 2010). Os principais gêneros produtores de lipases são fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus* (PENHA et al., 2016), as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Staphylococcus* e leveduras como a *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomycopsis* (LIU & KOKARE, 2017).

As lipases são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres (GUPTA et al., 2004). Por isso são empregadas em setores industriais distintos, como na produção de surfactantes, detergentes e tratamento de

resíduos ricos em óleos e gorduras na indústria química, nas ciências da saúde compõe medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos e bastante utilizada no setor alimentício na formulação de emulsificantes, conversão de lipídios, elaboração de margarinas e na produção de aromas e maturação de queijos e embutidos cárneos, no setor ambiental para a produção de biodiesel (COLLA et al., 2012). A figura 2 apresenta a hidrólise de um triglicerídeo por uma lipase.

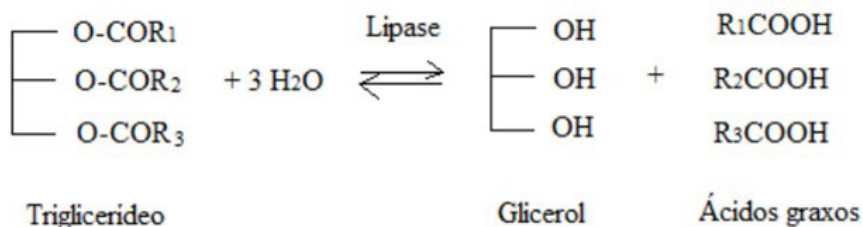


Figura 2 - Hidrólise de um triglicerídeo por lipase convertidos em glicerol e ácidos graxos.

Fonte: GOPINATH et al., 2013.

Vários autores vêm propondo a utilização de resíduos agroindustriais como resíduos popularmente chamado de torta de dendê (SILVEIRA et al., 2015), farelo de arroz (PUTRI et al., 2020), farelo de trigo (DOBREV et al., 2018) torta do óleo de canola (REHMAN et al., 2019) dentre outros resíduos como indutores para a produção de enzimas. Alguns desses resíduos estão representados na figura 3 abaixo.



Figura 3 - Resíduos agroindustriais utilizados como substrato para a produção de celulases, 1- farelo de soja, 2- bagaço de cana, 3- bagaço de laranja e 4- casca de arroz.

Fonte: FARINAS et al. 2008.

Deste modo o objetivo desse estudo é reunir e fornecer informações acerca de publicações sobre a utilização de resíduos agroindústrias que foram utilizados como substrato para produção de lipase, identificando os principais resíduos, microrganismos, tempo de fermentação e a utilização de indutores suplementares por meio de uma revisão crítica da literatura, como também identificar aspectos pouco explorados cientificamente.

2 | METODOLOGIA

2.1 Seleções dos trabalhos

Este estudo trata-se um uma pesquisa quantitativa exploratória de revisão da literatura utilizando a técnica de mineração de dados como procedimento metodológico objetivando um conhecimento de produções científicas (PEREIRA et al., 2018).

Os bancos de dados são um conjunto digital que contém artigos em periódico, livros, notas técnicas, publicados com resultados das pesquisas de autores. Segundo Ruas (2014) o processo de Extração de Conhecimento em base de dados é conhecido como KDD (*Knowledge Discovery in Databases*) que visa coletar dados que tenham afinidade de interesse por assunto como também ser valido para cada dado encontrado.

Para a coleta de trabalhos publicados na literatura foram utilizados os principais bancos de dados: Web of Science, Google Acadêmico, Scopus, Scienc Direct, Periódico CAPES, e PubMed. O levantamento foi realizado no período de agosto a setembro de 2020, no qual foram utilizadas palavras-chaves em inglês e português, como “Lipase”, “Produção” e “Resíduo Agroindustrial”.

2.2 Refinamento dos dados

Como critério de seleção foi empregado: I- Data de publicação (2010 a 2020), apenas artigos originais e em idioma inglês; II-Trabalhos que informassem sobre a produção lipolítica sobre fermentação em estado sólido ou submerso em resíduos agroindustriais; e III- Informou-se também o tempo de fermentação e a utilização ou não de substâncias indutoras ou para suplementação do meio. O critério de exclusão aplicou-se aos trabalhos que não abordassem as exigências dos critérios de inclusão.

2.3 Organização dos dados e realização das análises

Após a reunião dos artigos foi realizada uma leitura do resumo para selecionar aquele que dispuserem de informações correntes com o intuito do trabalho e posteriormente foram codificados e filtrados.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa bibliográfica utilizada neste estudo foi baseada na consulta de trabalhos publicados nos últimos 10 anos de acordo com as palavras-chaves e base de dados.

Mediante a análise dos trabalhos, foram selecionadas obras que apresentaram resultados expressivos, utilizando metodologias de otimização ou não, de valores máximos de atividade lipolítica. Foram selecionadas 30 publicações sobre a utilização de resíduos agroindústrias para a produção de lipase microbiana. A figura 4 apresenta a porcentagem e origem das publicações selecionadas.

Dentre as 30 publicações selecionadas, 60% foram pesquisas realizadas no Brasil, 20% na Índia, 6,6% Paquistão e Indonésia, outros 3,3% na Bulgária e Sérvia. O Brasil se destaca como o maior gerador dentre as publicações selecionadas, pois o crescimento do agronegócio, além de incentivar o desenvolvimento o torna um grande produtor de resíduos agropecuárias e agroindústrias, seja pela perda na produção e também dos materiais gerados na cadeia produtiva, tornaram-se uma fonte importante para a produção de novos materiais (ROSA et al. 2011).

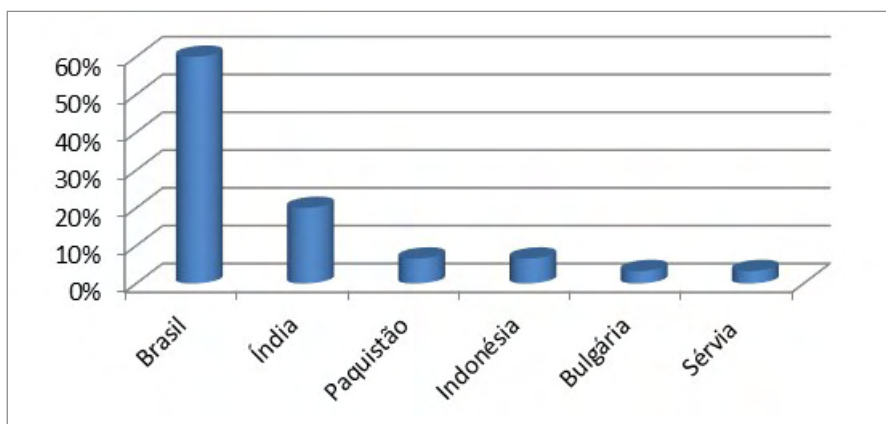


Figura 4 - Origem das publicações científicas selecionadas de acordo com critérios estabelecidos.

Fonte: AUTORES, (2020).

Pelo cenário próspero vários setores indústrias estão pesquisando novas técnicas para aproveitar e valorizar os resíduos e subprodutos da agroindústria, a tecnologia enzimática vem utilizando esses resíduos para a produção de enzimas de interesse industrial e biotecnológico (SANTOS et al., 2018). No período pesquisado entre 2010 e 2020, os anos de 2016 e 2018 foram aqueles que apresentaram um maior número de publicações sobre o assunto, seis e oito publicações respectivamente. Rosa et al. (2011), destacam o interesse por fontes renováveis para desenvolver e implementar processos mais sustentáveis e apropriados para transformar biomassa em produtos valiosos, pois é uma necessidade

na tentativa de reduzir impactos ambientais, justifica-se assim o aumento nos últimos 10 anos em relação à pesquisa sobre o aproveitamento desses resíduos.

3.1 Resíduos agroindustriais utilizados como substratos para produção de lipase

Uma variedade de resíduos foi encontrada nas publicações, sendo o resíduo oriundo da obtenção do azeite de dendê (torta) e farelo de soja os mais relatados dentre as pesquisas ambos representando 13,3%, entretanto outros resíduos merecem destaques pela sua boa aplicabilidade como substrato como farelo de arroz que representou 10% na pesquisa. A figura 5 ilustra a diversidade dos resíduos mais utilizados pelos pesquisadores.

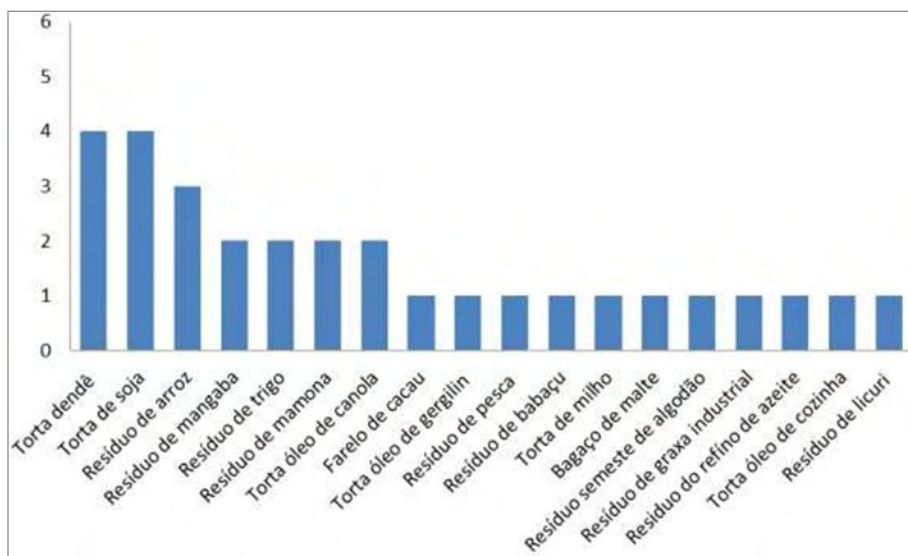


Figura 5 - Dimensão dos resíduos agroindustriais mais utilizados como substrato para produção de lipase microbiana.

Fonte: AUTORES (2021).

Os resíduos do dendê são utilizados em sua grande maioria para a alimentação animal principalmente para dietas de peixes em países como a Índia, por apresentarem altos valores de fibra, proteína, óleo residual, carboidratos, cinzas e água, ademais representam um grande problema ambiental (PENHA et al., 2016; SARAT et. al., 2010). A figura 6 representa a fibra do mesocarpo de dendê utilizada nos estudos de Leitão et al. (2012), fornecida pela Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA.

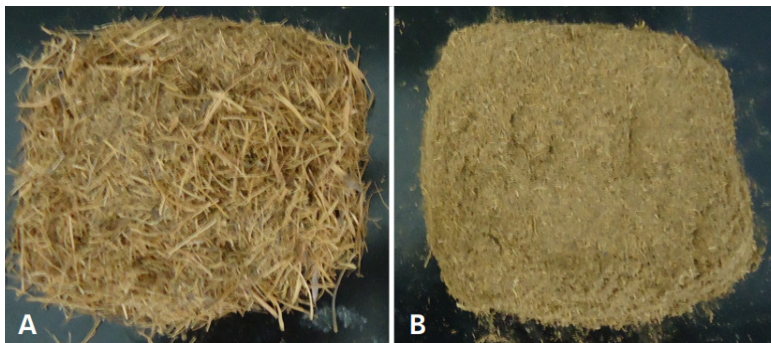


Figura 6 - Fibra do mesocarpo de dendê in natura (A) e moída e peneirada (B).

Fonte: LEITÃO et al. (2012)

Dessa maneira autores como Oliveira et al. (2018), Penha et al. (2016), Silveira et al., (2015) e Sarat et al. (2010), utilizaram os resíduos provenientes da produção do azeite de dendê como substrato principal para a produção de lipases e obtiveram resultados equivalentes a 20,7, 72,5, 15,4 e 6,4 U g⁻¹ de atividade máxima lipolítica respectivamente.

Em seguida, os farelos de soja (4 publicações) e arroz (3 publicações) foram explorados por outros autores, demonstrando assim, que possuem grande potencial na produção de lipase por apresentar altos valores de proteína bruta, lipídeos e carboidratos. Autores como Oliveira (2014), Farias et al. (2015), Tombini et al. (2015), Júnior et al. (2016), Costa et al. (2017) e Putri et al. (2020), encontraram bons resultados em relação a atividade máxima lipolítica destes resíduos, que chegaram à 176 U g⁻¹.

Por outro lado além do farelo de soja e arroz, Sarat et. al (2010) elucidam que várias pesquisas nos últimos anos vem utilizando diversos resíduos agrícolas, que são renováveis e abundantemente disponíveis e podem contribuir com agregação de valor, como exemplo a torta do óleo de babaçu e gergelim que têm sido usados como substratos para a produção de lipase, comisso fica evidente a aplicabilidade de diversos tipos de resíduos que podem ser utilizados para produção de lipase corroborando com os resultados do estudo que selecionou 18 tipos diferentes de resíduos.

Salihi et al. (2012) alertam que para a produção de lipase usando resíduos fibrosos requer suplementação de nutrientes ou uma mistura de mais de um substrato ou indutores.

3.2 Microrganismos produtores de lipase

Para a produção de lipase a utilização de diversos gêneros microbianos vem aumentando nas últimas décadas devido à grande eficiência que esses organismos possuem em produzir essas moléculas (MARTINS et al., 2015). As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de produzir lipases extracelular, de modo que os dados mostram que os fungos filamentosos representaram 70% dos estudos, seguido pelas leveduras 23,3% e bactérias 6,6%. A Tabela 1 apresenta a proporção das espécies microbianas com

resultados de atividade máxima e o resíduo utilizado com o substrato.

Espécie	Atividade máxima de lipase	Resíduo	Referência
<i>A. brasiliensis</i> ^{FES}	8,1 U g ⁻¹	Bagaço de malte	Eichler (2018)
<i>A. candidus</i> ^{FES}	395,1 U g ⁻¹	Farelo de licuri	Farias et al. (2015)
<i>A. niger</i> ^{FES}	20,7 U g ⁻¹	Dendê*	Oliveira et al. (2018)
<i>A. niger</i> ^{FES}	72,5 U g ⁻¹	Torta de dendê	Penha et. al. (2016)
<i>A. niger</i> ^{FES}	244,9 U g ⁻¹	Semente de mangaba*	Souza et al. (2013)
<i>A. niger</i> ^{FES}	163,3 U g ⁻¹	Farelo de soja*	Prabaningtyas et al. (2018)
<i>A. niger</i> ^{FES}	176 U mL ⁻¹	Farelo de arroz	Putri et al. (2020)
<i>A. niger</i> ^{FES}	77 U g ⁻¹	Dendê	Silveira et al. (2016)
<i>A. niger</i> ^{FES}	11,6 U g ⁻¹	Farelo de cacau*	Amorim et al. (2012)
<i>A. niger</i> ^{FES}	19,8 U g ⁻¹	Farelo de arroz	Costa et al. (2017)
<i>A. oryzae e japonica</i> ^{FES}	25 U g ⁻¹	Mamona*	Jain e Naik (2018).
<i>Bacillus subtilis</i> ^{FS}	15,9 U mL ⁻¹	Pesca*	Aguiar et al. (2018)
<i>Bacillus subtilis</i> ^{FS}	4,9 U mL ⁻¹	Óleo de cozinha	Suci et al. (2016)
<i>Candida Rugosa</i> ^{FES}	22,4 U g ⁻¹	Torta de gergelim	Rajendran e Thangavelu (2013).
<i>Candida rugosa</i> ^{FS}	12,3 U mL ⁻¹	Melaço de soja*	Júnior et al. (2016)
<i>Candida utilisna</i> ^{FES}	25 U g ⁻¹	Torta de azeite	Moftah et al. (2012)
<i>Cryptococcus</i> sp. ^{FES}	753 U g ⁻¹	Semente de algodão*	Thirunavukarasu et al. (2016)
<i>G. candidum</i> ^{FES}	29,4 U g ⁻¹	Torta de milho	Ferreira et al. (2020)
<i>Metarhizium anisopliae</i> ^{FES}	4,4 U mL ⁻¹	Bagaço de babaçu*	Ferraz et al. (2020)
<i>P. chrysogenum</i> ^{FES}	38 U mL ⁻¹	Resíduos de graxa	Kumar et al. (2011)
<i>P. crustosum</i> ^{FES}	136,1 U g ⁻¹	Farelo de arroz	Oliveira et al. (2014)
<i>P. notatum</i> ^{FES}	5335 U g ⁻¹	Torta de canola	Rehman et al. (2011)
<i>P. simplicissimum</i> ^{FES}	155,0 U g ⁻¹	Mamona*	Godoy et al. (2011)
<i>Penicillium</i> sp ^{FES}	73,8 U L ⁻¹	Farelo de soja*	Tombini et al. (2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^{FES}	3256 U g ⁻¹	Torta de canola	Rehman et al. (2019)
<i>Rhizopus arrhizus</i> ^{FES}	1021,8 U g ⁻¹	Farelo de trigo	Dobrev et al. (2018)
<i>Rhizopus oryzae</i> ^{FES}	96.5 U g ⁻¹	Farelo de trigo*	Garlapati & Banerjee (2010)

<i>Yarrowia lipolytica</i> ^{FES}	139 U g ⁻¹	Torta de soja [*]	Farias et al. (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ^{FS}	3,5 U mL ⁻¹	Sementes e cascas de manga [*]	Pereira et al. (2019)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ^{FES}	18,5 U g ⁻¹	Torta de dendê	Sarat et al. (2010)

Tabela 1 - Espécies microbianas produtoras de lipase em diferentes resíduos agroindustriais e seus valores de atividade máximalipolítica.

FS: Fermentação submersa; FES: Fermentação no estado sólido; * Resíduos suplementados com indutores no meio. Fonte: Autores (2021).

Dentre os fungos filamentosos, o *Aspergillus* foi o gênero mais encontrado nas publicações totalizando 36,6% seguido pelo gênero *Penicillium* (20%) e em especial a espécie *A. niger* que foi estudada por 8 pesquisadores. Essa espécie é bastante conhecida e utilizada para a produção de lipase e outros tipos de enzimas extracelulares, comparada às bactérias, por exemplo, possuem propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas que proporcionam suportar e se adaptar em resíduos com baixa umidade crescendo facilmente (SANTOS et al., 2018), tal motivo pode explicar a afinidade dos pesquisadores na escolha de gêneros de fungos filamentosos.

Mesmo sendo o mais estudado dentre os microrganismos o *Aspergillus* não foi o microrganismos mais eficaz na produção de lipases. Utilizando a torta do óleo de canola Rehman et al. (2011) relatam a produção de 5335 U g⁻¹ por *Penicillium notatum*. Vale ressaltar que os mesmos autores, em outra publicação no ano de 2019 utilizando o mesmo substrato, porém a espécie *Pleurotus ostreatus*, encontraram valores expressivos de 3256 U.g¹, tornando-se assim os maiores valores de produção de lipase encontrada dentro das publicações selecionadas.

Entre as leveduras destacam-se os gêneros *Candida* e *Yarrowia* que usualmente são empregadas para produção de lipase, utilizando resíduo da torta de óleo de gergelim Rajendran e Thangavelu (2013) encontraram 22,4 U g⁻¹ utilizando *Candida rugosa*. Já Farias et al. (2015) encontraram 139 U g⁻¹ por *Yarrowia lipolytica* em torta de soja como substrato sendo assim o maior valor para as leveduras estudadas nas publicações.

A espécie *Bacillus subtilis* foi a única espécie de bactéria relatada em 2 publicações produzindo valores de 4,9 U mL⁻¹ por Suci et al. (2016), em resíduo de óleo de cozinha e 15,9 U mL⁻¹ por Aguiar et al. (2018), em resíduos de pesca.

Na literatura, os fungos filamentosos *Rhizomucor meihei*, *Rhizopus oryzae*, *Pencillium camberti*, *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma viride*, *Colletotrichum gloeosporioides*, as leveduras *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida antarctica* *Geotrichium candidum* e as bactérias *Pseudomonas cepacia* *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus*

strains e *Bacillus subtilis* são os mais reportados como bons produtores de lipase (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015; MESSIAS et al., 2011; KUMAR et al., 2011; VAKHLU, 2006). De modo geral fungos filamentosos e levedura são mais promissores para produção de lipase, entretanto como pode ser visto a exploração de espécie conhecidas se tornou corriqueira e repetitiva, faz-se assim a necessidade de busca e exploração de novos microrganismos selvagens que possam ser investigados quanto à produção de lipase utilizando os substratos mais promissores como resíduos de dendê, farelo de soja e arroz.

3.3 Tempo de fermentação e indutores

Um dos critérios para seleção dos trabalhos foi verificar o tempo de fermentação e a utilização ou não de substâncias indutoras ou para suplementação do meio.

Em relação ao tempo, as fermentações variaram em um período de 20 a 336 h, e o tempo de 48 h foi utilizado por 7 pesquisadores. O tempo de incubação é um fator importante para a produção de lipase extracelular, pois em períodos de incubação longos, a atividade da lipase diminuiu, o que pode ser devido ao esgotamento de nutrientes, acúmulo de produtos finais tóxicos e à mudança no pH do meio, ou perda de umidade (SARAT et al., 2010).

Vários pesquisadores relataram diferentes períodos de incubação para a produção ideal de lipase. A atividade máxima da lipase foi alcançada após 48 h de incubação por Penha et al. (2016), com *A. niger*. Rehman et al. (2019) relataram a atividade máxima da lipase por *Pleurotus ostreatus* IBL-02 após 72 h de incubação usando torta de óleo de canola como substrato e suplementando com glicose e ureia. Em outro estudo, a atividade máxima da lipase por *Aspergillus niger* ocorreu após 120 h de incubação (PUTRI et al., 2020). Moftah et al. (2012), obtiveram produção máxima de lipase por *Candida utilisna* após 120 h de incubação.

A obtenção das enzimas pode ocorrer principalmente via fermentação em estado sólido (FES) ou em fermentação submersa (FS). A maioria das pesquisas foram conduzidas em FES 73,3% e 26,7% foram experimentos realizados em fermentação submersa. A FS caracteriza-se pela ausência de água livre, porém, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, esse tipo de fermentação apresenta algumas vantagens como ambientes mais próximos do habitat natural, serve como suporte para crescimento das células microbianas disponibilidade, fonte alternativa com baixo valor comercial, características físicas e químicas que favorecem o crescimento de vários microrganismos, maior distribuição de oxigênio, menos problemas operacionais, equipamento e sistema de controle mais simples (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015; FERREIRA et al., 2011; PINTO et al., 2005), o que afirma a escolha dos autores selecionados por esse tipo de fermentação nos seus experimentos. Oliveira et al. (2013), reportam que os fungos têm maior aptidão em FES pela similaridade de seu ambiente natural, enquanto bactérias e leveduras, devido ao seu caráter unicelular ter maior

habilidade em absorver nutrientes do meio.

Assim, observou-se que o processo de FES utilizando resíduos agroindustriais pode se tornar uma tecnologia vantajosa, pela conversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado, como as enzimas (FERREIRA et al., 2011).

Durante a fermentação alguns parâmetros ambientais são utilizados por diversos autores para otimização do processo como umidade, pH, temperatura e atividade de água. Indutores do meio de cultivo é outro parâmetro bastante empregado para testar o aumento da eficiência dos microrganismos em produzir enzimas de interesse.

O azeite de oliva vem sendo a principal matéria-prima utilizada como indutora na produção de lipase, entretanto produzir lipases em escala industrial utilizando azeite de oliva como indutor sendo ele um produto de alto valor, pode ocasionar um aumento do valor do produto final, assim diversas pesquisas buscam suplementar os meios de cultivo com indutores mais baratos (OLIVEIRA et al., 2013). A figura 7 apresenta as publicações na qual se utilizou ou não indutores no meio de cultivo para potencializar a produção de lipase.

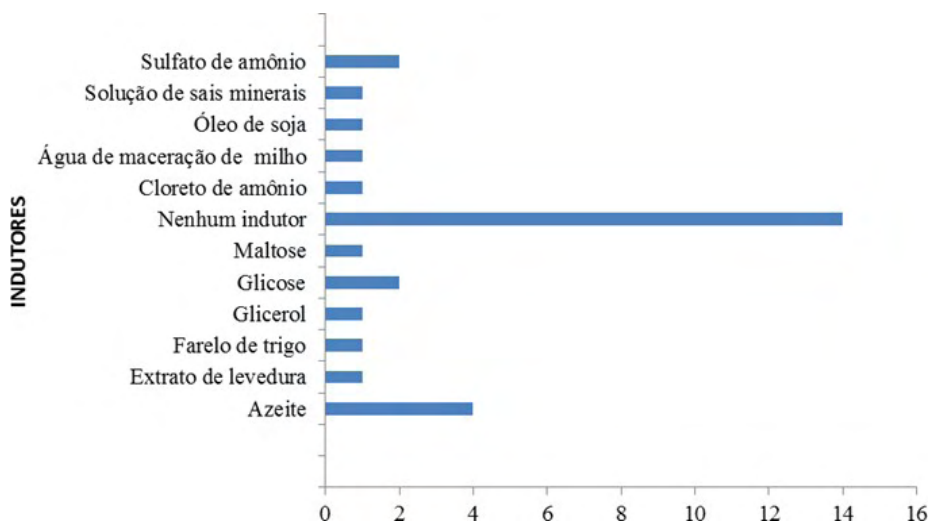


Figura 7 - Proporção das publicações em relação à utilização de indutores.

Fonte: AUTORES (2021).

Dentre as 30 publicações foi possível verificar que 14 (46,3%) delas os autores não utilizaram nenhum tipo de indutor para suplementação do meio, ou seja, os resíduos agroindustriais por si só foram substratos eficientes nutricionalmente para os microrganismos, entretanto é possível verificar a utilização de azeite de oliva em quatro publicações para induzir a produção enzimática como também a utilização de fontes de nitrogênio como sulfato de amônio, extrato de levedura e cloreto de amônio, solução de sais.

Na maioria dos experimentos conduzidos pelos autores selecionados as máximas

atividades lipolíticas foram encontradas quando se utilizou os indutores supracitados. Excluindo-se o azeite de oliva pelo seu auto valor, fontes de nitrogênio como uréia e sulfato de amônio torna-se um promissor indutor, diversos autores como Guedes et al. (2020), Penha et al. (2016) e Sarat et al. (2010) verificaram que tal composto contribui significadamente para produção de lipases por microrganismos, mostrando a importância da suplementação de uma fonte de nitrogênio ao meio. Penha et al. (2016), relata que após a adição do sulfato de amônio teve um aumento de 47,5% a atividade lipolítica e Sarat et al. (2010), verificou os efeitos de diversas fontes de nitrogênio como ureia, peptona, extrato de malte, extrato de levedura, sulfato de amônio e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ indicando que eles são significativos mas que, utilizando um planejamento experimental de Plackett-Burman, a ureia foi considerada altamente significativa para a produção de lipase. Pereira et al. (2019), teve seu melhor resultado na produção enzimática suplementando o meio com o extrato de levedura uma vez que é uma fonte de nitrogênio, bem como uma fonte de vitamina. Ramos-Sánchez et al. (2015), sugerem que a adição de fontes de nitrogênio orgânicos como ureia e hidrolisado de caseína tenha um aumento significativo na produção de lipase.

Em alguns casos, a adição de várias fontes de nitrogênio, carboidratos e indutores ao substrato não resultou em nenhum aumento significativo na síntese de lipase, evidenciando que, determinados substratos agroindustriais são suficientes para apoiar o crescimento celular e a produção de lipase em alto rendimento como pode ser observado nos trabalhos de Rehman et al., (2019) em torta de óleo de canola, Putri et al. (2020) com farelo de arroz.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil detém uma forte economia voltada ao agronegócio, gerando inúmeros tipos de resíduos agroindustriais se destacando como principal gerador de publicações para a produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. Os resíduos oriundos da obtenção do azeite de dendê, farelo de arroz e soja foram os mais estudados como substrato.

O microrganismo mais utilizado para a produção de lipase foi o *A. niger*. Os trabalhos selecionados utilizaram em maior proporção a fermentação no estado sólido e a maioria das fermentações foram conduzidas no tempo de 48 h. Diversos resíduos por si só foram promissores para a produção de lipase entretanto a suplementação do meio com fontes lipídicas e principalmente de nitrogênio orgânico aumentaram significadamente a produção de lipase, utilizar resíduos agroindústrias e suplementar o meio com indutores com preços mais baixos, além de potencializar a produção pode tornar assim o produto final mais barato.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. P. S.; MARTINS, V. G.; MARTINS, P. C. C.; BOSCHERO, R. A.; PRENTICEHERNÁNDEZ, C. Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de corvina. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v. 10, n. 1, p. 118-129, 2018.
- AMORIM, G. M.; DOS SANTOS, T. C.; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, v. 8, p. 24–27, 2012.
- ANDRADE, A. S. A.; NETO, N. J. O.; DIAS, E. C.; GERVÁSIO, D. K. L.; LIMA, M. K. L.; DE MELO SANTOS, S. F.; ALMEIDA, A. F. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. *Revista Saúde & Ciência Online*, v. 7, n. 2, p. 457-472, 2018.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC-UPF*, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- COSTA, T. M.; HERMANN, K. L.; GARCIA-ROMAN, M.; DE VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Lipase production by *aspergillus Niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 419–427, 2017.
- DOBREV, G.; STRINSKA, H.; HAMBARLIISKA, A.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V. Optimization of lipase production in solid-state fermentation by *Rhizopus arrhizus* in nutrient medium containing agroindustrial wastes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 12, n. 1, p. 189–203, 2018.
- EICHLER, P. Cultivo em estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para a produção de lipases. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Escola de Engenharia Departamento de Engenharia Química. 2018.
- FARIAS, C. M.; DE SOUZA, O. C.; SOUSA, M. A.; CRUZ, R.; MAGALHÃES, O. M. C.; DE MEDEIROS; DE SOUZA-MOTTA, C. M. High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from *Siagrus coronata* (Martius) Becari. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 9, p. 820-828, 2015.
- FARIAS, M. A.; VALONI, E. A.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agro industrial residues. *Chemical Engineering Transactions*, v. 38, p. 301–306, 2014.
- FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. *Embrapa Instrumentação-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 2008.
- FERRAZ, F.; DUARTE, L. M.; Dias, I.; GRAJALES, L. M. Lipase extracelular do fungo *Metarhizium anisopliae* produzida a partir de resíduos agroindustriais. In: *Avanços das Pesquisas e Inovações na Engenharia Química*, p. 99-106, 2020.
- FERREIRA, O. E. Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a produção de amilases fúngicas: estudo de parâmetros fermentativos e caracterização das enzimas. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 56 p. 2011.

FERREIRA J. S.; OLIVEIRA E. A.; MELQUIDES S. A.; CAROSIA M. F.; KAMIMURA E. S.; MALDONADO R. R. Fermentação semi-sólida para produção de lipase por *Geotrichum Candidum* utilizando torta de milho. Ciências tecnológicas, exatas e da terra e seu alto grau de aplicabilidade, Ponta Grossa, PR, Ed. Atena, v1, p.299-307, 2020.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Optimization of lipase production using differential evolution. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 15, n. 2, p. 254–260, 2010.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: Production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 8, p.945–953, 2011.

GOPINATH, S. C.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. BioMed Research International, v. 2013, 154549, 2013.

GUEDES, E. H. S.; CONTE, C. G.; DE ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Produção de lipase por leveduras isoladas de frutos de palmeiras. Research, Society and Development, v. 9, n. 8, e394985487, 2020.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

JAIN, R.; NAIK, S. N. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 15, p. 181-184, 2018.

JÚNIOR M., W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; DE RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. Protein Expression and Purification, v. 123, p. 26-34, 2016.

KUMAR, S.; KATIYAR, N.; INGLE, P.; NEGI, S. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. Bioresource Technology, v. 102, n. 7, p. 4909-4912, 2011.

LEITÃO, R. C.; ALEXANDRE, L.; COSTA, A.; CASSALES, A.; PINHEIRO, F. C.; PINHEIRO, G. C.; ROSA, M. D. F. Biodegradabilidade anaeróbia dos resíduos provenientes das cadeias produtivas dos biocombustíveis: bagaço do dendê. Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2012.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. Biotechnology of Microbial Enzymes, p. 267-298, 2017.

MARTINS, A. G. R.; NASCIMENTO, M. B. K.; TAKARI, C M G.; DA SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. e-xacta, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 2, p. 348-364, 2012.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 1, p. 19-26, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; AMORIM, G. M.; AZEVÉDO, J. A. G.; GODOY, M. G.; FREIRE, D. M. Solid-state fermentation of co-products from palm oil processing: Production of lipase and xylanase and effects on chemical composition. Biocatalysis and Biotransformation, v. 36, v. 5, p. 381-388, 2018.

OLIVEIRA, D. S.; FERRAZ, L. R.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Farelo de arroz como substrato para a produção de lipases microbianas. RAMVI, v. 1, 2014.

PRABANINGTYAS, R. K.; PUTRI, D. N.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. Energy Procedia, v. 153, p. 242-247, 2018.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. Ciencia Rural, v. 46, n. 4, p. 755-761, 2016.

PEREIRA, A. S.; SHITSUKA, D. M.; PARREIRA, F. J.; SHITSUKA, R. Metodologia da Pesquisa Científica. UFSM. 2018.

PEREIRA, A.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; AMARAL, P. F. F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. Food and Bioproducts Processing, v. 115, p. 68-77, 2019.

PINTO, G. A. S.; DE BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2005.

PUTRI, D. N.; KHOOTAMA, A.; PERDANI, M. S.; UTAMI, T. S.; HERMANSYAH, H. Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. Energy Reports, v. 6, p. 331-335, 2020.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Utilizing agricultural wastes as substrates for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 in solid-state fermentation: Response surface optimization of fermentation parameters. Waste and Biomass Valorization, v. 4, n. 2, p. 347-357, 2013.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA, M.; RICARDO, M. C. J.; CORDOVA, J. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2015.

REHMAN, S.; BHATTI, H. N.; BHATTI, A.; ASGHER, M. Optimization of process parameters for enhanced production of lipase by *Penicillium notatum* using agricultural wastes. African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 84, p. 19580-19589, 2011.

REHMAN, S.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Optimization of process variables for enhanced production of extracellular lipase by *Pleurotus ostreatus* IBL-02 in solid-state fermentation. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 32, n. 2, p. 617-624, 2019.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. 2011.

RUAS, T. L.; PEREIRA, L. Como construir indicadores de ciência, tecnologia e inovação usando Web of

- Science, Derwent World Patent Index, Bibexcel e Pajek. *Perspectivas em Ciência da Informação*, v. 19, n. 3, p. 52-81, 2014.
- SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; BRAGA JR, A. C. R.; DE ASSIS, F. G. D. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservations and Recycling*, v. 58, p. 36-44, 2012.
- SARAT B. I.; SITA KUMARI, K.; HANUMANTHA RAO, G. Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.1, n. 2. P. 115-121, 2010.
- SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 179, p. 558-571, 2016.
- SILVEIRA, E.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Produção de lipase em cultivos sólidos e submersos utilizando resíduos do processamento do dendê e sua caracterização bioquímica. XX Simpósio Nacional De Bioprocessos XI Simpósio De Hidrólise Enzimática De Biomassa. 2015.
- SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Potencial da farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase de *Aspergillus niger*: Influência da temperatura e umidade no processo. *Scientia Plena*, v. 8, n. 12, p. 1-4, 2013.
- SUCI, M.; ARBIANTI, R.; HERMANSYAH, H. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 105, n. 1, 12126, 2018.
- TAKEYAMA, M.; KAWAGUTI, H. Y.; KOBLITZ, M. G. B.; FAI, A. E. C. Resíduos agroindustriais como insumos promissores para obtenção de bioprodutos por leveduras-uma breve revisão. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, 588974448, 2020.
- THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S.; SRIDEVI, J.; AARTHY, M.; GOWTHAMAN, M. K.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; KAMINI, N. R. Degradation of poly (butylene succinate) and poly (butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 110, p. 99-107, 2016.
- TOMBINI, J.; CUNHA, M. A. A.; LIMA, V. A. Fermentação sólida de farelo de soja para produção de lipase: avaliação dos parâmetros concentração de inóculo, umidade e tempo de cultivo. *Anais Do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia*, p. 368-368, 2015.
- TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 69-85, 2006.

ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS: ESTRATÉGIA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA EM PODCAST DE SCIENCETELLING E EDUTRETENIMENTO

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 03/09/2021

Juliana Galvão de Carvalho Argento

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Biológicas
Rio de Janeiro - RJ
<https://bitly.com/zFfkA>

Waldiney Mello

Instituto de Aplicação Fernando Rodrigues
da Silveira, Departamento de Ciências da
Natureza
Rio de Janeiro - RJ
<https://bitly.com/izBLr>

RESUMO: Na nova Época Geológica do Antropoceno, o mundo integrado pelo turismo, transporte e comércio internacional, impulsiona a movimentação de espécies pelo globo. As espécies exóticas invasoras, um dos piores vetores de mudança, ameaçam a diversidade biológica e desequilibram os serviços ambientais de provisão, regulação e cultural. A população humana, por ser a grande dispersora, torna a divulgação científica e conscientização de extrema relevância e urgência. Nesse sentido, com o aumento do acesso à tecnologia e a crescente demanda por podcasts sobre ciência, cuja atividade ainda é incipiente, esta pesquisa teve por objetivo, impulsionar a popularização da ciência sobre as espécies exóticas invasoras brasileiras através do podcast, a partir da criação de roteiros científico-criativos pela metodologia

do edutretenimento e sciencetelling. Os resultados obtidos foram a criação do podcast “Ecoceno” com a série “Exóticos&Invasores”. A estrutura da série apresentou episódios com o objetivo de explorar as espécies exóticas invasoras prioritárias no Brasil, seis roteiros foram produzidos, dentre eles, três foram gravados, editados e publicados. A produção de áudio de boa qualidade exige investimento na técnica e nos equipamentos de gravação e edição, os efeitos sonoros são imprescindíveis para criar a atmosfera e o cenário narrado. O esforço de roteirização otimizou a quantidade de tentativas de gravação, aumentou a clareza e a coesão das informações. O sciencetelling e edutretenimento, a partir do estabelecimento de assunto-chave e do pano de fundo facilitam a produção de conteúdo lúdico e multidisciplinar que conte ciência para público não especializado.

PALAVRAS-CHAVE: Espécies invasoras; popularização científica; Antropoceno; ensino de ciências; conservação.

INVASIVE EXOTIC SPECIES: SCIENTIFIC COMMUNICATION STRATEGY IN PODCAST OF SCIENCETELLING AND EDUTAINMENT

ABSTRACT: In the new Anthropocene Geologic Epoch, the world integrated by tourism, transport, and international trade, drives the movement of species across the globe. Invasive alien species, one of the worst drivers of change, threaten biological diversity and unbalance environmental services like provision, regulation and cultural. The human population, being the great disperser, makes scientific disclosure and awareness of

extreme relevance and urgency. In this sense, with the increase in access to technology and the growing demand for podcasts on science, whose activity is still incipient, this research aimed to boost the popularization of science on Brazilian invasive alien species through the podcast, from the creation of scientific-creative scripts through the methodology of edutainment and sciencetelling. The results obtained were the creation of the podcast “Ecoceno” with the series “Exóticos & Invasores”. The series structure featured episodes to explore priority invasive alien species in Brazil, six scripts were produced, among them, three were recorded, edited, and published. The production of good quality audio requires investment in the technique and equipment of recording and editing, sound effects are essential to create the atmosphere and the scenario. The scripting effort optimized the number of recording attempts, increased the clarity and cohesion of the information. Sciencetelling and education, based on the establishment of a key subject and the background, facilitate the production of playful and multidisciplinary content that tells science to non-specialized audiences.

KEYWORDS: Invasive species; science popularization; Anthropocene; science teaching; conservation.

1 | INTRODUÇÃO

A alta diversidade de habitats e componentes bióticos e abióticos da Terra se reflete em diferentes tipos e disponibilidades de recursos para as inúmeras espécies existentes, gerando diferentes pressões e limitações ambientais. Portanto, as pressões impostas pela diversidade de ambientes em cada espécie influenciam na sua distribuição e abrangência geográfica (RICKLEFS & RELYEA, 2016). A diversidade biológica é influenciada por processos naturais de dinâmica populacional, como especiação, extinção e a dispersão de longa distância (CRACRAFT, 1994). A dispersão de indivíduos pode ocorrer de forma espontânea ou por pressão de recursos, como a busca por alimento, abrigo, território, ou por fatores biológicos como a competição e a fuga de predadores (RICKLEFS & RELYEA, 2016).

No Antropoceno, o homem passou a atuar diretamente na evolução, dispersão e extinção em massa de espécies. A interferência humana na distribuição e abrangência natural das espécies está induzindo grandes deslocamentos para áreas fora de sua ocorrência natural, levando ao declínio da biodiversidade, incluindo a extinção de espécies nativas (STEFFEN *et al.*, 2011; BELLARD *et al* 2016).

A movimentação de espécies pelo homem aumentou ainda mais com a globalização, o mundo integrado pelo turismo, transporte e comércio internacional. A forma com que estas espécies são transportadas é um elemento-chave de gestão e prevenção das invasões, podendo ocorrer de forma proposital ou acidental. A forma proposital está associada ao suprimento das necessidades humanas, podendo ser nos setores de cosméticos, religioso, alimentício, paisagístico, econômico etc. Já a forma acidental de introdução seria sem a vontade do homem, como os animais que são trazidos por acaso incrustados nos navios ou pelas águas de lastro dos mesmos (PADAYACHEE *et al.*, 2017).

O processo de dispersão das espécies para longas distâncias, aliado ao sucesso de seu estabelecimento no novo território, manutenção da prosperidade na reprodução e aquisição de recursos, pode ser considerado como algo difícil e até complexo, tendo em vista que são necessárias constantes superações de barreiras bióticas e abióticas do novo ambiente que se distinguem de seu local de origem. Novas relações interespecíficas serão formadas, novos recursos alimentares serão encontrados e diferentes condições físicas como a temperatura, umidade e luz, por exemplo. Caso obtenham sucesso e assim consigam se estabelecer e proliferar no novo ambiente passam a ser consideradas espécies introduzidas ou espécies exóticas (EE).

A espécie exótica (EE) é a “espécie, subespécie ou táxon de hierarquia inferior ocorrendo fora de sua área de distribuição natural passada ou presente”, enquanto a espécie exótica invasora (EEI) é definida como “a espécie exótica cuja introdução e/ou dispersão ameaçam a diversidade biológica” (BRASIL, 2018). Portanto, a ameaça à biodiversidade pelas EEI ocorre devido às diferentes relações ecológicas interespecíficas que podem ser estabelecidas com as espécies nativas, como a competição por recursos locais como a água, comida e espaço, predação das espécies nativas ou como vetores de doenças. Devido às características do Antropoceno de globalização e movimentação pelo globo em massa, as taxas de introdução de espécies invasoras aumentaram consideravelmente desde 1950, onde 37% teriam sido introduzidos apenas entre os anos de 1970 e 2014 (WWF, 2020). Apesar das EEI afetarem diversos táxons, o grupo animal está em destaque (BELLARD *et al* 2016), tais dados contribuem para a classificação das invasões como uma das maiores causas de extinção do globo (IUCN, 2021). O impacto gerado é o suficiente para colocá-las como um dos cinco piores vetores de mudança junto dos temas “mal uso do solo”, “mudanças climáticas”, “superexploração” e “poluição” (WWF, 2020).

A “Estratégia e Plano de Ação Nacionais para a Biodiversidade” apresenta 397 espécies exóticas com potencial invasor e 58 espécies já consideradas como invasoras, totalizando 448 espécies, destacando as principais EEI do grupo animal como o coral-sol (*Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis*), Caracol-gigante-africano (*Achatina fulica*), Mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*). Já foram identificadas 365 espécies exóticas potencialmente invasoras no Brasil, dentre elas 46% flora e 54% fauna (MMA, 2019).

O uso da tecnologia tem crescido nos últimos anos, e apresentou aumento no número de dispositivos, usuários, softwares, temáticas e propósitos, trazendo uma larga gama de possibilidades de comunicação e interatividade. A base ativa de uso de dispositivos digitais no Brasil é de 424 milhões, resultando na proporção de 2 dispositivos por habitante, do total, 190 milhões (44%) correspondem aos computadores e 234 milhões (56%) aos smartphones (FGV, 2020). A transição da linguagem científica para uma comunicação com a sociedade deve adquirir aspectos do texto jornalístico, apesar de não ser fácil, é de extrema importância para manter o interesse do público e conseguir atingir o pleno entendimento e

conscientização da questão abordada (AMER, 2020). O podcast jornalístico-científico pode apresentar diferentes categorias baseados na estruturação de seu texto, como modelo de entrevista, narração monologada e reportagens sonorizadas (AMER, 2020).

Cientistas acostumados a utilizar os jargões da área e a entender facilmente conceitos complexos precisam adequar seu texto para divulgação. A adequação para texto jornalístico apresentou bons resultados quando realizada de forma simples, sem jargões, sentenças curtas e em tópicos. A indicação é para começar pensando “como você contaria essa história para um amigo através da linguagem informal” (AMER, 2020).

O podcast está em crescente demanda, e com mais pessoas com acesso aos áudios MP3, *softwares* de produção de áudio de baixo custo ou grátis somam-se com o aumento dos *weblogs* para impulsionar o estilo rádio amador. O número de ouvintes de podcasts 2019 de 17,3 milhões obteve aumento para até 34,6 milhões de ouvintes em 2021, com 70,3% de aumento na produção de podcasts em português (ABPOD, 2021). Em pesquisa anterior de 2019-2020, resultados comparativos apontam os podcasts são consumidos majoritariamente pelo aplicativo Spotify e que houve aumento de 9,1% da preferência por temas científicos (ABPOD, 2020).

Entretanto, o uso educativo no Brasil ainda é escasso, com baixo aproveitamento pelo ensino formal. Apesar do pouco uso se comparado com outros países, a ferramenta se mostra como um instrumento democrático de livre acesso e amplificador da comunicação científica (FREIRE, 2017), como ocorre em podcasts como CienPodere, Ciência USP, SciTalk, Rádio Escafandro e Dragões de Garagem, que atuam na divulgação científica e popularização da ciência.

A disponibilização dos áudios no formato “on demand”, ou seja, acessado quando a pessoa desejar em qualquer hora e lugar, e por diferentes públicos, pode ser usada como uma ferramenta livre de aprendizado ou estar vinculada por professores às aulas presenciais ou à distância, tornando-se uma forte estratégia para o engajamento das pessoas sobre um tema, tanto no ensino formal quanto o não-formal. A Estratégia e Plano para a Biodiversidade destacam a necessidade de traçar estratégias de comunicação externa em diferentes setores, dentre eles temos o segmento educacional envolvendo professores e alunos do Ensino Fundamental até o nível Superior. Tal comunicação deverá estar atrelada à produção e disseminação do conhecimento, popularização da ciência e proposição de ações para aumentar o engajamento dos brasileiros (MMA, 2017). Além da análise do podcast como instrumento de informação, devemos nos atentar à metodologia de construção de roteiro, que irá adequar o conteúdo conforme o público-alvo.

Mello (2019) sugere que a divulgação científica e popularização da ciência através de conteúdos radiofônicos pode ser mais eficiente quando utilizados áudios com textos científicos criativos criados com edutretenimento na forma de contação de história científica. Dessa forma, inspirado ainda nas práticas da National Geographic Society, é sugerido aplicar à produção radiofônica um caráter de *sciencetelling*, em que o conhecimento

científico pode ser difundido na forma de histórias que tenham o cotidiano como pano de fundo. O *sciencetelling* é, portanto, uma adaptação do “*storytelling*” (do inglês, “contar histórias”), característico da linguagem cinemática que traz um roteiro de história onde os fatos científicos são pulverizados em temas cotidianos, em uma narrativa mais próxima da realidade dos ouvintes. Mello (2019) estabelece esse tipo de construção textual narrativo de divulgação e popularização da ciência na criação de um programa de rádio. Uma vez que os podcasts são um tipo de conteúdo radiofônico de linguagem mais acessível, é possível utilizar o edutretenimento e o *sciencetelling* para divulgar ciência nesse tipo de áudioconteúdo. O edutretenimento apresenta a educação somada ao entretenimento do público, como a inserção de questões divertidas e que potencializem as discussões (MELLO, 2019).

O presente estudo se justifica porque o *sciencetelling* com edutretenimento é uma ferramenta metodológica de produção textual ainda recente e que pode, através da aplicação em podcast, impulsionar a popularização da ciência, neste caso, sobre Espécies Exóticas Invasoras no Brasil. O objetivo do presente estudo é apresentar uma metodologia de popularização da ciência na forma de Experiência Midiatizada de Escuta (EME), a partir da criação de textos científicos criativos sobre as espécies exóticas invasoras brasileiras, seguindo a metodologia do edutretenimento e *sciencetelling*. Os conteúdos criados objetivam a divulgação científica e a conscientização ambiental acerca das espécies exóticas no Brasil.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A seleção das espécies exóticas invasoras prioritárias baseou-se na representatividade, maior conhecimento científico e maior presença em Unidades de Conservação Federais apresentadas tanto no “Guia de orientação para o manejo de espécies exóticas invasoras em Unidades de Conservação Federais” (ICMBio/MMA, 2019), seguindo Guimarães (2015), buscando a seleção de diferentes grupos biológicos e formas de introdução no território brasileiro.

A criação de roteiro seguiu a metodologia do Edutretenimento e *sciencetelling* proposta por Mello (2019), para criação de textos científicos criativos, utilizando uma temática de conhecimento geral como pano de fundo para trazer o conhecimento acadêmico relativo à espécie exótica invasora. Os roteiros dos episódios seguem uma formatação para produções radiofônicas (incluindo podcasts).

Os áudios foram gravados no computador a partir do aplicativo Filmora utilizando uma interface com o Microfone Cardióide modelo Fifine K670 USB com monitoramento ao vivo de voz. Após a gravação de áudio bruto, a atmosfera e a imersão no conteúdo foram realizadas a partir da edição dos áudios através do Wondershare Filmora X (*Build* 10.0.0.94) com a inserção dos efeitos sonoros previstos em roteiro a partir do site FreeSoud,

plataforma de sons com Licenças Creative Commons. Por fim, a disponibilização gratuita do conteúdo editado foi através do aplicativo Anchor, com distribuição na plataforma Spotify. Os episódios gravados a partir dos roteiros foram disponibilizados no link <https://bityli.com/5ylh3>

3 | RESULTADOS

O presente trabalho resultou na proposta de série de podcast com uma introdução e 10 episódios, onde cada episódio aborda uma espécie exótica invasora prioritária como foco central para criação dos roteiros científicos-criativos com linguagem adaptada ao sciencetelling e edutretenimento. As espécies listadas foram organizadas conforme o ano de introdução em território nacional, do mais antigo para o mais recente (Tabela 1). O canal de podcast criado foi chamado de “Ecoceno”, disponível no link <https://bityli.com/5ylh3>. O podcast tem conteúdos de áudio em formato lúdico e científico, reunindo informações sobre algumas das espécies exóticas invasoras prioritárias e suas formas de introdução no Brasil.

Nº	Temática	Nome científico	Nome comum	Origem evolutiva	Ano de introdução
0	Introdução ao tema espécies exóticas invasoras				
1	Grandes navegações	<i>Rattus norvegicus</i>	Ratazana	Ásia	1500<
2	A cultura dos Pets (parte 1)	<i>Canis lupus familiaris</i> .	Cães	América do Norte	1500<
3	A cultura dos Pets (parte 2)	<i>Felis silvestris catus</i>	Gatos	África	1822<
4	Tráfico de animais silvestres	<i>Callithrix spp</i>	Mico-estrela/Sagui	Brasil*	1900<
5	Perigo dos aquários	<i>Poecilia reticulata</i>	Guppy/Lebiste	Venezuela	1922
6	Criadouros e a Caça	<i>Sus scrofa</i>	Javali	Ásia e Europa	1960
7	Aquicultura	<i>Litopenaeus vannamei/ Cyprinus carpio</i>	Camarão-branco-do-pacífico/ Carpa-comum	Oceano Pacífico/ Ásia e Europa	1980<

8	Bioincrustação	<i>Tubastraea spp.</i>	Coral-sol	Oceano Pacífico	1980<
9	Água de lastro	<i>Limnoperna fortunei</i>	Mexilhão-dourado	Ásia	
10	Alimentação e o falso escargot	<i>Achatina fulica</i>	Caracol-gigante-africano	África	1988

Tabela 1 – Lista de episódios do podcast Ecoceno, baseados nas EEI da fauna presentes em Unidades de Conservação Federal.

A partir da proposta da estrutura do podcast, foram produzidos roteiros radiofônicos, onde o primeiro é o *trailer* de apresentação da série e os seguintes são os episódios temáticos. Os roteiros produzidos foram gravados e editados pelo *software* Wondershare Filmora X, publicados no aplicativo Anchor e disponibilizados na série “Exóticos e Invasores” no Podcast Ecoceno (<https://bityli.com/5ylh3>).

O Anchor distribuiu os episódios para 8 aplicativos de “streaming” digital: Spotify, Apple Podcasts, Breaker, Castbox, Google Podcasts, Overcast, Pocket Casts e RadioPublic, onde qualquer atualização pelo Anchor é replicada automaticamente todos os aplicativos signatários em até 24 horas.

4 | DISCUSSÃO

A produção de podcasts com o objetivo de divulgação científica, conforme proposto no presente trabalho, demanda a análise dos seguintes aspectos fundamentais: a técnica utilizada para a gravação, edição do áudio e inserção de efeitos sonoros, assim como, a habilidade e responsabilidade de traduzir e contar ciência para público diverso a partir da técnica de estruturação de roteiro científico-criativo. Aliado à edição do áudio, outra estratégia técnica que visa aumentar o envolvimento do ouvinte e principalmente potencializar a experiência e a imersão no cenário criado é a inserção de efeitos sonoros. Estes pequenos áudios contribuem na criação de uma atmosfera, trazendo emoções, lembranças e associações durante a escuta. Por ser um produto radiofônico, a atenção ao som é essencial para causar uma experiência mais imersiva do ouvinte.

Para publicação do podcast, foi selecionado o aplicativo Anchor devido à maior praticidade, ao design simples e voltado para criação específica de podcast. A possibilidade de utilizá-lo para criação do canal aliado à capacidade de divulgação para diversos aplicativos conectados traz muita velocidade e padronização para o produtor. As alterações feitas no Anchor atualizam automaticamente em até 24 horas todos os aplicativos signatários, com a possibilidade de inclusão de outras plataformas como Apple Podcasts, Castbox e Overcast.

A divulgação em podcast apresenta-se como um solo fértil para trabalhos científicos, devido à grande tendência do ser humano tecnológico em buscar as respostas para todas as suas questões através destas plataformas. O número de usuários de plataformas que exploram a experiência midiática de escuta (EME) é cada vez mais alto e a produção de conteúdo científico neste formato é incipiente, principalmente tratando-se de conteúdo na Língua Portuguesa. Os episódios abordaram as formas de introdução, o relacionamento das espécies com o homem e seus impactos ambientais em território nacional.

A invasão biológica é um desequilíbrio ambiental gerado pelo homem, devido ao avançado sistema de transportes capaz de realizar grandes deslocamentos de espécies para novos países e ecossistemas, tanto de forma intencional, como não intencional. O acesso à informação poderá mitigar o descuido e desatenção, além de aumentar possíveis propostas de controle das introduções biológicas (BRASIL, 2018). Dessa forma, a educação poderá proporcionar a reavaliação de ações simples e cotidianas que provocam a introdução das espécies exóticas, como a liberação de peixes ornamentais nos rios, alimentação dos saguis, abandono de gatos e cães em áreas protegidas e aquisição de espécies silvestres ilegalmente.

A produção de um conteúdo educativo exige grande responsabilidade com relação à veracidade e atualização das informações. A atual era da comunicação e do mundo online globalizado, apresenta aos educadores a chance de produzirem diversos conteúdos educativos, informativos que auxiliariam na conscientização da população.

Tratando-se especialmente da produção de podcast científico, existe uma etapa crucial de triagem das informações, análise técnica e crítica. A relevância desta etapa justifica-se pela necessidade de garantir a veracidade e atualização das informações, evitando-se distorções e a disseminação das *fake news*.

Professores e pesquisadores das áreas biológicas raramente buscam o desenvolvimento na roteirização, comumente considerada como um assunto relacionado às ciências Humanas. A Base Nacional Comum Curricular (BNCC, 2018) prevê somente para a disciplina de Língua Portuguesa, do Ensino Fundamental ao Médio, o desenvolvimento do campo jornalístico-midiático. Nesta disciplina são trabalhadas a ética e a responsabilidade durante a produção de conteúdo e após o planejamento. Na execução do podcast, a habilidade de apresentação oral dos alunos é desenvolvida. A seguir, são apresentadas duas habilidades na disciplina de língua portuguesa aplicada à roteirização de podcast.

Roteiros baseados na metodologia de contação de ciência (*sciencetelling*) estimulam a abordagem de diferentes disciplinas e áreas de estudo dentro dos *scripts* científicos pode ser uma ótima estratégia para envolver os ouvintes. Na série “Exóticos&Invasores” muitos aspectos históricos foram trazidos, como as grandes navegações, a colonização dos europeus na América do Norte, a crescente fértil no Oriente Médio. Aspectos econômicos como a quantidade de dinheiro perdido com a presença dos ratos em plantações de arroz, dinheiro movimentado no tráfico de animais silvestres no Brasil e no mundo, investimento

em captura e castração de gatos e cães. Por fim, aspectos geográficos marcantes como a distribuição natural e artificial de espécies e os efeitos artificiais da globalização.

Podemos destacar, além dos conhecimentos tradicionais escolares, a estratégia de criar associações entre a ciência e os conhecimentos empíricos mais comuns. A aproximação dos ouvintes a partir de possíveis experiências prévias, pode ser vista no episódio 2 sobre os cães em que traz a vivência de ter um cão que rouba comida, corre atrás dos pombos, come lixo (conhecimento empírico) com as informações de que é um animal caçador que leva suas presas à exaustão e generalista (conhecimento científico). De forma geral, a estrutura de base montada para desenvolvimento da narrativa é a escolha de um tema-chave e um pano de fundo. Os roteiros, produzidos para a série apresentam a finalidade de conscientização sobre as espécies exóticas invasoras prioritárias no Brasil. Portanto, para cada episódio é narrada sua história de invasão como assunto-chave e como pano de fundo, a relação estabelecida com o homem.

A definição do assunto-chave dos episódios pode ser dividida em duas perguntas: “Qual a espécie invasora?” e “O que a fez ser invasora, tem algum diferencial?”. Enquanto o pano de fundo apresenta a contextualização do assunto-chave com assuntos do cotidiano é essencial para estimular a curiosidade e engajamento do ouvinte, buscando criar ligações tais quais “Como foi introduzida” “Quando” e “Onde”, ou seja, a perspectiva histórica, geográfica e econômica do processo de introdução no ecossistema ou país.

Por meio destas diretrizes, a construção do episódio sobre o *Rattus norvegicus* foi feita. O assunto-chave apresenta dados de reprodução rápida, alimentação oportunista, comportamento de agressividade, territorialista e competidor. Com relação à associação com o homem, foi explorado como pano de fundo o período histórico das grandes navegações e a contaminação das embarcações, o marco da peste negra e a atual associação aos grandes centros urbanos. Considerando as diferentes competências e habilidades trabalhadas pela metodologia de contar ciência de forma entretida, a exigência constante de análise crítica, criatividade, assim como a grande possibilidade de desenvolvimento da multidisciplinaridade, torna esta prática muito rica.

Apesar de ter sido aplicado em contexto de criação de áudio, ela poderá ser utilizada em outros contextos como em audiovisual, práticas escritas como publicação de colunas e outros textos, assim como presencialmente. Contar histórias de forma divertida pode ser uma ótima estratégia para ativistas ambientais chamarem a atenção do público leigo. A aplicação e avaliação da metodologia de *sciencetelling* e edutretenimento como estratégia de ensino lúdico nas escolas é recomendada. Os professores podem criar seus textos como material de ensino ou sugerir que os alunos produzam seus próprios textos científico-criativos para estimular a criatividade, raciocínio crítico e a produção escrita. A produção textual aliada à produção do podcast tende a ser um ótimo material de apoio em que os alunos podem acessar remotamente quando quiserem, podendo ser explorada junto das aulas de português.

5 | CONCLUSÕES

O presente estudo pode concluir que a produção de um podcast demanda especial atenção à técnica de gravação e edição de áudio visando a produção de material de qualidade. A roteirização do podcast é importante para a construção da lógica textual, facilitando muito a parte prática de gravação e edição do conteúdo, poupando tempo ao tornar o mediador do conteúdo mais confiante no roteiro.

A popularização dos trabalhos científicos sobre espécies exóticas invasoras ainda é pouco explorada para o público não especializado, especialmente através de podcasts e demais conteúdos radiofônicos. Considerando o importante papel da população em atuar como dispersora de espécies exóticas, torna de grande urgência a necessidade de outras iniciativas divulgação científica. A tradução da ciência pura para uma forma de contar ciência a partir do *sciencetelling* e edutretenimento facilitam a divulgação científica, tendo em vista que se baseia na melhor estratégia de passar dados científicos visando a contextualização do público, de forma envolvente e multidisciplinar. Mais pesquisas sobre sua aplicação em aulas de biologia na Educação Básica são necessárias.

REFERÊNCIAS

- AMER, P. (a). **Working Scientist podcast: How to craft and communicate a simple science story.** Nature. July, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02117-7>. Acesso em: jan. 2021.
- BELLARD, C.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. M. **Alien species as a driver of recente extintions.** Biology letters. v. 12, n.2. Fev. 2016.
- BRASIL. Resolução nº 7, de 29 de maio de 2018. **Dispõe sobre a Estratégia Nacional para Espécies Exóticas Invasoras.** Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade. Brasília: **Diário Oficial da União**: seção1, Brasília, DF, ed. 112, p. 69, 13 jun.2018.
- CDB. CONVENÇÃO DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **Sustaining life on Earth. How the Convention on Biological Diversity promotes nature and human well-being.** Abril, 2000. Disponível em: <https://www.cbd.int/convention/guide/?id=web>. Acesso em: jul. 2021.
- CRACRAFT, J. **Species diversity, Biogeography, and the Evolution of Biotas.** American Zoologist, v. 34, n.1, p.33-47, 1994.
- CRUTZEN P.J. **The “Anthropocene”.** In: Ehlers E., Krafft T. (Eds). Earth System Science in the Anthropocene. Springer, Berlin, Heidelberg. 2006
- DANTAS-QUEIROZ, M. V.; WENTZEL, L.C.P.; QUEIROZ, L.L. **Science communication podcasting in Brazil: the potential and challenges depicted by two podcasts.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 2, p. 1891-1901, 2018

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVAION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **The IUCN Redlist of Threatened Species**. 2021. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: jul. 2021.

MELLO, W. **Ensino de Biologia Animal pelo edutretenimento: A produção do programa “Rádio Animal” e sua utilização na divulgação científica**. In: As ciências biológicas e da saúde na contemporaneidade. Nayara Araújo Cardoso; Renan Rhonalty Rocha; Maria Vitória Laurindo. (Org.).1ed. Belo Horizonte: Atena Editora, v. 4, p. 1-257. 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Estratégia e Plano de Ação Nacionais para a Biodiversidade – EPANB: 2016-2020** / Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade, Departamento de Conservação de Ecossistemas – Brasília, DF: MMA, 2017. Disponível em: <https://www.cbd.int/doc/world/br/br-nbsap-v3-pt.pdf>. Acesso em: jul. 2021

PADAYACHEE, A. L.; IRLICH, U. M.; FAULKNER, K. T.; GAERTNER, M.; PROCHEŞ, Ş.; WILSON, J. R.; ROUGET, M. **How do invasive species travel to and through urban environments?**. Biological invasions, v. 19, n. 12, p. 3557-3570, 2017.

RICKLEFS, R.; RELYEA, R. **A economia da natureza**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2016. 606 p.

STEFFEN, W.; GRINEVALD, J.; CRUTZEN, P.; MCNEILL, J. **The Anthropocene: conceptual and historical perspectives**. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 369, n. 1938, p. 842-867, 2011.

WWF. WORLD WILD FUND. **Living Planet Report 2020 – Bending the Curve of Biodiversity Loss**. 2020. ISBN 978-2-940529-99-5.

EFEITOS DOS NEONICOTINOIDES EM *Apis mellifera* E IMPACTOS SOBRE A POLINIZAÇÃO

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 19/10/2021

Daiani Rodrigues Moreira

Universidade Estadual de Maringá,
Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento (PGM). Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0002-5279-6624>

Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento Biotecnologia, Genética e
Biologia Celular (DBC). Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0002-2752-642X>

Cynthia Leão Figueira

Universidade Estadual de Maringá, Programa
de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ).
Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0002-8736-8777>

Douglas Galhardo

Universidade Estadual de Maringá, Programa
de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ).
Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0002-2707-9076>

Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Universidade Estadual de Maringá, Programa
de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ).
Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0003-1814-9703>

Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki

Universidade Estadual de Maringá,
Departamento Biotecnologia, Genética e
Biologia Celular (DBC) Maringá, Paraná
<https://orcid.org/0000-0002-2028-9281>

RESUMO: As abelhas são polinizadores essenciais para diferentes plantas nativas e culturas agrícolas. Todavia, em diferentes locais do mundo, tem sido reportada a redução desses polinizadores devido a diferentes fatores, tais como, a fragmentação de habitat devido aos desmatamentos de florestas nativas, o aquecimento global que vem provocando várias mudanças climáticas e o uso intensivo de inseticidas de diferentes classes. Os neonicotinoides são inseticidas que atuam diretamente no sistema nervoso desses insetos e podem promover hiperexcitação, paralisia e morte. Esses compostos podem ser levados para as colônias por meio da coleta de pólen e néctar realizada por abelhas operárias durante o forrageamento. A toxicidade dos neonicotinoides tem sido associada a várias alterações morfofisiológicas em diferentes espécies de abelhas. Estudos que avaliem a exposição de abelhas aos inseticidas são essenciais para ampliar a compreensão de como esses compostos atuam sobre os polinizadores. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos neonicotinoides em *Apis mellifera* e os impactos destes agrotóxicos sobre a polinização de plantas nativas e cultivares agrícolas.

PALAVRAS-CHAVE: abelhas melíferas, inseticidas, polinizadores, toxicidade.

EFFECTS OF NEONICOTINOIDS ON *Apis mellifera* AND IMPACTS ON POLLINATION

ABSTRACT: Bees are essential pollinators

for different native plants and agricultural crops. However, in different parts of the world, the reduction of these pollinators has been reported due to different factors, such as habitat fragmentation due to deforestation of native forests, global warming that has been causing several climate changes and the intensive use of insecticides of different classes. Neonicotinoids are insecticides that act directly on the nervous system of these insects and can promote hyperexcitation, paralysis and death. These compounds can be taken to the colonies through the collection of pollen and nectar performed by worker bees during foraging. The toxicity of neonicotinoids has been associated with several morphophysiological changes in bee species. Studies that assess the exposure of bees to insecticides are essential to broaden the understanding of how these compounds act on pollinators. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of neonicotinoids on *Apis mellifera* and the impacts of these pesticides on the pollination of native plants and agricultural cultivars.

KEYWORDS: honey bees, insecticides, pollinators, toxicity.

1 | INTRODUÇÃO

A polinização é um processo indispensável que garante a manutenção dos ecossistemas, reprodução vegetal, segurança alimentar e agricultura (POTTS, 2016). Nas regiões tropicais, cerca de 70% do total de 1.330 cultivos polinizados por insetos, produzem frutos e sementes em maior quantidade e qualidade (ROUBIK, 2018).

As abelhas *Apis mellifera* são consideradas importantes polinizadores de culturas de interesse econômico (KLEIN et al., 2007). Além de contribuírem para o aumento da produção agrícola, produzem mel, própolis, cera, geleia real e apitoxina, que são comercializados (FREITAS et al., 2017). Nessa perspectiva, a apicultura é uma atividade que vem ganhando destaque no mercado zootécnico, especialmente pelo baixo impacto ambiental promovido e rápido retorno do capital aplicado (BACHA JÚNIOR et al., 2009).

No entanto, o aumento do uso de agrotóxicos para o controle de pragas agrícolas ou emprego inadequado destes compostos, acabam gerando resíduos que permanecem no néctar e pólen das flores, os quais, geram impactos negativos sobre os polinizadores (MULLIN et al., 2010; BLACQUIÈRE et al., 2012; CODLING et al., 2016; COWLES e EITZER, 2017; STONER et al., 2019), ameaçando a biodiversidade, os serviços ecossistêmicos (GARIBALDI et al., 2016), bem como, eficiência da polinização (FREITAS e PINHEIRO., 2010).

Dentre as classes de agrotóxicos, os neonicotinoides são os mais utilizados nas culturas brasileiras, empregados extensivamente nos últimos vinte anos e com participação de mais de 25% do mercado global (VAN DER SLUIJS et al., 2013). Esses compostos são inseticidas sistêmicos e persistentes, que ao serem absorvidos e transportados por toda a planta, permanecem nos tecidos vegetais por vários meses ou até por anos (KRUPKE et al., 2012). Embora o desenvolvimento e aplicação de neonicotinoides contribuam para melhorias nas práticas agrícolas e na segurança alimentar global, sua ação sistêmica

gera preocupação, devido a sua toxicidade para insetos não-alvos, tais como as abelhas (DERECKA et al., 2013).

Por este motivo, efeitos subletais de agrotóxicos têm sido avaliados em abelhas e os resultados vêm demonstrando alta toxicidade destes compostos para os polinizadores devido à ocorrência de alterações morfológicas e fisiológicas em diferentes espécies como *A. mellifera* (CATAE et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; SANDROCK et al., 2014; ALBURAKI et al., 2015; TOMÉ et al., 2017), e em abelhas sem ferrão como *Scaptotrigona bipunctata* (DORNELES et al., 2017; MOREIRA et al., 2018), *Tetragonisca fiebrigi* (DORNELES et al., 2017; PADILHA et al., 2020), *Plebeia emerina* (PADILHA et al., 2020) e *Partamona helleri* (TOMÉ et al., 2017).

Desta forma, a exposição de abelhas *A. mellifera* aos agrotóxicos pode causar alterações morfofisiológicas ou morte desses indivíduos, contribuindo para redução populacional, resultando em prejuízos econômicos devido à redução na produtividade de culturas agrícolas ou comercialização de produtos apícolas. Sendo assim, é essencial desenvolver testes em laboratório e em campo para verificar os efeitos da contaminação desses polinizadores. Deste modo, o objetivo deste estudo foi compreender os efeitos dos neonicotinoides em *A. mellifera*, e, os impactos sobre os serviços de polinização.

2 | BIOLOGIA DAS ABELHAS *Apis mellifera*

As abelhas da espécie *A. mellifera* Linneaus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apinae, Apini) são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa e padrões de desenvolvimento corporais em quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto (REMBOLD, 1987; MICHELETTE e SOARES, 1993).

Estes insetos apresentam polifenismo, onde as fêmeas adultas compõem duas castas, a da rainha e a das operárias. Larvas nutridas com geleia real, produzida e secretada pelas operárias, se diferenciam em rainhas (PATEL et al., 1960; HAYDAK, 1970). A geleia real para larvas de rainha é distinta da geleia fornecida para as operárias ou larvas de zangão, apresentando diferentes teores de minerais, vitaminas, açúcar e de hormônio juvenil (HAYDAK, 1970; KAMAKURA, 2011).

A rainha tem a atribuição de realizar a postura de ovos, sendo que, os ovos fertilizados geram operárias ou rainhas, enquanto os ovos que não são fertilizados originam zangões (RATNIEKS e KELLER, 1998). As atividades das abelhas operárias na colônia variam conforme sua idade, podendo atuar na limpeza, produção de geleia real, construção de favos, coleta de alimento, defesa da colônia, entre outras. Os zangões de *A. mellifera* apresentam apenas função reprodutiva, pois, as estruturas relacionadas com o trabalho, como probóscide, mandíbulas, estrutura para coleta de pólen nas pernas (corbícula), entre outras, são reduzidas ou ausentes (WINSTON, 2003).

Os ovos são depositados nos alvéolos de cera dos favos e, após três dias, eclodem

dando início a fase larval que ocorre enquanto os alvéolos estão abertos, sendo o período de alimentação, ganho de peso e crescimento do inseto em desenvolvimento (WINSTON, 2003).

As larvas passam por cinco ínstares (L1, L2, L3, L4 e L5) (Figura 1). De modo geral, nos quatro primeiros, ocorre uma muda por dia para operárias e rainhas, possibilitando o crescimento rápido por meio da substituição do exoesqueleto (MICHELETTE e SOARES, 1993). A última fase larval, também denominada fase pré-pupal, é caracterizada pela ecdise e síntese da cutícula definitiva, bem como, pela ocorrência de mudanças internas nos músculos e órgãos (SNODGRASS, 1956; WINSTON, 2003). Adicionalmente, a célula é operculada, a larva muda de posição, mantendo-se reta e imóvel, deixa de se alimentar e passa a tecer seu casulo e na sequência ocorre a defecação larval (MICHELETTE e SOARES, 1993; CRUZ-LANDIM, 2009).

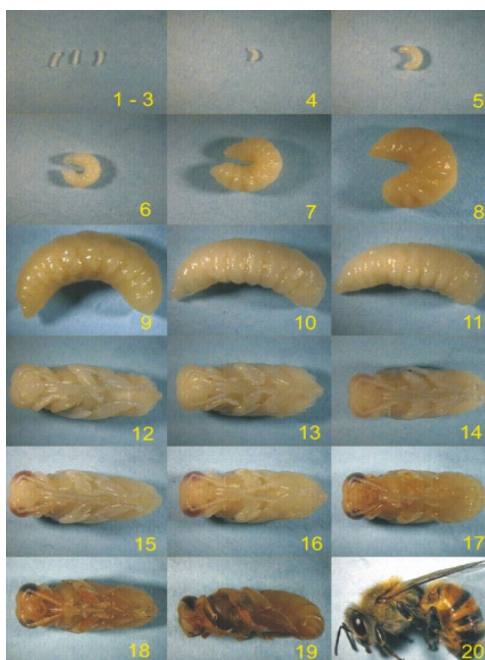


Figura 1 - Desenvolvimento ontogenético de operárias de abelhas *A. mellifera* africanizada. Os números indicam dias após a postura dos ovos: ovo (dias 1 a 3); larva (dias 4 a 9); pré-pupa (dia 10 e 11); pupa (dias 12 a 19); adulto (dia 20). Fonte: NUNES-SILVA et al., 2006).

Na fase de pupa, é possível distinguir cabeça, tórax e abdômen, bem como, olhos, pernas, asas, antenas e partes bucais. Até emergir a abelha adulta, a pupa passa por modificações na coloração dos olhos e do corpo, por isso, as sucessivas fases pu foram estabelecidas empregando parâmetros da cor do olho e da pigmentação da cutícula torácica (MICHELETTE e SOARES, 1993). Ao término da metamorfose, com a transformação

completa, o adulto recém-formado corta o opérculo com a ajuda da sua mandíbula e sai do alvéolo (WINSTON, 2003).

3 I POLINIZAÇÃO E INSETICIDAS NEONICOTINOIDES

A polinização é um processo importante em que ocorre o transporte de grãos de pólen de uma flor para outra flor, entre estruturas reprodutivas de uma mesma flor, na mesma planta ou em plantas diferentes (FAEGRI e VAN DER PIJL, 1979). Cerca de 90% das plantas são polinizadas por animais (OLLERTON et al., 2011), sendo os insetos, os principais responsáveis por esse processo (GIANNINI et al., 2015).

As abelhas são insetos caracterizados como polinizadores dominantes em distintos sistemas agrícolas (LEBUHN et al., 2016), mantendo a biodiversidade e a produtividade agrícola de uma ampla variedade de cultivos (BAINES et al., 2017). Esses insetos são eficazes para a maioria das flores (GARIBALDI et al., 2013), e, por isso, visitam mais de 90% dos 107 principais cultivos, contribuindo para o aumento da produção agrícola em 75% das culturas globalmente importantes (KLEIN et al., 2007).

No Brasil, as abelhas encontram-se associadas a polinização de 132 cultivos, identificadas por polinizar 91 deles e caracterizando-se como polinizadores exclusivos de 74 desses cultivos (WOLOWSKI et al., 2019). Giannini et al. (2015), analisando 141 lavouras brasileiras, verificaram que os polinizadores são essenciais para 18 cultivos e, para outras 25 culturas avaliadas, existindo uma grande dependência do processo de polinização por esses insetos.

Em 2015, a contribuição total anual dos polinizadores no Brasil correspondeu a US\$ 12 bilhões, ou seja, 30% da produção total (GIANNINI et al., 2015). Segundo o Relatório de Avaliação sobre Polinizadores, Polinização e Produção de Alimentos da IPBES, o valor econômico global da polinização em 2016 foi estimado entre US\$ 235 bilhões e US\$ 577 bilhões (IPBES, 2016). Em 2018, baseando-se no valor de produção anual disponível para 67 espécies de plantas, no Brasil, o montante deste serviço ecossistêmico para produção de alimentos foi estimado em cerca de R\$ 43 bilhões, sendo 80% deste total relacionados a cultivos de elevada importância agrícola incluindo soja, café, laranja e maçã (WOLOWSKI et al., 2019).

Apesar de sua importante função polinizadora, a redução na abundância e diversidade de abelhas sem ferrão e melíferas têm sido reportadas em várias regiões do mundo (POTTS et al., 2010). Inúmeros fatores têm contribuído para as perdas das colônias de abelhas, como desintegração e perda de habitat (POTTS et al., 2010; SHEFFIELD et al., 2016), estresse (VAN DER ZEE et al., 2014), altos níveis de parasitas (SHEFFIELD et al., 2016) e uso intensivo de inseticidas devido à expansão das áreas agrícolas (RUVOLO-TAKASUSUKI et al., 2015; SHEFFIELD et al., 2016; MOREIRA et al., 2018).

No Brasil, importante produtor agrícola, a safra 2019/2020 registrou o plantio de

uma área de 64,2 milhões de hectares, com produção de 248 milhões de toneladas de grãos, apresentando crescimento de 6,1 milhões de toneladas acima da safra anterior (CONAB, 2020). Contudo, além da expressiva produção, o registro de novos produtos e a comercialização de inseticidas também se expandiu. No período de 2007 a 2014, verificou-se crescimento da comercialização de agrotóxicos passando de 623.353.689 kg para 1.552.998.056 kg, representando um aumento de 149,14% (MAPA, 2014). Em 2019, o comércio de agrotóxicos totalizou 620.537,98 toneladas de ingredientes ativos, o que representa um acréscimo de 12,97% nas vendas internas em relação a 2018 (IBAMA, 2021).

De acordo com o relatório de registros concedidos do MAPA, de 2015 para 2018, observou-se aumento de 220% na quantidade de registros de inseticidas autorizados. Em 2020, 493 registros foram realizados e até sete de julho de 2021, 224 registros foram concedidos (MAPA, 2021).

A classe de inseticidas neonicotinoides tem se destacado no mercado. Estes são eficientes no controle de pragas em culturas agrícolas, entretanto, podem afetar insetos não-alvo como os polinizadores (BLACQUIÈRE et al., 2012). Atuam como agonistas do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChRs) e fornecem a maior parte da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central de insetos (DEGLISE et al., 2002; TOMIZAWA e CASIDA, 2005). Oposto à acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, os neonicotinoides não são degradados imediatamente, o que promove a transmissão contínua de impulsos nervosos que ocasionam a hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (GALLO et al., 2002; FARIA, 2009), paralisia e morte (TOMIZAWA e CASIDA, 2005).

O emprego de diferentes agrotóxicos desta classe no controle de pragas de culturas agrícolas, por meio de pulverização, tratamentos de sementes e adições no solo (BLACQUIÈRE et al., 2012) foi intensificado nos anos 90, a partir da introdução do neonicotinoide imidacloprido. Este composto é conhecido quimicamente por 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine, apresenta fórmula bruta $C_9H_{10}ClN_5O_2$ (Figura 2) e pode ser empregado em diferentes culturas, como: abacaxi, abóbora, alface, alho, algodão, berinjela, banana, café, cana-de-açúcar, eucalipto, citrus, feijão, mamona, manga, melão, melancia, milho, pinus, soja, sorgo, tomate, trigo, entre outras (ANVISA, 2020).

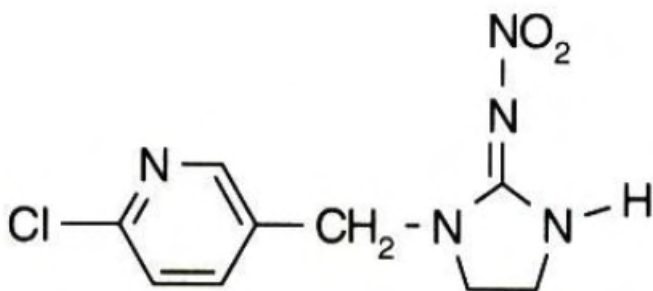


Figura 2 - Fórmula estrutural do imidacloprido.

Fonte: ANVISA, 2020.

A ampla aplicação e persistência dos neonicotinoides no solo ou na água, além do potencial de absorção ao longo de colheitas sucessivas, permitem que estes agrotóxicos se tornem biodisponíveis aos polinizadores em concentrações subletais em grande parte do ano (VAN DER SLUIJS et al., 2013). A exposição das abelhas aos agrotóxicos pode ocorrer por meio de contato direto, ingestão de recursos contaminados e inalação (aerossóis) (VAN DER SLUIJS et al., 2013). Além disso, a exposição mediante a poeira de máquinas de plantio, aos exsudatos de plantas, contaminação da água e do solo, também expõem os polinizadores aos agrotóxicos (GODFRAY et al., 2014).

Para determinar o nível de toxicidade proporcionada pelos agrotóxicos em laboratório, realiza-se a estimativa da dose letal para 50% da população testada (DL_{50}), ou concentração letal para 50% da população testada (CL_{50}) em 24 ou 48 horas (GALLO et al., 2002; PEREIRA, 2010). Além da mortalidade, é essencial avaliar os efeitos subletais destes contaminantes na morfologia, fisiologia e comportamento das abelhas (TAREK et al., 2018).

Em *A. mellifera*, experimento com imidacloprido indicou níveis mais baixos de dois carotenoides (α -caroteno e α -criptoxantina) e α -tocoferol. Já a exposição a tiametoxam aumentou o nível dos metabólitos oxidados da vitamina A nas abelhas, juntamente com a peroxidação lipídica (GAUTHIER et al., 2018). Além disso, esse mesmo neonicotinoide aumentou a atividade da catalase e glutatona S-transferase, os quais, são indicativos da ocorrência do estresse oxidativo em *A. mellifera*, (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012).

Investigando os danos causados por uma concentração subletal de tiametoxam na cabeça e no intestino médio de *Apis mellifera*, Decio et al., (2021), confirmaram que o neonicotinoide aumentou a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e da glutatona-S-transferase (GST), enquanto a atividade da carboxilesterase (CaE3) diminuiu nas cabeças das abelhas. No intestino médio houve aumento da GPX e o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) também mostrou diferenças. Os autores concluíram que no intestino ocorreu uma ativação do sistema de defesa antioxidante que

foi maior do que no cérebro, sugerindo que a contaminação oral deixou o intestino médio mais suscetível aos efeitos do estresse oxidativo.

Christen, Mittner e Fent (2016), realizaram a exposição de *A. mellifera* a doses campo realistas dos neonicotinoides acetamiprido, clotianidina, imidacloprido e tiametoxam. Os resultados indicaram alterações transcricionais de oito genes (receptor nicotínico de acetilcolina α 1 e subunidade α 2, vitelogenina, apidaecina e defensina-1, catalase, pka e creb). Dentre eles, pode-se observar indução na transcrição da vitelogenina sugerindo efeitos adversos na atividade de forrageamento, e, uma regulação negativa dos genes *creb* e *pka* o que pode diminuir a formação da memória de longo prazo.

Do mesmo modo, uma regulação negativa na expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídios, mecanismos de transporte, desintoxicação e proteínas da geleia real (*hbg3* e *cyp9e2*) foram observados no cérebro de *A. mellifera* após exposição aos neonicotinoides clotianidina, imidacloprido e tiametoxam. Possivelmente, os efeitos dos neonicotinoides sobre a expressão de importantes genes, podem ter relação com o comprometimento fisiológico das abelhas contaminadas por esses compostos (CHRISTEN et al., 2018).

Testando os neonicotinoides imidacloprido, acetamiprido e tiacloprido por via oral em *A. mellifera*, Jacob et al. (2019) confirmaram que todos os compostos prejudicaram a velocidade, distância percorrida, duração e frequência de repouso e mobilidade contínua nos insetos expostos. Delkash-Roudsari et al. (2020) verificaram que a exposição à curto prazo de *A. mellifera* ao neonicotinoide imidacloprido e ao organofosforado ethion afetou adversamente abelhas forrageiras reduzindo o ritmo circadiano o que pode causar diretamente a falha individual das abelhas por exposição prolongada atrapalhando o desempenho da colônia.

De acordo com Cook (2019), os neonicotinoides imidacloprido e clotianidina alteraram aspectos importantes da fisiologia nutricional com redução nos níveis de proteínas, lipídios, carboidratos e glicogênio, o peso corporal de *A. mellifera*, bem como, reduziram a taxa metabólica, sugerindo a interferência desses compostos em vias neurofisiológicas e endócrinas das abelhas.

Tavares et al. (2015) ao expor larvas de *A. mellifera* ao tiametoxam na concentração subletal de 1,43 ng/ μ L verificaram por meio de análises morfológicas e imunocitoquímicas células mais condensadas no cérebro e morte celular precoce nos lobos ópticos. Esse mesmo neonicotinoide afetou a capacidade de voo de *A. mellifera* após dois dias de exposição (TOSI et al., 2017).

Analisando os efeitos subletais dos neonicotinoides tiacloprido, imidacloprido e clotianidina em *A. mellifera* L., Brandt et al. (2015), confirmaram que todos os compostos prejudicaram a imunocompetência individual das abelhas melíferas, o que pode prejudicar a capacidade de resistência a doenças.

A avaliação na espécie *A. mellifera* após exposição a imidacloprido indicou

danos nas células digestivas no intestino médio desses insetos (CATAE et al., 2018). Os neonicotinoides imidacloprido, acetamiprido e dinotefuran promoveram no intestino médio de *A. mellifera* degeneração vacuolar leve com picnose do núcleo em algumas células do epitélio, além de proliferação moderada de células que revestem o intestino médio com aumento do número de células caliciformes (ABDALLA e EL-WASSEF, 2019).

Nessa mesma espécie a exposição ao tiametoxam promoveu no intestino médio, início da secreção e perda celular para o lúmen, as células regenerativas não estavam em sua forma característica, a membrana peritrófica apresentou-se desorganizada com ausência de células regenerativas (PIZZAIA, et al., 2021). Essas alterações podem comprometer a absorção de nutrientes e afetar a vida do inseto.

O composto tiacloprido também comprometeu o forrageamento, orientação e comunicação social de *A. mellifera carnica* após várias semanas de exposição em campo (TISON et al., 2016). Este mesmo composto utilizado na alimentação de *A. mellifera* durante sete dias, confirmou o desequilíbrio da microbiota intestinal das abelhas (LIU et al., 2020). Do mesmo modo, abelhas melíferas expostas ao tiacloprido e tiametoxam em condições naturais, apresentaram uma redução significativa na microbiota intestinal, os quais, pode comprometer a funcionalidade ecossistêmica desses polinizadores (ALBERONI et al., 2021).

Shi et al. (2020) ao expor larvas e abelhas adultas de *A. mellifera* ao neonicotinoide acetamiprido, verificaram alterações no desenvolvimento afetando o peso e taxa de emergência. Este mesmo neonicotinoide propiciou a redução no tempo de vida de operárias de *A. mellifera*, comprometendo a memória e declínio do sucesso da resposta de extensão da probóscide (PER) (SHI et al., 2019).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A polinização realizada por abelhas apresenta grande incremento na quantidade e qualidade de diferentes frutos e culturas agrícolas. A utilização de inseticidas em campo precisa acontecer de forma orientada para que os polinizadores não sejam expostos a concentrações elevadas desses produtos.

Assim, por meio da realização de pesquisas é possível identificar modificações que podem comprometer o desenvolvimento da colônia e fornecer dados para desenvolver ou aprimorar produtos e/ou moléculas tornando-as menos agressivas aos insetos não-alvo.

REFERÊNCIAS

ABD ALLA, A.; EL-WASSEF, A. M. Lethal and histological effects of neonicotinoids insecticides on *Apis*

mellifera (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 10, p. 543-548, 2019.

ALBERONI D., FAVARO, R., BAFFONI, L., ANGELI, S., DI GIOIA, D. Neonicotinoids in the agroecosystem: In-field long-term assessment on honeybee colony strength and microbiome. **Science of The Total Environment**, v. 762, 2021.

ALBURAKI, M.; BOUTIN, S.; MERCIER, P. L.; LOUBLIER, Y.; CHAGNON, M.; DEROME, N. Neonicotinoid-coated Zea mays seeds indirectly affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-20, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico I13: Imidacloprido. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4400json-file-1>>. Acesso em: 09, outubro, 2021.

BACHA JÚNIOR, G. L.; FELIPE-SILVA, A. S.; PEREIRA, P. L. Taxa de infestação por ácaro *Varroa destructor* em apiários sob georreferenciamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1471-1473, 2009.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 22-31, 2012.

BAINES, D.; WILTON, E.; PAWLUK, A.; GORTER, M.; CHOMISTEK, N. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-18, 2017.

BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C. A. M.; MOMMAERTS, M. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973-992, 2012.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 274-281, 2014.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; PRATAVIEIRA, M.; MENEGASSO, A. R. S.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 109-121, 2018.

CODLING, G.; NAGGAR, Y. A.; GIESY, J. P.; ROBERTSON, A. J. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. **Chemosphere**, v. 144, p. 2321-2328, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira grãos. Safra 2019/2020. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 19, junho, 2021.

COOK, S.C. Compound and Dose-Dependent Effects of Two Neonicotinoid Pesticides on Honey Bee (*Apis mellifera*) Metabolic Physiology. **Insects**. v. 10, n. 1, 2019.

COWLES, R. S.; EITZER, B. D. Residues of neonicotinoid insecticides in pollen and nectar from model plants. **Journal Environmental Horticulture**, v. 35, p. 24-34, 2017.

CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 4071-4081, 2016.

CHRISTEN, V.; SCHIRRMANN, M.; FREY, J. E.; FENT, K. Global transcriptomic effects of environmentally relevant concentrations of the neonicotinoids clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 13, p. 7534-7544, 2018.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. UNESP, 2009, 1250p.

DECIO, P.; MIOTELO, L.; PEREIRA, F. D. C.; ROAT, T. C.; MARIN-MORALES, M. A.; MALASPINA, O. Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicol Environ Saf**. v. 223, p. 112581, 2021.

DEGLISE, P.; GRUNEWALD, B.; GAUTHIER, M. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. **Neuroscience Letters**, v. 321, p. 13-16, 2002.

DELKASH-ROUDSARI, S.; CHICAS-MOSIER, A.M.; GOLDANSAZ, S.H.; TALEBI-JAHROMI, K.; ASHOURI, A.; ABRAMSON, C. I. Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glyphosate on aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111108, 2020.

DERECKA, K.; et al. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, 2013.

DORNELES, A. L.; SOUZA ROSA, A.; BLOCHTEIN, B. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 48, p. 612-620, 2017.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**, 3rd edition. Pergamon, Oxford, 1979, 244p.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v. 5, p. 345-358, 2009.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Sub-lethal effects of agricultural pesticides and their impacts on the management of pollinators in brazilian agroecosystems. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 282-298, 2010.

FREITAS, P. V. D. X.; RIBEIRO, F. M.; ALMEIDA, E. M.; ZANATA, R. A.; ALVES, J. J. L.; OLIVEIRA, V. F.; FAQUINELLO, P. Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **PUBVET**, v. 11, p. 1-102, 2017.

GALLO, D.; et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GARIBALDI, L. A.; et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, v. 339, p. 1608-1611, 2013.

GARIBALDI, L. A.; et al. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science**, v. 351, p. 388-391, 2016.

GAUTHIER, M.; ARAS, P.; PAQUIN, J.; BOILY, M. Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v.8, p. 1-11, 2018.

GIANNINI, T. C.; et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209-223, 2015.

GODFRAY, H. C. H.; et al. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings Royal Society B**, v. 281, p. 1-9, 2014.

JACOB, C.R.O.; MALAQUIAS, J.B.; ZANARDI, O.Z.; SILVA, C.A.S.; JACOB, J.F.O.; YAMAMOTO, P. T. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, p. 744-753, 2019.

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, p. 143-156, 1970.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de Comercialização de Agrotóxicos. 2019. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 10, outubro, 2021.

IPBES. **The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 2016, 552p.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, p. 478-483, 2011.

KLEIN, A. M.; et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings Royal Society B**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KRUPKE, C. H.; HUNT, G. J.; EITZER, B. D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **Plos One**, v. 7, p. 1-8, 2012.

LEBUHN, G.; DROEGE, S.; CONNOR, E.; GEMMILL-HERREN, B.; AZZU, N. Protocol to detect and monitor pollinator communities guidance for practitioners. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5367e.pdf>>. Acesso em: 12, outubro, 2021. Rome: **FAO**, 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informações técnicas**. 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 14, outubro, 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registros concedidos 2005-2021. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos->

agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 12, outubro, 2021.

MICHELETTE, E. R. F.; SOARES, A. E. E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 24, p. 431-440, 1993.

MOREIRA, D. R.; et al. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 33, p. 463-475, 2018.

MULLIN, C. A.; et al. High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: Implications for honey bee health. **Plos One**, v. 5, p. 1-19, 2010.

NUNES-SILVA, P.; GONÇALVES, L.; FRANCOY, T. M.; JONG, D. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 23, p. 325-332, 2006.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, p. 1122-1133, 2014.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321-26, 2011.

PADILHA, A. C.; et al. Toxicity of insecticides; on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 29, p. 119-128, 2020.

PATEL, N. G.; HAYDAK, M. H.; GOCHNAUER, T. A. Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. **Nature**, v. 186, p. 633-634, 1960.

PEREIRA, A.M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 124p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PIZZAIA, W. C. S.; et al. Toxicological and morphological analysis of Africanized *Apis mellifera* selected for tolerance to the neonicotinoid thiamethoxam. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 1-13, 2021.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, p. 345-353, 2010.

POTTS, S. G. Safeguarding pollinators and their values to human well being. **Nature**, v. 540, p. 220-229, 2016.

RATNIEKS, F. L. W.; KELLER, L. Queen control of egg fertilization in the honey bee. **Behavioral Ecology & Sociobiology**, v. 44, p. 57-61, 1998.

REMBOLD, H. Caste differentiation of the honeybee, fourteen years of biochemical research at Martinsried, p. 3-13. In: J. EDER & H. REMBOLD (Eds). **Chemistry and Biology of Social Insects**.

München, Verlag Peperny, 1987.

ROUBIK, D.W. **The pollination of cultivated plants**. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 2018, 324p.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; et al. **Biomonitoring the environmental quality by bees**. In: Price A, Kelton J, Sarunaite L, eds. *Herbicides, physiology of action, and safety*. IntechOpen, 97-122, 2015.

SANDROCK, C.; TANADINI, L. G.; PETTIS, J. S.; BIESMEIJER, J. C.; POTTS, S. G.; NEUMANN, P. Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 16, p. 119-128, 2014.

SHEFFIELD, C. S.; NGO, H. T.; AZZU, N. **A manual on apple pollination**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5527e.pdf>>. Acesso em: 20, outubro, 2021.

SHI, J.; LIAO, C.; WANG, Z.; ZENG, Z.; WU, X. Effects of sublethal acetamiprid doses on the lifespan and memory-related characteristics of honey bee (*Apis mellifera*) workers. **Apidologie**, v.50, p. 553–563, 2019.

SHI, J.; ZHANG, R.; PEI, Y.; LIAO, C.; WU, X. Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 2-9, 2020.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the honeybee**. Ithaca, New York, Comstock Publishing Ass., 1956, 334p.

STONER, K. A.; COWLES, R. S.; NURSE, A.; EITZER, B. D. Tracking pesticide residues to a plant genus using palynology in pollen trapped from honey bees (Hymenoptera: Apidae) at ornamental plant nurseries. **Environmental Entomology**, v. 48, p. 351-362, 2019.

TAREK, H.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; MORFIN, N.; GUZMAN-NOVOA, E. Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 2, p. 1-14, 2018.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TISON, L.; et al. Honey Bees' Behavior Is Impaired by Chronic Exposure to the Neonicotinoid Thiocloprid in the Field. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 7218–7227, 2016.

TOMÉ, H. V.; et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society open science**, v. 4, p. 160866, 2017.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, p. 247-268, 2005.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v.7, p. 1361-1368, 2017.

VAN DER SLUIJS, J. P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 5, p. 293-305, 2013.

VAN DER ZEE, R.; et al. Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 53, p.19-34, 2014.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Harvard University Press, 2003, 109p.

WOLOWSKI, M.; et al. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. São Carlos, SP: Editora Cubo. 2019, 184p.

LIU, Y. J.; et al., Thiacloprid exposure perturbs the gut microbiota and reduces the survival status in honeybees. **Journal of Hazardous Materials**, v. 389, p. 1-11, 2020.

BURITI (*Mauritia flexuosa* L): IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E OS IMPACTOS DA AÇÃO HUMANA SOBRE A POPULAÇÃO DE BURITIZEIROS EM CIDADES DA REGIÃO LESTE MARANHENSE

Data de aceite: 01/11/2021

Data da submissão: 20/09/2021

Milton de Sousa Falcão

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão - IFMA
Teresina – Piauí
<https://orcid.org/0000-0002-2560-8114>

Francisca das Chagas Oliveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí - IFPI
Teresina – Piauí
<https://orcid.org/0000-0002-6262-9125>

Glaziane Soares Alvarenga

Universidade Federal do Maranhão - UFMA
Teresina – Piauí
<https://orcid.org/0000-0003-0684-4565>

Claudio Wesley Diniz do Carmo

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão - IFMA
Zé Doca – Maranhão
<https://orcid.org/0000-0002-4658-7316>

RESUMO: O buritizeiro (*Mauritia flexuosa* L.) é uma palmeira de grande porte da família Arecaceae encontrada no leste maranhense margeando riachos perenes e lagos principalmente na bacia

do Rio Parnaíba; sua importância ecológica deve-se ao fato de contribuir para manutenção da umidade do solo e redução da evaporação em cursos d'água. Seus frutos representam fonte de alimentos para animais silvestres e compõem a culinária de moradores da região. O riacho Pinto localizado na cidade de Timon-MA vem sofrendo constante perda de cobertura vegetal por ação do desmatamento e alterações do curso d'água com consequências diretas sobre a redução da área de buritizal; tais ações impactam todo o ecossistema local e ameaçam a atividade extrativista praticada pela população. Um estudo e mapeamento das ações humanas na região foi realizado com o intuito de ajudar a compreender os principais mecanismos de agressão ambiental, as consequências destas atividades e formas de intervenção visando minimizar os impactos negativos ao meio ambiente. Foram encontradas 5 propriedades rurais comercializadas por meio de loteamentos para construção de sítios com que aproveitam das margens do riacho como estratégia de venda; 12 balneários e vários sítios que exploram o leito do riacho e modificam seu curso com a construção de desvios, barragens ou tanques de piscicultura que reduzem o fluxo de águas em trechos logo a frente, levando alguns pontos a perda de perenidade; há ainda, alguns casos de exploração das margens do riacho para agricultura ou pecuária. Os resultados mostram que cerca de 50% da área de buritizal encontra-se modificada e que as ações predatórias são resultantes principalmente da não observação da legislação ambiental e que uma intervenção urgente faz-se necessária a fim de reverter as alterações promovidas até o momento e impedir

que novas atividades predatórias ocorram no riacho Pinto e em outros cursos d'água com características semelhantes.

PALAVRAS-CHAVE: Barragem das águas; Buriti; Desmatamento; Riacho Pinto.

BURITI (*Mauritia flexuosa* L): ECOLOGICAL IMPORTANCE AND THE IMPACTS OF HUMAN ACTION ON THE POPULATION OF BURITIZERS IN CITIES IN THE EAST REGION OF MARANHÃO

ABSTRACT: Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) is a large palm tree of the Arecaceae family found in eastern Maranhão bordering perennial streams and lakes, mainly in the Parnaíba River basin. its ecological importance is due to the fact that it contributes to maintaining soil moisture and reducing evaporation in water courses. Its fruits represent a source of food for wild animals and make up the cuisine of the region's residents. The Pinto stream located in the city of Timon-MA has been suffering constant loss of vegetation cover due to deforestation and changes in the watercourse with direct consequences on the reduction of the buritizal area; such actions impact the entire local ecosystem and threaten the extractive activity practiced by the population. A study and mapping of human actions in the region was carried out in order to help understand the main mechanisms of environmental aggression, the consequences of these activities and intervention to minimize negative impacts on the environment. There were found 5 rural properties marketed through subdivisions for the construction of sites with which they take advantage of the banks of the stream as a sales strategy; 12 spas and several properties that exploit the creek bed and change its course with the construction of diversions, dams and fish ponds that reduce water flow in stretches up ahead, leading some points the loss of continuity; there are still some cases of exploitation of the banks of the stream for agriculture or livestock. The results show that about 50% of the buriti forest area is modified and that predatory actions are mainly the result of non-compliance with environmental legislation and that urgent intervention is needed in order to reverse the changes promoted so far and prevent new predatory activities from occurring in the Pinto stream and other watercourses with similar characteristics.

KEYWORDS: Buriti; Pinto stream; Dam stream; Deforestation.

1 | INTRODUÇÃO

De nome científico *Mauritia flexuosa* L., o buritizeiro, também conhecido como miritizeiro, palmeira-do-brejo, buriti-do-brejo ou moriti, é uma palmeira de grande porte da família Arecaceae encontrada em regiões áreas alagadas e úmidas do Cerrado e Amazônia no Centro, Norte e Nordeste do Brasil e outros países da América Central e do Sul (DE SOUZA, 2020).

No leste maranhense é encontrada margeando riachos perenes e lagos por todo o trecho que compreende a bacia do Rio Parnaíba; sua enorme importância ecológica deve-se ao fato de contribuir para manutenção da umidade do solo e redução da evaporação em cursos d'água, mantendo assim, o microclima da região.

Seus frutos e restos de raízes representam fonte de alimentos de aves, mamíferos

e peixes importantes para cadeia alimentar aquática e terrestre, além de compor a culinária de moradores da região com o preparo de doces a partir da polpa e na extração do óleo das sementes, rico em pró-vitamina A (SAMPAIO,2011; KOOLEN, 2018); o artesanato de produtos a base de buriti é outra característica marcante entre as populações de áreas de buritizal que produz desde brinquedos e adornos até instrumentos domésticos e vestuário (SANTOS;COELHO-FERREIRA,2012). Sua presença é cada vez mais marcante nos campos da biotecnologia, nutrição e biomedicina com estudos que têm demonstrado sua ação antioxidante (CANDIDO;SILVA;AGOSTINI-COSTA,2015), biodisponibilidade diferenciada para determinados nutrientes (YUYAMA,1998), ação antimicrobiana (BATISTA,2012) dentre outros.

O riacho Pinto, com extensão de 72 Km e nascentes na zona rural da cidade de Timon – MA entre os povoados Carnaubinha, Bandeira e Boqueirão, vem sofrendo constante perda de cobertura vegetal por ação do desmatamento e alterações do curso d'água com consequências diretas sobre a redução da área de buritizal. Tais ações impactam todo o ecossistema local atingindo espécies que veem no buritizal seu nicho ecológico e a atividade extrativista praticada pela população.

Esta produção sistematiza a pesquisa realizada para o diagnóstico da intervenção humana no riacho Pinto em situações que fogem a legislação brasileira vigente e os impactos para conservação de área de buritizal peculiar da região do leste maranhense por sua importância para o meio ambiente e o clima local e atividades extrativistas e artesanais da população.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Um estudo e mapeamento das ações humanas na região foi realizado com o intuito de ajudar a compreender os principais mecanismos de agressão ambiental, as consequências destas atividades e formas de intervenção visando minimizar os impactos negativos ao meio ambiente. A partir da tipificação das atividades humanas adotadas na região pode se constatar as principais formas de degradação ambiental.

Para fins de mapeamento da área de escoamento das águas do riacho Pinto foram realizadas observações de imagens de satélite utilizando a ferramenta Google Earth e mapas hidrográficos; O mapeamento das populações de buritis e áreas desmatadas ou impactadas por outras razões deram-se por pesquisa de campo nos períodos de março a junho de 2020 e de outubro de 2020 a janeiro de 2021.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toda a extensão do riacho, desde sua nascente até o encontro com o Rio Parnaíba, encontra-se em área rural da cidade de Timon - MA (Figura 1); esta particularidade contribui

para a conservação do curso d'água e de sua vegetação várzea. Seu leito corta diversas propriedades particulares de médio e pequeno porte; sua água e seus recursos são explorados para agricultura familiar, pecuária de subsistência e consumo humano.

Nos últimos anos, uma nova e agressiva atividade tem se desenvolvido nesta área; a exploração imobiliária, com o loteamento e venda de terras para construção de sítios e chácaras ou condomínios fechados, que modificam as margens do riacho a fim de criar um apelo ecológico capaz de atrair pessoas interessadas em tais empreendimentos. A modificação do leito do rio para construção de tanques para piscicultura ou áreas de lazer é outro fator capaz de alterar a perenidade do riacho impactando todo o ecossistema a ele integrado.

O desmatamento para aproveitamento agropecuário é outra atividade observada e apontada em várias pesquisas como um dos grandes vilões da preservação de cursos d'água no Brasil conforme relatado por Nascimento, 2021 e Figueiredo, 2009, Estas são as maiores ameaças a área de buritizal da região em que se encontra o Riacho Pinto.



Figura 1. Localização da cidade de Timon - MA.

Dentre as agressões a área de buritizal que margeia o riacho Pinto, foram encontradas 5 propriedades rurais comercializadas por meio de loteamentos para construção de sítios com grande apelo ao aproveitamento das margens do riacho como estratégia de venda que acabam por promover o desmatamento; o buritizal foi reduzido drasticamente com a limpeza das margens para acesso facilitado às águas do riacho; apenas algumas das palmeiras mais altas foram mantidas para fins ornamentais. Também foram registrados

12 balneários e vários sítios particulares que exploram o leito do riacho para atividades de lazer e modificam o curso do riacho com a construção de desvios, barragens ou tanques de piscicultura que reduzem o fluxo de águas em trechos logo a frente levando alguns pontos a perda de perenidade e impactando a sobrevivência de várias espécies vegetais, habituadas ao ambiente úmido, e impedindo que novos indivíduos brotem e se desenvolvam no local recompondo a vegetação degradada, seja com a espécie *Mauritia flexuosa* L., seja com outras espécies vegetais que habitam a região.

Alguns poucos casos de exploração das margens do riacho para agricultura ou pecuária também foram observados, mas embora tenham menor representatividade no quantitativo de área afetada por atividades humanas, demandam atenção e acompanhamento. O curso do riacho nas proximidades do seu encontro com o Rio Parnaíba perdeu a perenidade graças às modificações humanas; as palmeiras de buriti adultas têm resistido a falta de água mas observa-se que as sementes são consumidas por animais terrestres e não brotam e muitas árvores novas já não se desenvolvem por não resistirem ao período de seca; com isso, o clima local tem apresentado alterações capazes de inviabilizar a existência de determinadas espécies de plantas.

O código florestal brasileiro definido pela lei 12651/12 que define regras, ações e mecanismos de proteção das florestas e demais vegetações nativas trata particularmente do estabelecimento de áreas de preservação às margens e nascentes de rios e riachos (BRASIL,2012); estas contribuiriam para manter protegidos os buritizais, uma vez que, estes se desenvolvem às margens dos riachos e regiões alagadas. A não observância da aplicação dos parâmetros estipulados na legislação tem facilitado o avanço de atividades humanas sobre áreas que deveriam estar protegidas.



Figura 2. Palmeiras de Buriti (*Mauritia flexuosa* L).

Fonte: Associação Mineira de Defesa do Ambiente.

Os resultados da pesquisa de campo mostram que cerca de 50% da área de buritizal encontra-se modificada e que as ações predatórias são resultantes principalmente da não observação da legislação ambiental relacionada à conservação de áreas ribeirinhas e que uma intervenção urgente, faz-se necessária a fim de reverter as alterações promovidas até o momento e impedir que novas atividades predatórias venham a ocorrer seja no riacho Pinto, seja em uma série de outros cursos d'água que agregam matas de buritizais com características semelhantes nas cidades maranhenses de Timon, Parnarama, Matões, Caxias e Coelho Neto.

A perda de cobertura de mata de buritizal tem impactado a atividade econômica local com a redução da oferta de doces, azeites, artesanato e outros produtos à base de buriti nas feiras e mercados das cidades de Timon, Teresina e outras em seu entorno.

4 | CONCLUSÕES

A mata de buritizal presente em cidades maranhenses da região do médio Parnaíba tem grande importância ecológica, comercial e cultural mas tem sofrido grave ameaça devido a exploração irregular das margens de riachos, lagos e rios que hospedam a espécie *Mauritia flexuosa* L.. As principais ações humanas sobre a área de estudo (Riacho Pinto) estão relacionadas ao aproveitamento imobiliário da área, modificação no curso do rio com a construção de desvios ou barramentos e desmatamento da pastagem pecuária ou cultivo agrícola. Alguns pontos do curso do riacho perderam a perenidade, impactando gravemente sobre a existência do buritizal e demandando ações urgentes de preservação. Ações

estratégias de intervenção nos pontos de agressão estão relacionadas a recuperação de áreas desmatadas em observância a legislação vigente que trata da conservação de margens de rios e riachos para que novos casos de desmatamento ilegal não ocorram.

REFERÊNCIAS

Associação mineira de defesa do meio ambiente <https://www.amda.org.br/index.php/comunicacao/especie-da-vez/2678-buriti-a-palmeira-que-da-vida-as-matas-brasileiras>; acessado em 10/09/2021.

BATISTA, Jael Soares et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, p. 136-141, 2012.

BRASIL. **Lei 12.651**, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 2012.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* Lf) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

DE SOUZA, Florisvaldo Gama et al. Brazilian fruits of Arecaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, p. 109690, 2020.

FIGUEIREDO, R. de O. Estudos em pequenos riachos amazônicos (igarapés) e suas bacias alteradas por desmatamento e atividades agrícolas. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ECOLOGIA, 3., 2009, São Lourenço. Ecologia e o futuro da biosfera.[São Paulo]: SEB, 2009.

KOOLEN, Hector HF et al. Buriti fruit—*Mauritia flexuosa*. In: **Exotic fruits**. Academic Press, p. 61-67, 2018.

NASCIMENTO, Francisco Edilson Lucas; LIMA, Ernane Cortez. Os impactos socioambientais através do desmatamento na microbacia hidrográfica do Riacho Jordão (Sobral-CE, Brasil). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 59913-59922, 2021.

SAMPAIO, Maurício Bonesso et al. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do buriti. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2011.

SANTOS, Ronize da Silva; COELHO-FERREIRA, Márlia. Estudo etnobotânico de *Mauritia flexuosa* L. f. (*Arecaceae*) em comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 42, p. 1-10, 2012.

YUYAMA, Lucia KO et al. Biodisponibilidade dos carotenóides do Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) em ratos. **Acta Amazônica**, v. 28, p. 409-409, 1998.

GRUPOS FUNCIONAIS DO FITOPLÂNCTON COMO INDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RESERVATÓRIO PONTE DE PEDRA (MT/MS, BRAZIL)

Data de aceite: 01/11/2021

Data de envio: 16/09/2021

Camila Silva Favretto

Programa de Pós-Graduação em Geografia,
Universidade Federal de Rondonópolis, UFR,
Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/5732540724280328>

Simoni Maria Loverde-Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Geografia,
Universidade Federal de Rondonópolis, UFR,
Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/0888928117739623>

RESUMO: Neste estudo analisamos como os usos do solo na interface entre o planalto e a planície de inundação do Pantanal podem interferir na seleção dos grupos funcionais fitoplanctônicos do rio Correntes, formador do reservatório da Usina Hidrelétrica Ponte de Pedra (17°13'34.02"S, 53°40'22.12"O e 17°48'33.01"S, 55°09'04.96"O). A classificação dos grupos funcionais seguiu Reynolds et al. (2002) revisado por Padisák et al. (2009) e o cálculo Q (Índice Ecológico de Qualidade da Água) proposto por Padisák et al. (2006) para classificação da qualidade da água através dos grupos funcionais. Foi utilizado o banco de dados hidro-ambiental (2005 a 2011) de oito pontos de coleta. O rio Correntes se caracterizou pela elevada luminosidade, reduzida concentração de nutrientes, clorofila *a* e biomassa fitoplanctônica (0,41 a 1,31 mm³L⁻¹). Houve a formação de duas

condições ambientais: a primeira no rio Correntes a montante (COR1) e a jusante do reservatório (COR 6, 7 e 8) com ocorrência dos grupos funcionais Na, N e Y, com qualidade da água entre Bom a Excelente; e a segunda região, no corpo do reservatório com os grupos Na, P, MP, J, Na, X1, S1, com qualidade da água oscilando de Tolerável a Médio. A análise final dos dados para identificação dos efeitos dos usos do solo e operação do reservatório identificou diminuição na turbidez, fósforo e enxofre total da água em relação ao ponto de controle natural, porém não sendo verificado efeito sobre a comunidade fitoplanctônica e nem sobre os grupos funcionais dominantes descritores da qualidade da água, que foram comuns nas distintas regiões analisadas no rio Correntes.

PALAVRAS-CHAVES: Bioindicadores, Microalgas, Índice Q, Reservatório Hidrelétrico, Uso Solo.

PHYTOPLANKTON FUNCTIONAL GROUPS AS WATER QUALITY INDICATORS IN THE PONTE DE PEDRA RESERVOIR (MT/MS, BRAZIL)

ABSTRACT: In this study, we analyze how land use at the interface between the plateau and the Pantanal floodplain can interfere in the selection of phytoplankton functional groups from the Correntes river, which forms the reservoir of the Ponte de Pedra Hydroelectric Power Plant (17°13'34.02"S, 53°40' 22.12"O and 17°48'33.01"S, 55°09'04.96"O). The classification of functional groups followed Reynolds et al. (2002) reviewed by Padisák et al. (2009) and the Q calculation (Ecological Water Quality Index)

proposed by Padisák et al. (2006) for classification of water quality through functional groups. The hydro-environmental database (2005 to 2011) from eight collection points was used. The Correntes River was characterized by high luminosity, low nutrient concentration, chlorophyll a and phytoplankton biomass (0.41 to 1.31 mm³L⁻¹). Two environmental conditions were formed: the first in the Correntes river upstream (COR1) and downstream of the reservoir (COR 6, 7 and 8) with occurrence of the functional groups Na, N and Y, with water quality ranging from Good to Excellent and the second region, in the reservoir body with groups Na, P, MP, J, Na, X1, S1, with water quality ranging from Tolerable to Medium. The final analysis of the data to identify the effects of land use and reservoir operation identified a decrease in turbidity, phosphorus and total sulfur in the water in relation to the natural control point, but no effect was verified on the phytoplankton community or on the groups dominant functional descriptors of water quality, which were common in the different regions analyzed in the Correntes river.

KEYWORDS: Bioindicators, Microalgae, Q Index, Hydroelectric Reservoir, Land Use.

INTRODUÇÃO

Este capítulo analisou como os usos do solo na interface entre o planalto e a planície de inundação do Pantanal podem interferir na seleção dos grupos funcionais fitoplanctônicos, utilizados como descritores das condições ambientais e da qualidade da água. Para tanto, utilizamos o Índice Ecológico de Qualidade da Água do rio Correntes estabelecido a partir de grupos funcionais de microalgas.

Sabe-se que nos rios localizados no planalto a montante da planície de inundação do Pantanal e que drenam estas regiões, as construções de reservatórios destinados à geração de energia elétrica em empreendimentos de pequeno e médio porte tiveram um aumento significativo nos últimos anos, devido ao grande potencial energético a ser explorado, aliado a atual política de incentivos do governo junto à iniciativa privada (FIGUEIREDO; FANTIN-CRUZ, 2012).

Dentro de contexto político e econômico que visa a ampliação de geração de energia com base nos recursos hídricos, os estudos sobre as características quantitativas e qualitativas da água são relevantes para indicar o estágio de conservação ou da degradação de um corpo d'água, e segundo Souza et al. (2015) pode desta forma delimitar ações dos órgãos públicos gestores/reguladores principalmente nos rios que possuem barragens e reservatórios hidrelétricos.

No ambiente aquático as modificações são percebidas principalmente nas comunidades biológicas na base da cadeia alimentar, que podem ser utilizadas como uma ferramenta para estabelecer a qualidade da água de determinados corpos hídricos através da classificação de seus grupos funcionais fitoplanctônicos. A utilização de tais comunidades na caracterização de reservatórios se justifica pelo fato de serem abundantes em qualquer tipo de ambiente aquático que propicie as condições necessárias de sua sobrevivência (SILVA et al., 2011). Logo, toda mudança na abundância, diversidade e riqueza desses

organismos em escala espacial e temporal são respostas a uma determinada condição ambiental (GOULART; CALLISTO, 2003; RIGOTTI et al., 2016).

Neste sentido, os bioindicadores são organismos ou comunidades de organismos que produzem alguma resposta a algum tipo de mudança nas condições ambientais, por estarem diretamente ligados com fatores determinantes a sua presença no meio ambiente (NOVO, 2012). Devido à rica utilização dos bioindicadores, PAERL; HUISMAN et al. (2009) destaca a necessidade crescente dentro da comunidade científica para compreender e prever as respostas dessas comunidades às mudanças das condições ambientais, tais como: aumento das descargas de nutrientes, alterações nos regimes de fluxo e uso do solo devido à pressão antrópica crescente.

A BACIA DO RIO CORRENTES

O estudo foi conduzido na bacia do rio Correntes (Figura 1), pertence ao Alto Rio Paraguai. O rio Correntes percorre o planalto com terras altas (800 metros) na região leste em direção a oeste e adentra na região de planície pantaneira transformando-se em um ambiente lântico e bastante sinuoso, na divisa entre os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Nesta região a vegetação predominante é o Cerrado, Cerrado Estépico (Pantanal) e encaves com a floresta estacional e, em proporções menores, mantêm-se as áreas de pastagem plantada e várzea (IMASUL, 2013). O clima é o tropical úmido classificado como AW por Koppen, tendo como período chuvoso de setembro a março, com maior intensidade entre os meses de novembro e janeiro. As temperaturas médias estão entre 20°C e 24°C, com período seco de três a cinco meses, com a precipitação média anual entre 1.000 a 1.500 mm (SEMAC, 2011).

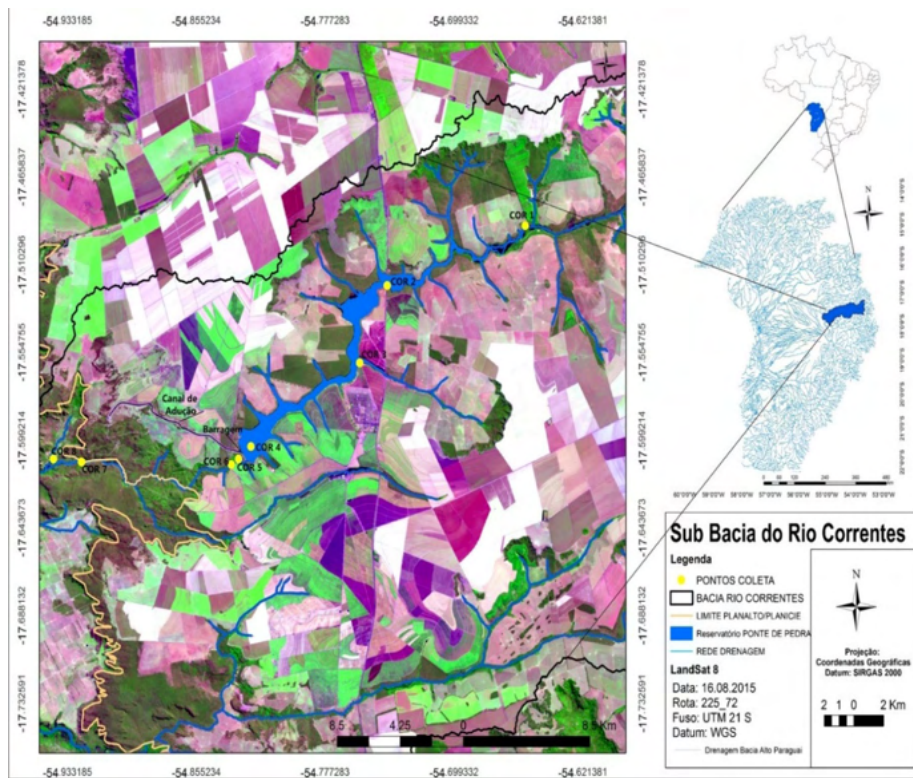


Figura 1 – Localização do reservatório da Usina Ponte de Pedra e bacia de drenagem do rio Correntes (MT/MS). Os pontos amarelos destacam os pontos de coleta.

ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS E DA QUALIDADE DA ÁGUA

O banco de dados foi disponibilizado através de parcerias público-privada (Tractebel/IPHUFGRS/UFMT/CPP/TNC), sendo que a amostragem teve periodicidade trimestral entre 2005 a 2011, com coletas em oito pontos (Figura 1).

Para a identificação das espécies do fitoplâncton foram utilizadas amostras qualitativas e quantitativas. As populações foram enumeradas em campos aleatórios (UEHLINGER, 1964) segundo o método de sedimentação (UTERMOHL, 1958). Os indivíduos (células, colônias, cenóbios e filamentos) foram enumerados até alcançar 100 indivíduos da espécie mais frequente ($p < 0,05$) de acordo com Lund et al. (1958).

Para estabelecer a classificação dos grupos funcionais a biomassa específica (mg peso fresco L^{-1}) foi calculada como o produto da densidade (ind L^{-1}) pelo volume médio de cada espécie (HILLEBRAND et al., 1999), estimado a partir de aproximações de formas geométricas, assumindo a densidade específica das células fitoplanctônicas de 1 gcm^3 (SUN AND LIU, 2003).

Os grupos taxonômicos foram estabelecidos de acordo com Van den Hoek et al. (1997). A classe Cyanobacteria (cianobactérias) foi estabelecida conforme Komárek;

Anagnostidis (1996) e a classe Bacillariophyceae (diatomáceas) segundo Round et al. (1990) e outros. Os grupos funcionais do fitoplâncton foram definidos para espécies que contribuíram, pelo menos, com 5% do fitoplâncton em cada estação (REYNOLDS et al., 2002; REYNOLDS, 2006; PADISÁK et al., 2009). Após realizar a classificação dos grupos funcionais, os mesmos dados foram utilizados como entrada para o cálculo do Índice de qualidade da água (Q) do rio Correntes e reservatório da usina Ponte de Pedra.

O índice Q foi desenvolvido por Padisák et al. (2006) objetivando avaliar o estado ecológico de diferentes tipos de lagos enquadrando-os entre as categorias de 0-5, sendo 0-1 (Ruim), 1-2 (Tolerável), 2-3 (Moderado), 3-4 (Bom), 4-5 (Excelente).

Os dados de densidade e diversidade foram logaritimizados ($\text{Log}_{10}(n+1)$) antes da análise da normalidade dos mesmos. Para responder à pergunta se: a densidade, diversidade, riqueza e biomassa total do fitoplâncton apresentavam diferença entre os anos e entre os pontos de coleta, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para resumir as variáveis ambientais.

Antes de executar esta análise, os dados foram transformados com $\text{Log}_{10}(n+1)$. As variáveis incluídas, foram: temperatura da água, pH, condutividade, transparência, cor da água, turbidez, alcalinidade total, demanda bioquímica por oxigênio (DBO), oxigênio dissolvido, nitrogênio total, amônia, nitrato, fósforo total, ortofosfato total, sólidos totais, sólidos suspensos, abundância de *E. coli*, clorofila a, N:P, totalizando 19 variáveis. Esta análise teve como objetivo a seleção das variáveis ambientais representativas nas modificações que ocorreram no ambiente. As análises foram executadas usando pacote VEGAN, do software R versão 3.2.2 (R CORE TEAM, 2015).

ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MICROALGAS

Na comunidade foram registrados 149 táxons de algas, pertencentes a oito classes taxonômicas (Zygnemaphyceae 63 táxons, Bacillariophyceae 33 táxons, Chlorophyceae 24 táxons, Cyanobacteria 15 táxons, Euglenophyceae 4 táxons, Chrysophyceae 4 táxons, Cryptophyceae 3 táxons, Dinophyceae 2 táxons e Oedogoniophyceae 1 táxon. Desse total, 15 espécies descritoras das condições ambientais foram agrupadas em 9 grupos funcionais.

A riqueza de espécies do fitoplâncton variou em média de 35 taxa/amostra na estação COR 7 até 45 taxa/amostra (COR 2). No entanto, a riqueza entres as estações não apresentou diferença, demonstrando uma homogeneidade. Enquanto que entre os anos constatou-se diferença na riqueza ($p < 0,001$). Tal diferença ocorreu entre o ano de 2005 com os anos de 2006 ($p = 0,02$), 2010 ($p = 0,003$) e 2011 ($p = 0,0001$). Já o ano de 2006 demonstrou diferença com os anos de 2008 ($p = 0,0058$) e 2009 ($p < 0,001$). E em 2007 com os anos de 2009 ($p = 0,001$), com 2010 ($p < 0,001$) e 2011 ($p < 0,001$). A diversidade de espécies foi reduzida e variou em média de 0,60 bits ind^{-1} , na estação COR4 até 0,9 bits

ind⁻¹ na estação COR2 (Tabela 1). Houve diferença na diversidade entre os pontos de coleta ($p < 0,001$).

A biomassa total também teve ampla variação quando comparada as estações de coletas, sendo em média menor no ponto COR 6 com 0,41 mm³L⁻¹ e a maior no COR2 com 1,31 mm³L⁻¹ (Tabela 1 e Figura 2). A biomassa total não apresentou diferença significativa entre os pontos de coleta, porém entre os anos apresentou diferença ($p > 0,01$).

Pontos	Riqueza	Diversidade	Biomassa
COR1	36	0,7	0,67
COR2	45	0,9	1,31
COR3	44	0,8	0,65
COR4	38	0,6	0,95
COR5	37	0,7	0,70
COR6	37	0,7	0,41
COR7	35	0,7	0,89
COR8	41	0,7	0,58

Tabela 1: Média da riqueza (taxa/amostra), diversidade (bits ind⁻¹) e biomassa total (mm³L⁻¹) por estação de coleta amostrada no rio Correntes e reservatório do UHE Ponte de Pedra, no período de 2005 a 2011.

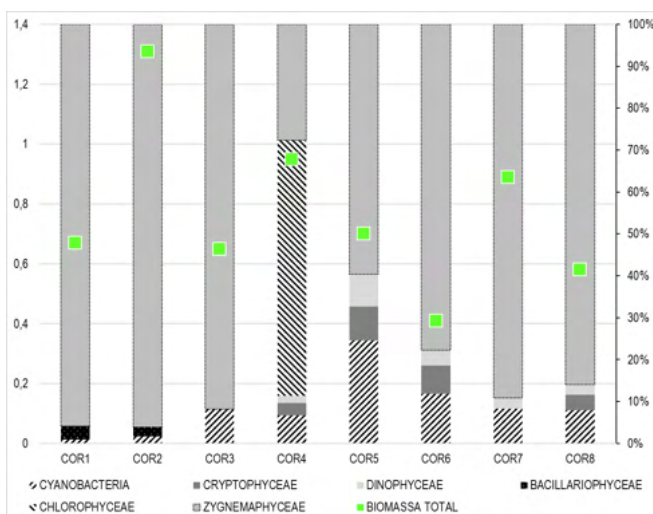


Figura 2 – Valores de biomassa total (quadrados verdes) e porcentagem das classes taxonômicas encontradas nos pontos de coleta do reservatório Ponte de Pedra, destacando a maior presente de Chlorophyceae no ponto COR 4 (barragem da usina).

GRUPOS FUNCIONAIS DESCRITORES DO AMBIENTE

Foram identificados os seguintes grupos funcionais de Reynolds (GFR): A, J, Lo, MP, Na, P, S1, Y, X1 (Figura 3 e Tabela 2). De acordo com Reynolds et al. (2002) e Padisák et al. (2009) tais grupos predominam em lagos estratificados, oligotróficos a mesotróficos, pequenos e médios, geralmente enriquecidos, com camadas mistas e turvas.

Os GFR predominantes foram Na, P e S1 em todos os pontos de coleta, além de J e X1 (Chlorophyceae) e Na, no ponto COR 4. O grupo Na contribuiu com 70% da biomassa do ponto COR 1, já o grupo J contribuiu em média com 22% da biomassa total do ponto COR 4, e sua ocorrência foi somente neste ponto (Figura 3, Tabela 2). O grupo J é comumente identificado em ambientes ricos em nutrientes, tolerante a alta disponibilidade de luz e nutrientes sendo por consequente sensível a limitação de luz (REYNOLDS et al., 2002; PADISÁK et al., 2009).

O reservatório da usina Ponte de Pedra tem boa disponibilidade de luz e pode ser classificado como oligotrófico quanto a clorofila-a, e nitrogênio total, e mesotrófico quanto ao fósforo total quando considerada a classificação trófica para lagos tropicais (SALAS; MARTINO, 1991). Tais grupos identificados são típicos de ecossistemas aquáticos brasileiros represados (TRAIN et al., 2005; DANTAS, 2010; BORGES et al., 2008; RANGEL et al., 2009; BECKER et al., 2010; PEREIRA, 2012; SANTOS, 2012; MORETI et al., 2013; COSTA, 2014; AZEVEDO, 2014).

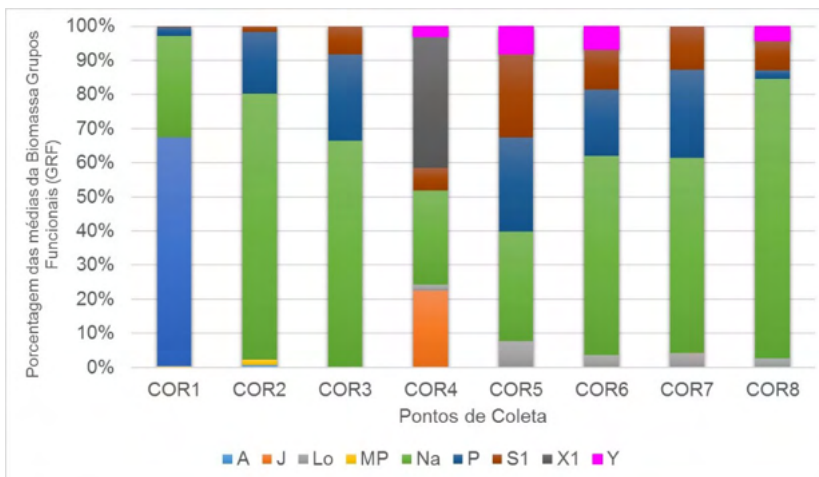


Figura 3 – Descrição das porcentagens dos grupos funcionais GFR, nos pontos de coletas do rio Correntes e reservatório Ponte de Pedra no período de estudo, tendo a principal contribuição do grupo Na em todos os pontos de coleta e uma formação de ambiente com indicação para mesotrofico no ponto localizado proximo a barragem o COR 4.

Os autores descrevem a ocorrência do grupo Na em ambientes com epilânio eutrofizado, tolerando limitação de nutriente e sensível a alcalinidade e estratificação.

Na análise de componentes principais (PCA) os dados abióticos foram resumidos a partir dos pontos de coleta. Com 19 variáveis ambientais foram selecionadas 7 que explicaram 58,74% nos dois primeiros eixos da ordenação. As variáveis que mais contribuíram para a ordenação do primeiro eixo foram cor da água ($r = 0,862$), turbidez ($r = 0,684$), N:P razão e o oxigênio dissolvido ($r = 0,617$), enquanto que para o segundo eixo foi nitrogênio total ($r = -0,615$) respectivamente (Tabela 3).

A cor da água e a turbidez representam recursos primordiais ao fitoplâncton, e este fortemente relacionada as condições do meio, ou seja, as substancias dissolvidas, partículas suspensas (BRASIL; HUSZAR, 2011).

Verificamos que os principais grupos funcionais identificados podem ser relacionados a essas variáveis explicativas da PCA, pois a cor da água, turbidez, nitrogênio e oxigênio dissolvido formaram um ambiente propício ao desenvolvimento dos organismos que compõe o grupo Na (ambientes oligo-mesotrófico) e S1 (ambientes mistos e turvos). Em condições naturais, sem alterações como por exemplo um reservatório hidrelétrico, os dois principais fatores ambientais limitantes são a insuficiência de nutrientes essenciais e a mistura da coluna d'água (REYNOLDS, 1984) sendo as tais variáveis que influenciam na manutenção destes dois fatores.

No reservatório de Barra Bonita (SP) Buzelli e Cunha-Santino (2013) avaliaram a qualidade de água e a cobertura do entorno, e verificaram que o meio físico do entorno teve influência sobre as características da água, em função do solo ser predominantemente rural. Este fato corrobora com o presente estudo, devido as principais atividades econômicas da bacia do rio Correntes serem agricultura e pastagem, as quais possivelmente exercem influência nas características da água do rio Correntes e no reservatório da usina Ponte de Pedra.

Est.	2005-2011	%	GR	Fator F	Est.	2005-2011	%	GR	Fator F
COR 1	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	5	S1	3	COR 5	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	14	S1	3
	<i>Aulacoseira</i> sp.	8	P	5		<i>Cryptophyceae</i>	12	Y	2
	<i>Navicula</i> sp.	6	MP	5		Peridinales	6	Lo	5
	<i>Actinotaenium wollei</i>	7	Na	5		<i>Closterium</i> sp.	10	P	5
	<i>Closterium</i> sp.	6	P	5		<i>Groenbladia neglecta</i>	18	Na	5
	<i>Groenbladia neglecta</i>	9	Na	5					
	<i>Micrasterias furcata</i>	13	Na	5					
<i>Xanthidium mamillosum</i>	10	Na	5						
COR 2	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	6	S1	3	COR 6	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	14	S1	3
	<i>Navicula</i> sp.	6	MP	5		<i>Cryptophyceae</i>	11	Y	2
	Pennales 1	15	A	5		Peridinales	5	Lo	5
	<i>Closterium</i> sp.	13	P	5		<i>Closterium</i> sp.	10	P	5
	<i>Groenbladia neglecta</i>	12	Na	5		<i>Cosmarium</i> sp.2	5	Na	5
	<i>Hyalotheca dissiliens</i>	6	Na	5		<i>Groenbladia neglecta</i>	16	Na	5
						<i>Hyalotheca dissiliens</i>	5	Na	5

COR 3	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	10	S1	3	COR 7	<i>Panktolyngbya limnetica</i> Peridinales	13	S1	3
	<i>Closterium</i> sp.	8	P	5		<i>Groenbladia neglecta</i>	5	Lo	5
	<i>Groenbladia neglecta</i>	10	Na	5		<i>Hyalotheca dissilens</i>	13	Na	5
	<i>Netrium digitus</i>	6	Na	5		<i>Staurastrum</i>	5	Na	5
	<i>Staurastrum corpulentum</i>	6	P	5		<i>corpulentum</i>	7	P	5
	<i>Hyalotheca dissilens</i>	5	Na	5	<i>Xanthidium mamillosum</i>	6	Na	5	
COR 4	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	12	S1	3	COR 8	<i>Panktolyngbya limnetica</i>	5	S1	3
	Cryptophyceaceae	14	Y	2		Cryptophyceaceae	5	Y	2
	Peridinales	7	Lo	5		Peridinales	5	Lo	5
	<i>Coelastrum sphaericum</i>	7	J	2		<i>Closterium</i> sp.	8	P	5
	<i>Crucigenia</i> sp.	6	X1	3		<i>Cosmarium</i> sp.2	5	Na	5
	<i>Groenbladia neglecta</i>	10	Na	5		<i>Groenbladia neglecta</i>	15	Na	5
	<i>Hyalotheca dissilens</i>	6	Na	5		<i>Hyalotheca dissilens</i>	9	Na	5

Tabela 2- Principais espécies do fitoplâncton (contribuição > 5% para o biovolume total por amostra) seus grupos taxonômicos e funcionais no rio Correntes, com base Reynolds et al. (2002), Pádisák et al. (2006) e Pádisák et al. (2009).

VARIÁVEIS	EIXO 1	EIXO 2	EIXO 3	EIXO 4	EIXO 5
COR DA ÁGUA	0,862				
TURBIDEZ	0,684				
N/P	0,617				
TEMPERATURA DA ÁGUA			-0,65		
NITROGÊNIO TOTAL		- 0,62			
CONDUTIVIDADE				0,6	
OXIGÊNIO DISSOLVIDO					0,688
EXPLICAÇÃO DOS EIXOS	20,5%	13,7%	10,08%	8,02%	6,44%

Tabela 3: Variáveis que foram selecionadas na PCA e porcentagem (%) capturada por cada eixo.

O grupo Na, frequentemente encontrado, em ambientes com alta circulação, oligomesotrófico e em lagos com baixas latitudes (SOUZA et al., 2008; PADISÁK et al., 2009), compreende desmídias pequenas e pode ocorrer em ambientes com epilímnio claro, de lagos atelomíticos onde a mistura diária impede perdas das populações por sedimentação para o hipolímnio (BRASIL; HUSZAR, 2011; BARBOSA et al., 2013; PEREIRA, 2012). Este grupo possui uma alta especificidade ecológica sendo as desmídias um destaque muito relevante no diagnóstico da conservação e manejo de ecossistema aquáticos tendo sua atuação como agente indicador biológico (AQUINO et al., 2014).

Verificamos a presença do grupo Na em todos os pontos de coleta, contudo, no

COR 4 (barragem) esteve associado a J e X1 caracterizando um ambiente mesotrófico. Indicando o início de uma modificação do ambiente oligotrófico (Na) para mais rico em nutrientes. Brasil e Huszar (2011) encontraram o grupo Na compreendido por desmídias pequenas que tendendo a dominar em ambientes epilimnio claro, com condições nutricionais intermediárias.

Quanto ao grupo P que são organismos com forte dependência na mistura física da coluna d'água, requerendo uma contínua ou semi-contínua mistura na camada entre as profundidades de 2 a 3 metros, possuem uma estreita relação com a transparência da água, e são frequentemente encontrados em ambientes eutróficos e rasos, relacionados às flutuações dos nutrientes (N e P) em lagos de baixas latitudes (PADISÁK et al., 2009; BRASIL; HUSZAR, 2011; MILLAN, 2012), características estas que não estão totalmente representadas na área de estudo. O grupo P esteve presente em todos os pontos de coleta, principalmente em COR 5 (Tabela 2 e Figura 3), localizado na barragem do reservatório. Este grupo foi observado nos reservatórios de Dourado e Passagem das Traíras por serem ambientes rasos e com forte mistura na coluna de água (TORRES, 2014).

O grupo S1, típico de ambientes turvos e constantemente misturados, se manteve presente no reservatório durante toda a escala temporal, mas com variações atingindo 22% da biomassa total no ponto COR 5 (trecho de vazão reduzida) (PADISÁK et al., 2009; CRUZ et al., 2012). Já o grupo J, comum em reservatórios rasos e ricos em nutrientes, é representado por espécies pioneiras que investem em rápida replicação celular, nas quais, os propágulos são facilmente dispersos através do vento e também no corpo de outros animais como exemplo os pássaros e insetos (REYNOLDS, 1999). Este grupo é formado por algas verdes sem movimento e não mucilaginosas proeminentes em sistemas enriquecidos, foi observado no rio Pomba-MG, (SOARES et al., 2007; CRUZ et al., 2012).

ÍNDICE DE QUALIDADE DA ÁGUA (Q) DO RIO CORRENTES

Os grupos funcionais foram a base para determinar o índice Q e atribuir valores do fator F para cada um dos grupos relacionados na Tabela 2. Estes valores foram expressos por Padisák et al. (2006) para cada tipo de lago estudado na Hungria, porém para nossa área de estudo nenhum dos lagos apresentaram características similares. Dessa forma foram atribuídos os valores considerando os grupos desejáveis e quais seriam indesejáveis para representarem a qualidade da água. Sendo assim, para o principal grupo encontrado no reservatório da usina Ponte de Pedra o Na foi atribuído o 5, enquanto que o grupo P o valor de 5, e para S1 e X1 representado por 3, já o J foi considerado 2.

O índice Q classificou as águas do reservatório variando entre tolerável a excelente (Figura 4). Dessa forma, podemos constatar que as águas do rio Correntes e do reservatório da usina Ponte de Pedra foram qualificadas em categoria média (2-3). Caracterizando dois ambientes, o primeiro a montante e a jusante (COR 1, COR 6, COR 7 e COR 8) com suas

águas nas categorias bom-excelente, sendo os principais códons dominantes Na e N, e o segundo no corpo do reservatório e a jusante no trecho de vazão reduzida (COR 2, COR 3, COR 4 e COR 5) com valores de tolerante a médio, com maior contribuição dos grupos P, S1, X1, J.

Assim para a área de estudo nos pontos COR 1, COR 6, COR 7 e COR 8 as águas foram classificadas como bom a excelente (3–5) dominando estes ambientes os grupos Na e N (Figura 3). Na área estabelecida como de transição (COR 2), foi categorizada como boa (3-4), tendo a principal ocorrência de Na seguido do P e uma pequeno contribuição do MP, sendo este dois últimos grupos associados a ambientes com indicativo de maior riqueza de nutrientes. Enquanto que os pontos COR 3, 4 e 5 foram classificados entre tolerante á médio (1-3), sendo os dois primeiros pontos dentro do corpo do reservatório e muito próximo a barragem, com dominância do grupo Na (COR 3) seguido do códon P. Nos outros dois pontos houve dominância dos códons J, P, S1, X1 e Y que são associações encontradas frequentemente em ambiente com tolerância a turbidez, ou seja, sobrevivem com reduzida disponibilidade de luz e altos níveis de nutrientes (SILVA, 2013).

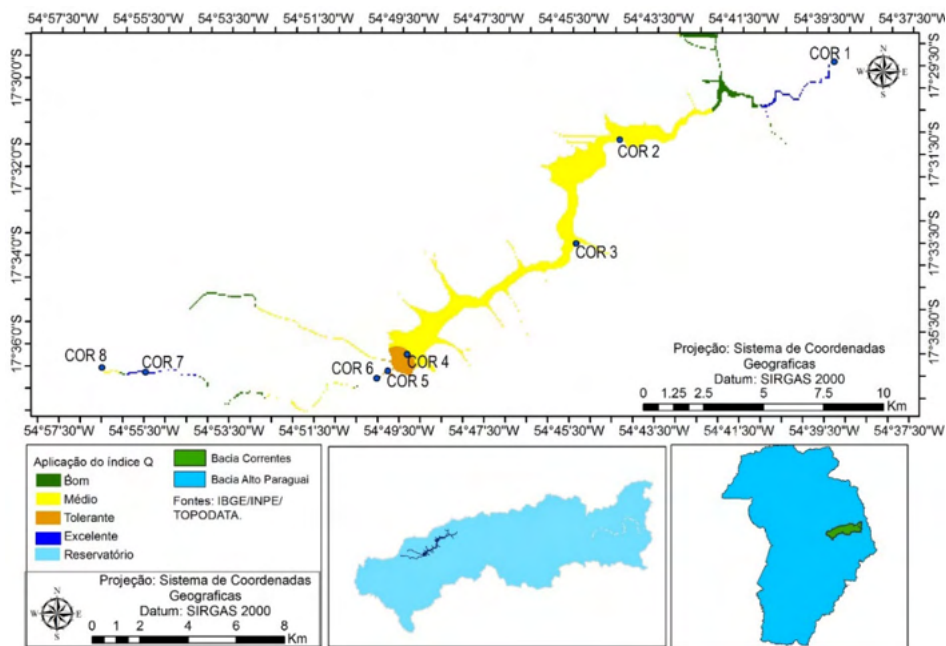


Figura 4 – Classificação do Índice Q por pontos de coleta do rio Correntes e no reservatório da usina Ponte de Pedra (2005-2011), destacando que o ano de início da operação ocorreu em 2005.

Estudos visando o monitoramento da qualidade da água têm utilizado fortemente o índice Q em diferentes regiões e ambientes aquáticos brasileiros, por não existir limitações geográficas, como Crossetti e Bicudo (2008) em reservatório tropical no estado de São

Paulo; Silva (2013) nos reservatórios Santa Cruz e Pau dos Ferros, na região nordeste brasileira; Mello (2012) no reservatório em Taperóa classificou as água entre ruim a excelente e Millan (2012) em águas do reservatório em Jaboticabal encontrou valores que classificaram entre médio a excelente.

Becker et al. (2009) estudando um reservatório mesoeutrófico no Rio Grande do Sul analisaram a dinâmica dos grupos funcionais e a aplicação do índice do estado ecológico (Q). Nesse caso, o índice ecológico foi eficaz em identificar o estado ecológico do reservatório, provando ser uma ferramenta promissora nos estudos em ecossistemas subtropicais e tropicais no controle da qualidade da água em reservatórios de hidrelétricas.

Em um panorama geral, os usos do solo na bacia do rio Correntes estão exercendo influência sobre a qualidade da água que variou entre tolerante a excelente, classificação esta definida pelo componente biológico dos grupos funcionais dominantes e pelos tipos de uso do solo praticados na bacia do rio Correntes. No entanto, os grupos funcionais dominantes descritores da qualidade da água foram similares e comuns nas distintas regiões e períodos analisados para o rio Correntes.

REFERÊNCIAS

AQUINO, C.A.; BUENO, N.C.; MENEZES, V.C. Desmidióflora (Zygnemaphyceae, Desmidiiales) do rio Cascavel, Oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v.41, n.3, p. 365-392, 2014.

AZEVEDO, A.D.S. A estrutura e a dinâmica interanual, dos grupos funcionais do fitoplâncton, no complexo lagunar do Jacaré Grande João Pessoa – PB. 2014. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Biologia) – Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

BARBOSA, L.G., BARBOSA, F.A.R.; BICUDO, C.E.M. Adaptive strategies of desmids in two tropical monomictic lakes in southeast Brazil: do morphometric differences promote life strategies selection. **Hydrobiologia**, v. 710, n. 1, p. 157-171, 2013.

BECKER, V.; CAPUTO, L.; ORDÓÑEZ, J.; MARCÉ, R.; ARMENGOL, J.; CROSSETTI, L. O.; HUSZAR, V. L. M. Driving factors of the phytoplankton functional groups in a deep Mediterranean reservoir. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3345-3354, 2010.

BECKER, V.; HUSZAR, V.L.M.; CROSSETTI, L.O. Responses of phytoplankton functional groups to the mixing regime in a deep subtropical reservoir. **Hydrobiologia**, v. 628, n.1, p 137-151, 2009.

BORGES, P. A. F.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L. C. Spatial and temporal variation of phytoplankton in two subtropical Brazilian reservoirs. **Hydrobiologia**, v. 607, n. 1, p. 63-74, 2008.

BRASIL, J.; HUSZAR, V.L. O papel dos traços funcionais ecologia do fitoplâncton continental. **Oecologia Australis**, n. 15, v. 4, p. 799-834, 2011.

COSTA, M.R.A. **O impacto da remoção de peixes sobre a dinâmica e estrutura dos grupos funcionais fitoplanctônicos em um lago raso tropical durante seca severa**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

CROSSETTI, L.O.; BICUDO, C.E.M. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. *Hydrobiologia*, n. 1, v. 614, p. 91-105, 2008.

CRUZ, I.F. **Efeitos da formação e operação de um reservatório de pequena regularização na alteração da qualidade da água e do regime hidrológico na planície de inundação do Pantanal**. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

DANTAS, E.W. **Ecologia da comunidade de algas planctônicas em reservatórios de Pernambuco (Nordeste, Brasil)**. (2010). 143 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

FANTIN-CRUZ, I. **Efeitos da formação e operação de um reservatório de pequena regularização da alteração da qualidade da água e do regime hidrológico na planície de inundação do Pantanal**. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto Hídrico e Saneamento Ambiental, Porto Alegre, 2012.

FIGUEIREDO, D.M.; FANTIN-CRUZ, I. Diretrizes para realização de estudos limnológicos em hidrelétricas nas fases de diagnóstico-prognóstico, construção e operação. In: Simpósio sobre Pequenas e Médias Centrais Hidrelétricas, 2012. **Anais VIII**, Porto Alegre: Comitê Brasileiro de Barragens. 2012.

GOULART, M.D.C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n.1, p. 1-9, 2003.

HILLEBRAND, H; DURSELEN, C.D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, v.35, n.2, p. 403-424, 1999.

Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. **Relatório de qualidade das águas superficiais do Estado do Mato Grosso do Sul - 2011**. Campo Grande, MS, IMASUL, 2013.

KOMARÉK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. 1996. Cyanoprokariota. 1. Chroococcales. In: Subwasserflora von Mitteleuropa.19. Gustav Fisher, Stuttgart.

LUND, J.W.G.; KIPLING, C.; LECREN, E. D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia** 11: 143-170.

MELLO, K.R.P.S. **Estratégias adaptativas do fitoplâncton e aplicação do índice de grupos funcionais: ferramentas para a conservação de ecossistemas rasos do semiárido brasileiro**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

MILLAN, R.N. **Variação da comunidade planctônica e fatores físico-químicos da água em dois sistemas de aquicultura**. 2012. 166f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2012.

MORETI, L.O.R.; MARTOS, L.; BOV-SOMPARI, V.M.; RODRIGUES, L.C. Spatial and temporal fluctuation of phytoplankton functional groups in a tropical reservoir. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 3, p. 359-366, 2013.

- PADISÁK J.; CROSSETTI L.O.; NASELLI-FLORES, L. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. **Hydrobiologia**, v. 62, n.1, p. 1-19, 2009.
- Padisák, J., Borics, G., Grigorszky, I. et al. Uso de Assembléias de Fitoplâncton para Monitorar o Status Ecológico de Lagos dentro da Diretiva-Quadro de Água: O Índice de Assembléias. *Hydrobiologia* 553, 1-14 (2006).
- PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, v.3, n. 1, p. 27–37, 2009.
- PEREIRA, B.G. **Comunidade fitoplanctônica da lagoa Mãe-Bá e barragem norte (ES):** variação espacial, temporal e grupos funcionais. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- REYNOLDS L.S.; HUSZAR V.; KRUK C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v.24, n.5, p. 417-428, 2002.
- REYNOLDS, C.S. (1999). **Phytoplankton Assemblages in Reservoirs. Theoretical Reservoir Ecology and its Applications**, p. 439-456, 1999.
- REYNOLDS, C.S. **Ecology of Phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University. 2006 p. 535.
- REYNOLDS, CS., 1984. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge Univ. Pres., 384 p.
- RIGOTTI, J.A.; POMPÊO, C.A.; Fonseca, A.L.O. Aplicações e análise comparativa de três protocolos de avaliação rápida para caracterização da paisagem fluvial. **Ambiente & Água**, v. 11, n. 1, 2016.
- ROUND, F.; CRAWFORD, R.; MANN, D. (1990). **The diatoms**, Cambridge University Press, Bristol.
- SALAS, H.; MARTINO, P. 1991. A simplified phosphorus trophic state model for warm-water tropical lakes. **Water Research**, 25: 341-350.
- SANTOS, T.R. **Variação sazonal da biomassa, do estado nutricional e da estrutura da comunidade de algas perifíticas desenvolvida sobre substrato artificial e *Utricularia foliosa* L.** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Planejamento da Ciência e Tecnologia (SEMACE). **Caderno geoambiental das regiões de planejamento do MS**, p. 392, 2011.
- SILVA, A.P.C. **Biomonitoramento da qualidade de água e percepção ambiental na bacia hidrográfica Apodi-Mossoró, RN.** 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente/PRODEMA) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2013.

SILVA, S.S.L. **Caracterização ecológica e estrutural de macrófitas em reservatórios no estado de Pernambuco**. 2011. F. Tese (Doutorado em Programa de Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

SOARES, M.C.S.; HUSZAR, V.L.M.; ROLAND, F. Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). **River Research and Applications**, v. 23, n. 1, p. 698-714, 2007.

SOUZA, A.P.; GOMES, L.N.L.; MINOTI, R.T. Avaliação da utilização de índices de integridade biótica do fitoplâncton como ferramenta para estimativa de qualidade da água nos Lagos Paranoá e descoberto, no DF. In: Simpósio brasileiro de Recursos hídricos, 2015, Brasília. **Anais XXI**. Distrito Federal, 2015.

SOUZA, M. B. G.; BARROS, C. F. A.; BARBOSA, F.; HAJNAL, É.; PADISÁK, J. Role of atelomixis in replacement of phytoplankton assemblages in Dom Helvécio Lake, South-East Brazil. **Hydrobiologia**, v. 607, n. 1, p. 211-224, 2008.

SUN, J; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of plankton research**, v.25, n.II, p. 1331-1346, 2003.

TORRES, L.M. **Efeito da seca na dinâmica dos grupos funcionais fitoplanctônicos em reservatórios eutróficos do semiárido**. 2014. 38f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2014.

TRAIN, S.; JATI, S.; RODRIGUES, L. C.; PIVATO, B. M. **Distribuição espacial e temporal do fitoplâncton em três reservatórios da bacia do rio Paraná**. In: RODRIGUES, L.; THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.). Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais. São Carlos: Rima, 2005. p. 73-85.

UEHLINGER, V., Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Arch. Sci**, 17 (2): p. 121 – 123. 1964.

UTERMOHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton – methodik. Mitt. Int. Verein. **Theor. Angew. Limnol.**, v. 9: p.1-38. 1958.

VAN DEN HOEK, C., MANN, D. G. & JAHNS, H. M., 1997. Algae na introduction to phycology. Cambridge. **Cambridge University Press**. NUMER DE PÁGINAS.

NOVO USO PARA O FILTRO EM PROFUNDIDADE CLARISOLVE® EM SUBSTITUIÇÃO À CENTRIFUGAÇÃO CLÁSSICA NA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO SELETIVA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 06/09/2021

Mirian Nakamura Gouvea

Instituto Butantan – Seção de Hepatite
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/9473657036859505>

Bruna de Almeida Rocha

Instituto Butantan – Seção de Hepatite
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/2127462305922065>

Alexandre Bimbo

Instituto Butantan – Seção de Hepatite
São Paulo – SP
currículo lates: [http://buscatextual.cnpq.br/
buscatextual/visualizacv.do](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do)

Juliana Roquetti dos Santos

Instituto Butantan – Seção de Hepatite
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/3478122626329834>

Elisabeth Christina Nunes Tenório

Instituto Butantan – Seção de Hepatite
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/0504611470798567>

Victor Gabriel Abramant de Sousa

Merck SA
São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/5626287313894633>

A vacina de hepatite B (recombinante) do Instituto Butantan é composta pela proteína recombinante de superfície do vírus, antígeno S (HBsAg). No processo de purificação das partículas semelhantes ao vírus (VLPs), o precipitado de proteínas da cepa hospedeira (HCPs) é atualmente removido por centrifugação contínua. Os filtros de profundidade Clarisolve® são apresentados como ferramentas eficientes para clarificar culturas celulares de alta densidade. Nós avaliamos os filtros Clarisolve® 20MS, 40MS e 60HX, comparando os filtrados com o controle centrifugado, a fim de verificar a viabilidade do seu uso como técnica alternativa na remoção de precipitados de proteínas. Os desempenhos foram similares e satisfatórios em termos do aumento de pressão ao longo do procedimento, bem como turbidez, OD_{280} , perfil eletroforético, conteúdo de proteínas total/específica e de DNA residual do filtrado. O filtro 40MS foi selecionado para um desafio de alto fluxo, compatível com as necessidades da escala industrial. Houve um incremento de pressão exponencial no final da corrida, embora estivesse bastante aquém do limite de pressão do filtro e sem impacto na qualidade do filtrado. Desta forma, 40MS foi considerado o candidato ideal para substituir a centrifugação na remoção de HCPs.

PALAVRAS-CHAVE: filtro de profundidade, precipitação seletiva de proteínas, clarificação.

RESUMO: A precipitação seletiva de proteínas é largamente utilizada na produção de biofármacos.

NOVEL USE FOR CLARISOLVE® DEPTH FILTERS SUBSTITUTING CLASSICAL CENTRIFUGATION IN PROTEIN PURIFICATION BY SELECTIVE PRECIPITATION

ABSTRACT: Selective protein precipitation is widely used in the production of biopharmaceuticals. Butantan Institute's hepatitis B vaccine is composed by the virus recombinant surface S-antigen (HBsAg). Continuous centrifugation is currently used to remove host cell proteins (HCPs) precipitates in the virus-like particles (VLPs) purification process. Clarisolve® depth filter is presented as an efficient tool to clarify high-density cell cultures. We evaluated 20MS, 40MS and 60HX Clarisolve® units against centrifugation (control) in order to verify its feasibility as an alternative technique to protein precipitates removal. They presented similar and satisfactory performance in terms of pressure along the procedure and also filtrate's turbidity, OD₂₈₀, total/specific protein, electrophoretic profile and DNA content. The 40MS media was selected for a high-flow challenge, compatible with industrial production demand. Resistance increased exponentially at the end, even though far from the limit pressure, with no impact on filtrate quality. Therefore, 40MS was considered the ideal candidate to replace HCP clearance by centrifugation.

KEYWORDS: depth filter, selective protein precipitation, clarification

1 | INTRODUÇÃO

Os processos de purificação de proteínas na produção de biofármacos incluem, em sua grande maioria, etapas de clarificação primária (separação de células e debris celulares) e secundária (remoção de macromoléculas, em etapas posteriores de purificação). A importância das etapas iniciais após a colheita e (se necessário) a desintegração das células, é a de preparar o produto intermediário para os passos subsequentes mais refinados e específicos de purificação da proteína alvo (LE MERDY, 2015). Classicamente a centrifugação tem sido a técnica padrão utilizada, seguida ou não por filtração. Cada vez mais, com o contínuo desenvolvimento de filtros mais eficientes, a clarificação por filtração tem sido como uma alternativa atraente (O'BRIEN *et al.*, 2012), por conta da facilidade de escalonamento e compatibilidade com processos de uso único (BESNARD *et al.*, 2016). Filtros em profundidade com variados desenhos de construção são boas opções para processar volumes vultosos e/ou altas densidades celulares. A disponibilidade de filtros de profundidade de uso único para processos em larga escala tem permitido aos desenvolvedores melhorar e simplificar os processos de *downstream* (O'BRIEN *et al.*, 2012). Novos filtros têm sido criados, associados a pré-tratamentos da suspensão de forma a flocular/agregar células, *debris* e impurezas associadas, possibilitando processos mais ágeis, flexíveis e escalonáveis (SINGH *et al.*, 2013).

Os filtros Clarisolve® (Merck Millipore) são construídos em multicamadas, de forma a conferir um gradiente de densidade projetado especificamente para distribuições de partículas de diferentes tamanhos (figura 1). Foram inicialmente concebidos para substituir centrífugas na clarificação primária de culturas de células pré-tratadas (floculação), particularmente na produção de anticorpos monoclonais (MERCK MILLIPORE, 2017),

resultando em um filtrado de baixa turbidez contendo a proteína de interesse.

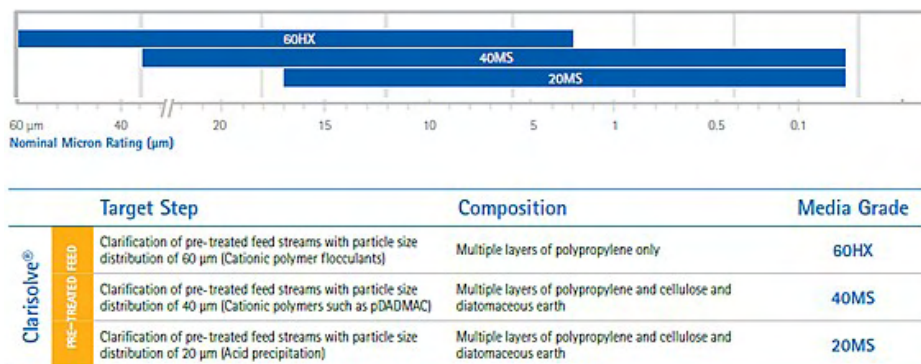


Figura 1. Filtros Clarisolve® (Merck Millipore). Faixas de porosidade, composição e aplicações. (Modificado de Merck Millipore, 2016)

A vacina adsorvida hepatite B (recombinante) produzida no Instituto Butantan é composta pelo antígeno S de superfície do vírus (HBsAg), expresso pela levedura transformada *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*). Após o processo fermentativo as células são colhidas, lavadas e rompidas. O processo de purificação inclui a precipitação seletiva de proteínas derivadas da célula hospedeira (HCPs), por redução de pH. Os precipitados são removidos por centrifugação em fluxo contínuo, conferindo uma redução pelo menos 80% das proteínas totais. Vislumbramos a possibilidade de substituir a centrífuga por filtro de profundidade nesta etapa. O objetivo deste trabalho foi avaliar os filtros Clarisolve® na remoção dos agregados de HCPs/ácidos nucleicos após a precipitação ácida.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material aplicado

Material da fase intermediária de purificação do HBsAg, após as etapas de desintegração celular, remoção dos *debris* por centrifugação, concentração e diafiltração do sobrenadante (CD). Antes das filtrações o pH foi reduzido sob baixa agitação, em banho de gelo, para promover a precipitação de HCPs e ácidos nucleicos, predominantemente.

O pH dos filtrados e do sobrenadante da centrifugação (padrão) foi neutralizado imediatamente após sua obtenção.

2.2 Filtração

Foram utilizados os filtros em profundidade Clarisolve® mPod (Merck Millipore), com 23 cm² de área, nas gramaturas disponíveis - 20MS, 40MS e 60HX (figura 1 e 2A). CD

(300 – 330 mL) foi aplicado em até três filtros simultaneamente, em linhas paralelas (figura 2B). A pressão dos sistemas foi continuamente monitorada e todo o filtrado foi fracionado (15 mL) para análises. Como controle, uma amostra de CD foi centrifugada (6.000 x g/35 min), para remoção dos precipitados e colheita do sobrenadante clarificado (PS). Os testes de dimensionamento dos filtros Clarisolve® seguiram as metodologias PMax™ e TMax™ (MERCK MILLIPORE, 2000).

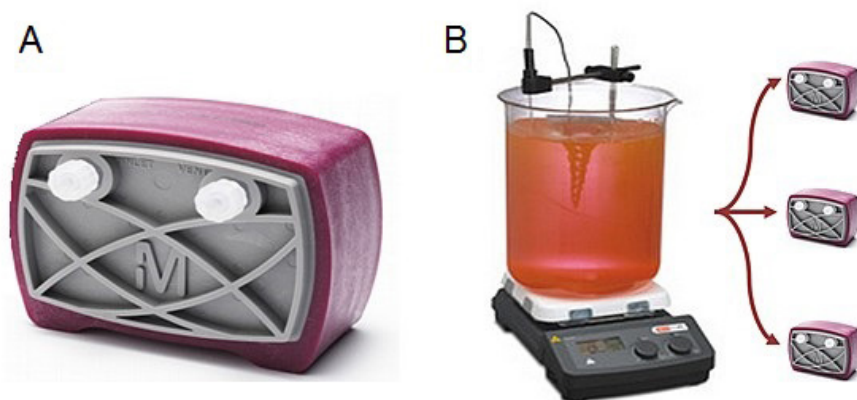


Figura 2. Unidade filtrante Clarisolve®: A) Clarisolve® mPod, 23 cm², 20MS, 40MS ou 60HX.

B) Esquema de aplicação de CD em até 3 unidades, simultaneamente, com monitoramento contínuo da pressão.

2.3 Análises

As frações (15 mL) e o *pool* de cada filtrado, assim como o controle centrifugado, foram analisados quanto a turbidez (medida indireta, DO₆₀₀), DO₂₈₀, conteúdo de proteínas totais (Pierce™ BCA Protein Assay Kit – ThermoFisher Scientific), titulação da proteína específica (PHA – *passive haemagglutination assay*, RCP Diagnostic Systems, cat. #B-431 - Rússia), perfil eletroforético (SDS-PAGE, 12% acrilamida - LAEMMLI, 1970) corado por prata (HEMPELMANN & KAMINSKY, 1986), padrão de HBsAg purificado (concentrado proteico da vacina adsorvida hepatite B do Instituto Butantan), padrão de peso molecular LMW eletroforese SDS, (Amersham, atual Cytiva) e conteúdo de DNA residual (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA assay kit – Invitrogen).

3 | RESULTADOS

3.1 Triagem

No primeiro teste comparamos os três modelos disponíveis dos filtros Clarisolve® - 20MS, 40MS e 60HX. As unidades foram montadas em paralelo, alimentadas pela mesma

bomba peristáltica (figura 2B) e 330 mL (130 mL/m²) de CD foram aplicados em cada uma delas, simultaneamente. O fluxo de alimentação foi de 45 L/m²h, próximo ao recomendado pelo fabricante. As características dos filtrados – turbidez, proteínas totais, específica e conteúdo de ácidos nucleicos - foram semelhantes entre si e também o controle centrifugado PS (tabela 1). De modo geral, durante a corrida os valores de turbidez e DO₂₈₀ foram mais altos nos primeiros 50 L/m² (frações iniciais), particularmente com o HX60, com estabilização em cerca de 10% daqueles do material inicial (figura 3A). Nos filtrados (*pool* das frações), bem como no controle centrifugado PS, houve uma perda de até 4 vezes do HBsAg. Em contrapartida, o conteúdo de proteínas totais caiu para menos de 20% e o de DNA residual para menos de 3% em relação ao material inicial.

Teste 1	CD #1	PS 1	20MS	40MS	60HX	
DO₂₈₀	40,15	4,76	4,40	5,22	4,68	
Turbidez (NTU)	979		214	176	218	
HBsAg (título)	<16000	4000	>4000	>4000	>4000	
BCA (mg/mL)	2390	447	487	479	450	
DNA (ng/mL)	76640	547	1726	1136	2018	
Testes 2&3	CD #2	PS 2	20MS	40MS	PS 3	40MS high flux
Turbidez (NTU)	900		96	87,9		83,2
DO₂₈₀	38,10	4,23	3,78	3,53	4,23	363
HBsAg (título)	32000	>4000	8000	>4000	>4000	>4000
BCA (mg/mL)	4150	458	503	476	578	466
DNA (ng/mL)	51040	315	1431	537		538

Tabela 1. Resultados das análises dos filtrados (*pools*) dos três testes, comparados ao controle centrifugado (PS) e o material inicial (CD). Proteínas totais (por BCA), específica (titulação do HBsAg por hemaglutinação passiva) e conteúdo de DNA residual. PS 1, 2 e 3 são os materiais centrifugados durante testes 1 a 3, respectivamente. NTU = (Unidade de Turbidez Nefelométrica).

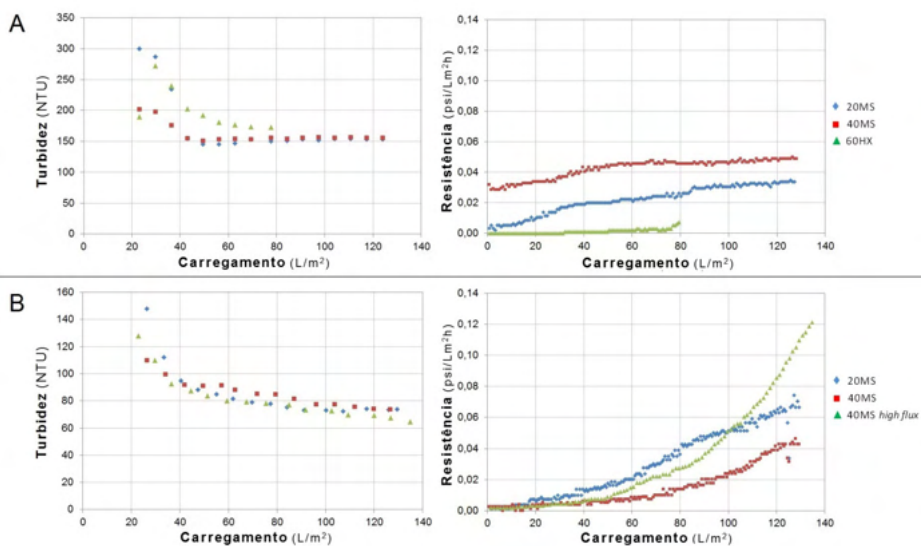


Figure 3. Desempenho dos filtros Clarisolve®: turbidez (frações) e pressão ao longo do processo de filtração. **A)** teste 1 (45 L/m²h); **B)** testes 2 (36 L/m² h) e 3 (83 L/m²h - *high flux*).

Durante parte da filtração com a unidade 20MS houve formação de espuma, sem comprometimento da corrida ou do produto resultante. Este fenômeno, por outro lado, foi mais intenso com o filtro 60HX, determinando a finalização precoce da filtração e, conseqüentemente, a eliminação deste modelo nos demais estudos. Observou-se também um leve aumento da pressão dos sistemas, mas sempre abaixo de 0,08 psi, valor este distante do limite máximo de 20 psi preconizado pelo fabricante. (figura 3A).

Os filtros 20MS e 40MS foram novamente comparados entre si num segundo teste, com um novo lote de CD. A partir deste teste foi decidido o aguardo de 30 minutos após a redução de pH, antes do início da filtração, realizada num fluxo de 36 L/m²h. Os desempenhos foram semelhantes aos observados na primeira triagem (figura 3B e tabela 1), com uma sutil vantagem do Clarisolve® 40MS no fluxo de filtração e na remoção de DNA residual. Não foram observadas diferenças relevantes no perfil eletroforético das frações/*pool* oriundos dos dois filtros (figura 4). As frações iniciais ainda apresentaram mais impurezas, mas sem impacto para a qualidade do filtrado total.

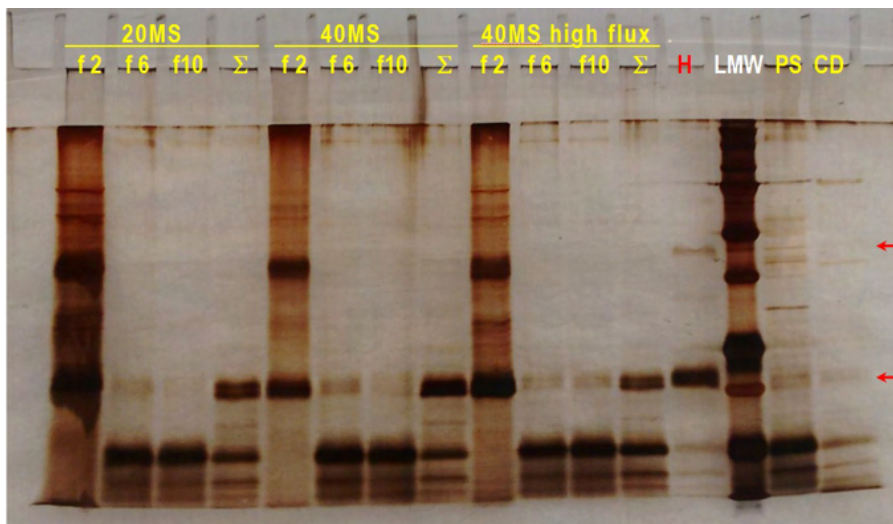


Figure 4. SDS-PAGE de amostras dos testes 2 e 3.

f=fração; S=pool de frações de cada filtrado; H= HBsAg purificado (setas indicam altura das bandas correspondentes aos monômero e dímero); LMW = padrão de peso molecular; PS = sobrenadante centrifugado (controle), CD = material inicial, antes da redução de pH.

3.2 Desafio

O mesmo lote de CD do segundo teste foi utilizado num terceiro teste, para desafiar o filtro Clarisolve® 40MS com incremento do fluxo de 83 L/m²h (figura 3B). Mesmo com o aumento exponencial da resistência no final da filtração, alcançando 12 psi/Lm²h, ainda restou uma grande margem em relação à pressão máxima preconizada pelo fabricante, de 20 psi/Lm²h. A figura 4 mostra o perfil eletroforético de uma fração inicial, intermediária e final dos testes 2 e 3, comparadas ao do material inicial e do controle centrifugado. As frações iniciais apresentam mais bandas, tanto as correspondentes aos monômeros e dímeros de HBsAg (pela comparação com o antígeno purificado, amostra H) quanto por algumas contaminantes. Já havia sido verificado em amostras do processo industrial, por *Western Blot*, que as bandas de baixo peso moléculas presentes em quase todas as amostras são de HBsAg degradado, não impactando na pureza do produto. A qualidade do filtrado (pool) no desafio foi mantida, semelhante aos filtrados em menor fluxo e ao padrão centrifugado PS (tabela 1, figura 4).

4 | DISCUSSÃO

Embora as etapas de clarificação sejam tecnologicamente mais simples, o estabelecimento cuidadoso de parâmetros impacta enormemente na qualidade do material resultante e, conseqüentemente, no desempenho das etapas posteriores de purificação. Por muitos anos a centrifugação tem sido a técnica padrão, seja na clarificação primária (remoção de células e *debris* celulares), seja na secundária, em etapas posteriores do *downstream*. Com

o desenvolvimento da tecnologia de construção dos sistemas filtrantes, associada à crescente tendência de dispositivos de uso único na indústria de biofármacos, a substituição da centrífuga por filtros tem sido cada vez mais presente. Além das vantagens no escalonamento, dispensa dos procedimentos de limpeza e, conseqüentemente, o da custosa validação de limpeza, há também a facilidade de sua implementação no processo produtivo (BESNARD *et al.*, 2016). Neste universo em expansão, os filtros em profundidade modernos despertam grande interesse, pela sua capacidade de processar volumes cada vez maiores, principalmente associados a pré-tratamento do material com agentes floculantes, com uma área filtrante relativamente pequena, se compararmos aos filtros de décadas atrás. Encontramos muitos exemplos do seu uso nas etapas de colheita e na clarificação após rompimento celular. Neste trabalho verificamos se esse tipo de filtro poderia também ser usado na separação de proteínas precipitadas de uma suspensão, uso esse ainda limitado nos bioprocessos. Os filtros Clarisolve® (Merck Millipore) foram concebidos para separação de células em culturas de alta densidade, para obtenção do meio contendo anticorpos monoclonais (MERCK MILLIPORE, 2017). Por seu tipo de estrutura, mostraram-se bons candidatos a esse estudo, devido à faixa de tamanho de poros ser aparentemente compatível com nosso material.

Durante a redução do pH é importante que o material seja mantido em temperatura baixa, inferior a 12 °C. A agitação constante é necessária durante a adição do ácido, para que não haja pontos de extremos de pH, mas deve ser apenas o suficiente para homogeneizar a suspensão. O princípio deste método é o de que, quando o pH atinge o valor do seu pI, a somatória de cargas (resíduos positivos x negativos) de cada proteína equilibrada e, portanto, neutra. Isto permite que as moléculas se aproximem umas das outras, pela diminuição da repulsão elétrica, e precipitem. Uma agitação mais vigorosa pode prejudicar essa interação molecular.

Num primeiro teste comparamos os três modelos à disposição, simultaneamente, como o mesmo material e a mesma alimentação do sistema. Houve uma perda importante do HBsAg, mas não diferente da resultante da clarificação por centrifugação. Em contrapartida, o conteúdo de proteínas totais foi reduzido em mais de 80%, uma importante taxa de purificação já no início do *downstream*. A remoção de DNA residual também foi bastante relevante: embora a concentração fosse de 2 a 4 vezes maior nos filtrados em relação ao controle centrifugado, mesmo assim representou mais de 97% de redução. Apesar da clarificação nesta etapa objetivar a remoção das HCPs, não é inesperado o grande efeito carreador de ácidos nucleicos resultante.

O alvo de uma clarificação primária é a obtenção de um filtrado límpido, como a menor turbidez possível. No nosso caso é importante que seja mantida uma porcentagem para que não ocorra perda do HBsAg nas etapas subsequentes de purificação. Os valores de turbidez, DO₂₈₀ e conteúdo proteico foram semelhantes aos do controle centrifugado, como era desejado.

Nesta primeira triagem o filtro 60HX foi descartado, já que houve formação de espuma durante quase toda a corrida, impedindo a finalização da filtração. Apesar deste ocorrido ter sido inicialmente inesperado, por ser o modelo de maior porosidade, é bastante plausível que as camadas intercalantes de celulose e terra diatomácea (ausentes apenas

no 60HX) contribuam significativamente na capacidade dos outros modelos. A filtração com o 20MS também apresentou formação de espuma por um tempo, mas sem impacto para o processo nem para o produto, aparentemente.

Os filtros 20MS e 40Ms foram então novamente comparados, com um outro lote de CD. Como as frações iniciais dos filtrados do primeiro teste haviam apresentado grau de impurezas considerável, decidimos aguardar 30 minutos após a redução do pH, para tornar mais eficiente a formação dos precipitados. O desempenho dos filtros neste segundo teste foi semelhante ao do primeiro – as pequenas diferenças podem estar associadas a:

1. Concentração proteica inicial – a variação de DO_{280} do material inicial pode influenciar na porcentagem de precipitação das HCPs, exigindo em casos mais extremos uma maior redução do pH;
2. Tamanho dos agregados – é bem possível que a espera de 30 min após a redução do pH, antes da filtração, tenha resultado em partículas um pouco maiores, o que pode ter permitido a retenção de proteínas de forma diversa em relação ao primeiro teste. A tabela 1 e a figura 4 mostram que a turbidez do *pool* de filtrados e das frações, respectivamente, foi praticamente a metade no segundo teste em relação ao primeiro, para os mesmos modelos de filtro, mesmo a pressão durante a filtração foi semelhante nos dois testes com o modelo 40MS, já para o 20MS ela praticamente dobrou. Uma explicação é a de os poros maiores do filtro 40MS permitiram uma distribuição mais uniforme por todo o corpo filtrante, enquanto o 20MS pode ter sofrido uma saturação precoce das primeiras camadas;
3. Poderíamos supor que a pequena diferença de fluxo entre o primeiro e segundo teste (45 L/m²h e 36 L/m²h). Mas frente à semelhança de desempenho num fluxo duas vezes maior, essa suposição é improvável.

A maior concentração de impurezas nas primeiras frações não chegou a impactar na qualidade do filtrado total (figura 4). As HCPs remanescentes no material após a clarificação (filtrado ou centrifugado) são provavelmente ácidas – permaneceram solubilizadas pelo fato do pH não ter sido reduzido o suficiente para se igualar ao pI das mesmas. A amostra de CD (material inicial) aplicada no gel de eletroforese foi bastante diluída para melhor visualização das bandas de interesse, o que pode dar a falsa impressão de que está muito pura – sem essa diluição não seria possível distinguir as proteínas entre si.

O modelo 40MS foi eleito para ser desafiado com um fluxo maior de alimentação, de forma que o tempo total de processo fosse compatível com a realidade na produção industrial. Não houve impacto na qualidade do produto obtido (tabela 1, amostra 40MS *high flux*). No final da filtração a pressão subiu de forma mais incisiva em relação ao teste anterior, se mantendo mesmo assim bem aquém do limite recomendado pelo fabricante. Isso significa que, provavelmente, um volume extra poderia ter sido processado antes da saturação do filtro. Seria necessário conferir se a qualidade do filtrado seria mantida, mas a probabilidade é alta já que os resultados preliminares mostram que, em todos os cenários, a qualidade do filtrado permanece constante após um carregamento de 50 L/m²h.

Embora a remoção do conteúdo de DNA (da cepa produtora) residual não seja o propósito principal desta etapa de purificação, há um claro efeito carreador (tabela 1), para o qual o filtro 40MS se mostrou mais eficiente. Houve uma redução de mais de 97%, efeito este importante já que para reprovação do concentrado proteico (o produto final da purificação) bastam 100 pg DNA no equivalente a 1 dose de vacina.

VENKITESHWARAN *et al.* (2015) discutem que os filtros de profundidade comumente possuem celulose e terra diatomácea em sua estrutura, como é o caso dos Clarisolve® 20MS e 40MS. A estrutura fibrosa desses filtros é mantida por ligantes de resina polimérica positivamente carregadas. Os mesmos mecanismos de captura mecânica e adsorção por interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas podem reter parte das partículas virais, embora esse comportamento possa variar conforme o vírus e o filtro. Considerando a significativa perda do HBsAg observada no processo de clarificação, é possível que parte esteja retida por esses fenômenos, somando-se ao efeito carreador da precipitação em si, já que o controle centrifugado também sofre esta perda.

A empresa fornecedora dos filtros Clarisolve® participou da condução destes estudos. Foi possível determinar a área filtrante de 2,75 m² como suficiente para realizar a clarificação de 200 L de CD, no mesmo tempo gasto para a centrifugação, incluindo a limpeza do equipamento – etapa inexistente no uso dos filtros, pelo fato de serem descartáveis. Os testes de dimensionamento dos filtros Clarisolve® seguiram as metodologias PMax™ e TMax™, onde o objetivo do ensaio visa encontrar pontos máximos de contrapressão e turbidez máxima, respectivamente. Essa metodologia auxilia nas etapas de escalonamento do processo, pois o comportamento real da filtração em um dado fluxo constante é realizado seguindo o esperado para a etapa de processo. A técnica de PMax™ é comumente utilizada para dimensionamento de filtros de profundidade e a escolha do fluxo de alimentação adequado interfere nos mecanismos de retenção dos filtros. Por se tratar de filtros que possuem carga positiva, oriunda das resinas ligantes das matrizes dos filtros, o filtro retém partículas indesejadas por exclusão por tamanho e adsorção de partículas carregadas negativamente, melhorando a performance dos filtros. O ensaio TMax™ visa encontrar a curva de ruptura de turbidez, medida em NTU, onde o valor limite está vinculado a turbidez inicial da amostra antes da filtração. A medida de turbidez é um dos indicadores de qualidade e, sendo medido ao longo do ensaio, apresenta uma curva de capacidade (L/m²) dos filtros.

Os gráficos apresentados usam referências de carregamento ou capacidade (L/m²) e resistência (psi/L/m².h). Esses valores são importantes de serem representados para o monitoramento e a manutenção de escalas e comparativos futuros, como os realizados no estudo, com fluxos mais altos. Um filtro pode apresentar resistências distintas relativas a fluxos diferentes, dado o fato de que os mecanismos de saturação e, conseqüentemente, qualidade do filtrado tem relação direta com o fluxo de alimentação e tempo de residência das partículas na profundidade dos filtros.

Além da vantagem de não requerer uma etapa de limpeza e sanitização de equipamento,

principalmente para fábricas ainda em planejamento, ainda temos o tamanho mais reduzido, a flexibilidade e a manutenção do sistema de filtração - suporte com os cassetes e bomba de alimentação – em relação a uma centrífuga industrial

A precipitação seletiva de proteínas na indústria de biofármacos é também obtida com adição de sais (ex. sulfato de amônio), em concentrações bem definidas, de acordo com as características da proteína alvo e das HCPs. É bastante plausível que os filtros em profundidade possam também substituir as centrífugas no processo de clarificação neste caso.

5 | CONCLUSÕES

Por ser um processo relativamente barato e com capacidade de processar grandes volumes de material, as técnicas de clarificação são muito empregadas no início do processo de purificação. A sua qualidade tem impacto importante no desempenho das demais etapas do processo.

Os filtros Clarisolve® se mostraram compatíveis com a demanda de processo da etapa de clarificação pós precipitação ácida, na produção da vacina de hepatite B (recombinante) do Instituto Butantan, tendo o modelo 40MS sido eleito como a melhor escolha para substituir a centrifugação. Mais estudos para o refino dos parâmetros do processo de filtração, incluindo um eventual ajuste na força iônica do material inicial, bem como um estudo de arraste de material retido nos filtros com tampões, podem reduzir a perda do HBsAg, principal revés desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: Fundação Butantan. Fornecimento dos filtros e execução das corridas pela Merck Millipore.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Da parte dos autores, declara-se que não há conflito de interesse influente no resultado da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BESNARD, L. *et al.* Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends. **BiotechAdv**, France, v. 34, p. 1-13, dec. 2015.

LE MERDY, SARAH. Selection of Clarification Methods for Improved Downstream Performance and Economics. **BioProcessing Journal**, Germany, v. 14, p. 50-55, oct. 2015.

O'BRIEN, T. P. *et al.* Large-Scale, Single-Use Depth Filtration Systems. **BioProcess International**, v. 10, n. 5, p. 50-57, may. 2012.

ROUSH, D. J.; LU, Y. Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology. **Biotechnol.** California, v. 24, n. 3, p. 488-495, apr. 2008.

VENKITESHWARAN, A. *et al.* Mechanistic Evaluation of Virus Clearance by Depth Filtration. **Biotechnol. Prog.**, Indiana, v. 31, n. 31, mar. 2015.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, Cambridge, vol. 227, p. 680-685, aug. 1970.

HEMPELMANN E.; KAMINSKY R. Long term stability of colors after silver staining. *Electrophoresis*, Germany, v. 7, p. 481, may 1986.

SINGH, N., PIZZELLI, K., ROMERO, J., CHROSTOWSKI, J., EVANGELIST, G. HAMZIK, J., SOICE, N., CHENG, K.S. Clarification of recombinant proteins from high cell density mammalian cell culture systems using new improved depth filters. **Biotechnol. Bioeng.** v. 110 (7), p. 1964–72. jul. 2013.

MERCK MILLIPORE. Clarification Solutions for Pre-treated Feed Streams. Data Sheet. Germany: [DS5221EN00 Ver. 9.0. 2017-06224.], out. 2017.

MERCK MILLIPORE. Single-use and multi-use products for the successful development and implementation of robust clarification processes. Clarification Portfolio Guide, United States: [PB1241EN00 Ver. 1.0], june 2016.

MERCK MILLIPORE. Filter Sizing Methods: for normal flow filtration (NFF) applications. **Application Note.** United States: [AN1512EN00 rev – 3/00], 2000.

VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS: TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA FARINHEIRA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 06/09/2021

Ágata Silva Cabral

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-7215-9331>

Mariane Daniella da Silva

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-2900-9741>

Crispin Humberto Garcia-Cruz

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0003-2482-0639>

RESUMO: O Brasil se destaca como um dos maiores produtores agrícolas mundiais, consequentemente, gera grandes quantidades de resíduos como, por exemplo, as cascas, entrecasas e pontas de mandioca na indústria farinheira. Os resíduos de mandioca apresentam abundância em glicose que pode ser utilizada como fonte de carbono por micro-organismos

na produção de etanol. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura e agitação na fermentação alcoólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 utilizando resíduos de mandioca da indústria farinheira como substrato. Para isso, as fermentações foram realizadas durante 12 horas nas temperaturas de incubação de 25, 30, 35 e 40 °C e agitação de 150 rpm ou em estado estacionário (0 rpm). A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa. A máxima produção de etanol obtida foi de 10,46 g.L⁻¹ na temperatura de 35 °C em 10 horas de fermentação em estado estacionário e a produtividade foi de 1,04 g.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados mostraram que as melhores condições para a produção de etanol foram temperatura de 35°C e meio mantido sem agitação. Além disso, também foi observado que a agitação teve o efeito de estimular o crescimento dessa levedura.

PALAVRAS-CHAVE: Etanol de Segunda Geração; Levedura; Fermentação; Resíduos de mandioca.

VARIATION OF FERMENTATIVE PARAMETERS: TEMPERATURE AND AGITATION IN THE PRODUCTION OF CELLULOSIC ETHANOL USING RESIDUES FROM THE FLOUR INDUSTRY

ABSTRACT: Brazil stands out as one of the largest agricultural producers in the world, consequently, it generates large amounts of agro-industrial residues, such as cassava husks in the flour industry. Cassava residues are abundant in glucose that can be used as a carbon

source by microorganisms in the generation of ethanol. The objective of this work was to evaluate the influence of temperature and agitation on the alcoholic fermentation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 using cassava residues from the flour industry as substrate. For this, fermentations were carried out for 12 hours at incubation temperatures of 25, 30, 35 and 40 °C and stirring of 150 rpm or in steady state (0 rpm). Ethanol concentration was determined by gas chromatography. The maximum ethanol production obtained was 10.46 g.L⁻¹ at temperature of 35 °C in 10 hours of fermentation in steady state and the productivity was 1.04 g.L⁻¹.h⁻¹. The results showed that the best conditions for ethanol production were temperature of 35 °C and medium kept without agitation. Furthermore, it was also observed that agitation had the effect of stimulating the growth of this yeast.

KEYWORDS: Second generation ethanol; Yeast; Fermentation; Cassava waste.

1 | INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por energia é resultante do acelerado desenvolvimento populacional e econômico, o que leva ao consumo de grandes quantidades de combustíveis fósseis. A combustão incompleta apresentada por estas fontes gera um impacto negativo no clima global devido à liberação de gases que contribuem para o efeito estufa e a poluição do meio ambiente (Ruiz; Martínez; Vermerris, 2016).

Diante disso, há a necessidade de implantar alternativas renováveis de energia em larga escala para minimizar os danos causados pelos combustíveis fósseis. Uma alternativa é o uso de culturas agroenergéticas e resíduos vegetais na produção de biocombustíveis e cogeração de energia. Essas matérias-primas são promissoras, sustentáveis e de baixo custo denominadas de biomassa (Schmatz et al., 2021).

O uso da biomassa na geração de energia renovável pode evitar a competição pela área agricultável com alimentos, estabilizar o preço do etanol frente à gasolina e diminuir os impactos ambientais (Bharathiraja et al., 2017). Porém, é necessário que o material lignocelulósico e aqueles que apresentam grande quantidade de amido sejam submetidos a um tratamento físico, químico, biológico ou a combinação destes para a liberação dos açúcares fermentescíveis que possam ser utilizados pelos micro-organismos produtores de etanol (Alvira et al., 2010).

Os resíduos de mandioca são gerados durante o processamento da matéria-prima durante a produção da farinha gerando, em média 0,47 t/t de mandioca processada, e são constituídos por 25% de celulose, 7% de hemicelulose, 5% de proteína bruta, 60% de amido residual proveniente da polpa, 20% de fibras e 3% de lignina (Moshi et al., 2015). Indústrias do processamento de mandioca enfrentam problemas devido à exposição dos resíduos ao ar livre sem um descarte apropriado e pelo tempo excessivo que levam para se decompor. Pois, geralmente estes materiais são eliminados diretamente no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento, conduzindo a problemas de poluição ambiental. Entretanto, os resíduos gerados podem ser utilizados para a produção de etanol de segunda geração (Cereda; Vilpoux, 2003).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 tem-se mostrado muito eficiente na produção de etanol utilizando resíduos da indústria de papel, lamas primárias ricas em celulose, que foram bioconvertidos em bioetanol de segunda geração (Mendes et al., 2016).

A partir disso, o objetivo deste trabalho foi contribuir no desenvolvimento de uma tecnologia integrada e diversificada para produção de combustíveis utilizando materiais alternativos que poderão despertar o interesse do mercado industrial. Além disso, usar fontes de energias renováveis e promover a diminuição da geração de resíduos e emissões de gases nocivos ao meio ambiente. Portanto, neste processo foi realizada a hidrólise ácida de resíduos de mandioca visando à liberação de açúcares fermentescíveis para serem usados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 na produção de etanol de segunda geração (2G).

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os resíduos de mandioca (cascas, entrecascas e pontas) foram fornecidos pela indústria produtora de farinha Moreá Alimentos Ltda., localizada no município de Monte Alegre de Minas – MG. Estes foram lavados e secos ao sol durante 48 horas. Em seguida, triturados em moedor elétrico adaptado para aumentar a superfície de contato, e por fim armazenados em recipientes plásticos. O tamanho de partícula foi homogeneizado em ≤ 0,64 mm utilizando um tamizador da marca Produtest.

A hidrólise dos resíduos de mandioca ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL com ácido sulfúrico (H_2SO_4) na concentração de 2,0%, submetidos a aquecimento em autoclave a 121 °C/1.1 atm durante 10 minutos.

Ao final de cada hidrólise o pH dos meios hidrolisados foi neutralizado em 6,5 com o uso de hidróxido de sódio (NaOH) 50% (m/m). Após, foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção dos resíduos (torta remanescente). Todos os filtrados foram armazenados em frascos com tampa abaixo de 0 °C para posteriores análises. O filtrado obtido identificado como hidrolisado ácido bruto (HB) dos resíduos de mandioca.

Antes de realizar os ensaios fermentativos com os substratos, foram determinados os teores de açúcares redutores pelo método do cuproarsenato (Nelson, 1944) and (Somogyi, 1952). Além disso, os teores de compostos fenólicos foram analisados por Folin-Ciocalteu modificado por Chaovanalikit; Wrolstad (2004).

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. O meio utilizado para o armazenamento da levedura foi composto por (g.L⁻¹): extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona de carne, 5; glicose, 10; e ágar, 20. Armazenadas em temperatura de 4°C.

O inóculo para o desenvolvimento da levedura foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de um meio de enriquecimento com os mesmos

constituintes que o meio de manutenção, exceto pelo uso de ágar, obtendo-se, um caldo de cultivo em pH 5,0, onde, a levedura previamente cultivada no meio de manutenção foi adicionada para o seu desenvolvimento em uma pré-fermentação incubada a 30°C durante 24 h sob agitação de 100 rpm. O inóculo foi padronizado por espectrofotometria em absorbância 0,6 com comprimento de onda em 600 nm.

A produção de etanol foi realizada em meio basal (pH 7) composto por extrato de levedura (5 g.L⁻¹); KH₂PO₄ (1 g.L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (1 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1 g.L⁻¹) e a fonte de carbono: hidrolisado bruto (HB) e um meio sintético acrescido de glicose (MS).

As condições aplicadas para a avaliação do crescimento e produção da levedura foram: temperatura de 25, 30, 35 e 40 °C; concentração inicial de substrato de 25 g.L⁻¹; agitação de 0 e 150 rpm e pH 6,5, durante 12 h de fermentação de acordo com padronização realizada em experimentos anteriores.

O pH das amostras foi determinado utilizando um pH meter Digimid modelo DM20. A concentração celular foi determinada por turbidimetria utilizando-se um espectrofotômetro Biochrom modelo Libra S22. O Etanol foi determinado por cromatografia gasosa utilizando um Thermo Scientific modelo Focus com detector de chama ionizada (FID) e HP-FFAP coluna (25 m x 0.2 mm x 0.3 μm); temperatura do forno a 70 °C; 5 min. de corrida; temperatura do injetor de 230 °C. A produtividade foi determinada por meio do cálculo da massa inicial e final sobre o tempo total de fermentação.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hidrolisado ácido dos resíduos de mandioca apresentou a liberação de 131,09 g.L⁻¹ de açúcares redutores (AR) ao se utilizar a condição de 10 min. de aquecimento em autoclave com o uso de 2,0% (v/v) de H₂SO₄.

O uso de baixas concentrações de ácido é recomendado durante o processo de hidrólise, pois, concentrações menores reduzem o risco de corrosão nos fermentadores e ainda, reduzem os custos pela menor quantidade de reagente utilizado. Além disso, ao se usar temperaturas mais baixas os custos com a energia são reduzidos, tornando o processo mais acessível em relação ao custo benefício (Tomás-Pejó et al., 2011).

Outro fator analisado na escolha da concentração de ácido a ser utilizado na hidrólise é a formação de compostos inibidores, pois, ao se utilizar concentrações mais baixas de ácido há a menor liberação de compostos tóxicos a partir da degradação da lignina e dos açúcares provenientes da hemicelulose. A concentração desses compostos no meio de fermentação pode ser prejudicial para o desenvolvimento celular dos micro-organismos e consequentemente, serão inibidores da produção de etanol 2G (Alvira et al., 2010).

Na concentração utilizada de 2,0% de H₂SO₄ durante 10 min. de aquecimento foram obtidos 0,35 g.g⁻¹ em ácido vanílico no hidrolisado bruto (HB).

A partir destes resultados foi realizada a fermentação do hidrolisado bruto (HB) e do

meio sintético (MS) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. Os parâmetros avaliados foram temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C e agitações de 0 e 150 rpm. O pH inicial dos meios foram de 6,5. Tempo total de fermentação de 12 horas e a concentração inicial de açúcares redutores dos meios foram de 25 g.L⁻¹. O inóculo inicial de cada fermentação foi de 0,18 g para todos os parâmetros testados.

Os resultados obtidos na fermentação estão apresentados na Figura 1 para os meios contendo o HB e o MS, ambos mantidos em estado estacionário (0 rpm) à 25 °C.

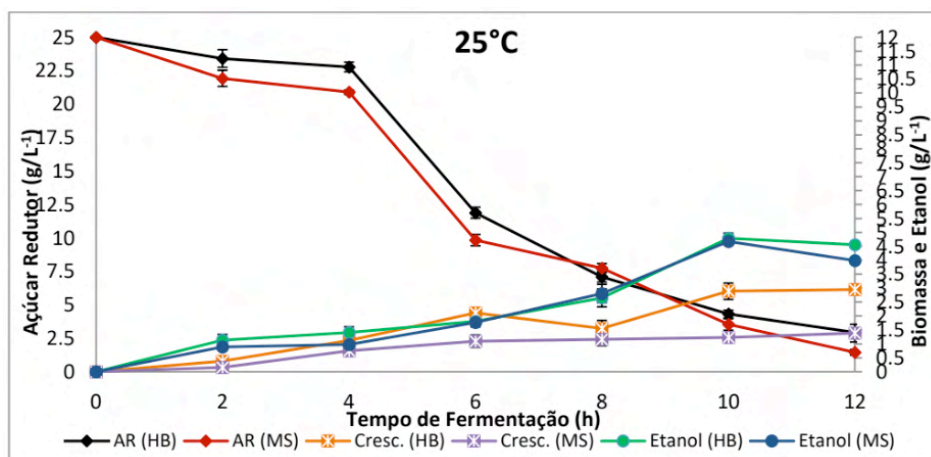


Figura 1 – Perfil da produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio HB e MS em concentração inicial de AR de 25 g.L⁻¹ e frascos mantidos sem agitação (0 rpm) à 25 °C.

Na Figura 1, pode se observar que conforme transcorrido o tempo de incubação da levedura, ocorreu um incremento na biomassa tanto para o meio sintético (MS) quanto para o meio contendo hidrolisado bruto (HB) nos parâmetros testados. O meio HB apresentou maior desenvolvimento celular quando comparado ao meio sintético, em 6 h de fermentação foram determinados 1,77 g.L⁻¹ de células da levedura no HB. Em 12 h de fermentação essa concentração foi de 2,94 g.L⁻¹ de células no HB. Já no MS em 12 h a concentração celular foi de 1,38 g.L⁻¹ de células.

O teor inicial de açúcares (25 g.L⁻¹) ao fim da fermentação caiu para 2,93 g.L⁻¹ no HB e 1,45 g.L⁻¹ no MS (em 12 h), mostrando que houve bom aproveitamento da levedura pelos açúcares presentes nos meios. Esse açúcar foi convertido em 4,79 g.L⁻¹ de etanol no meio HB em 10 h de fermentação e 4,67 g.L⁻¹ de etanol no MS, também em 10 h de fermentação.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados obtidos na fermentação em estado estacionário (0 rpm) à 30 °C para os meios contendo o HB e o MS. Onde, o meio HB apresentou maior desenvolvimento celular quando comparado ao meio sintético e também apresentou maior produção de etanol do que o MS. O maior crescimento foi em 10 h para

o HB, com 2,79 g.L⁻¹ de células da levedura. Em 12 h de fermentação a concentração de células no MS foi de 2,10 g.L⁻¹ de células.

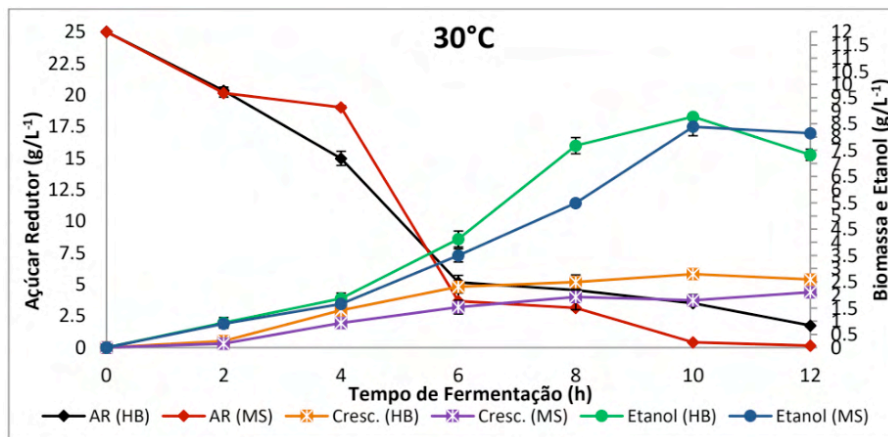


Figura 2 – Produção de bioetanol, crescimento celular (biomassa) e consumo de açúcares fermentescíveis por *S. cerevisiae* no meio HB e MS em concentração inicial de AR de 25 g.L⁻¹ e frascos mantidos sem agitação (0 rpm) à 30 °C.

O teor inicial de 25 g.L⁻¹ ao fim da fermentação, 12 horas, estava em 1,74 g.L⁻¹ para o HB e 0,15 g.L⁻¹ para o MS (Figura 2).

Por meio da Figura 2 é possível observar que houve um grande aproveitamento dos AR pelos dois meios. O rendimento foi de 8,77 g.L⁻¹ de etanol em 10 h de fermentação e 8,39 g.L⁻¹ de etanol no MS, também em 10 h.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos na fermentação para os meios contendo o HB e o MS ainda em estado estacionário (0 rpm), porém em 35 °C. Nesta, o maior crescimento célula foi no meio HB, sendo de 3,11 g.L⁻¹ na temperatura de 35 °C em 12 h de fermentação. O maior desenvolvimento da levedura quando comparado com as outras fermentações realizadas nas outras temperaturas.

Em 35 °C também foram obtidos os valores máximos de etanol quando comparado com as outras temperaturas. Os teores alcançados de foram de 10,46 g.L⁻¹ para o HB e 9,97 g.L⁻¹ para o MS em 10 horas de fermentação (Figura 3).

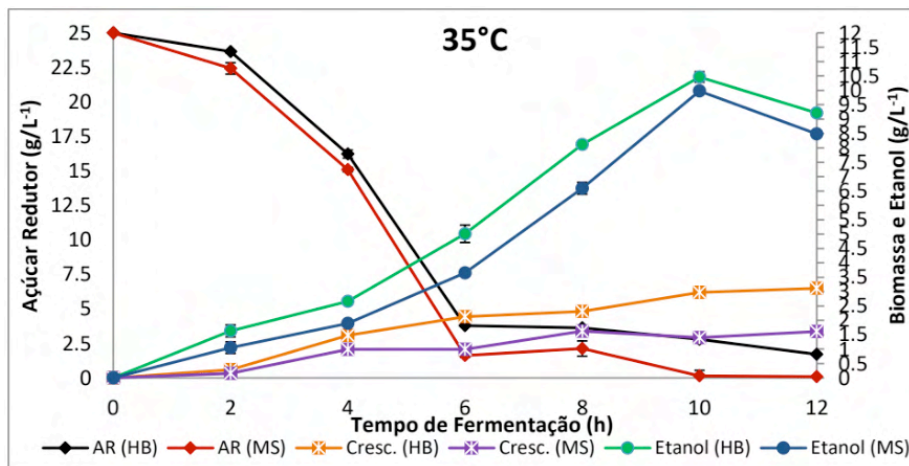


Figura 3 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares por *S. cerevisiae* ATCC 26602 no meio HB e MS em concentração inicial de AR de 25 g.L⁻¹ e frascos mantidos sem agitação (0 rpm) a 35 °C.

Nesta Figura 3 observa-se que houve um rápido decréscimo dos açúcares presentes nos meios de cultura durante as primeiras 6 h de fermentação e, este foi mais acentuado em 35°C. Esta temperatura ofereceu as melhores condições para assimilação destes açúcares fermentescíveis pela levedura, o que foi confirmado pelo rápido aumento, inversamente proporcional, dos níveis de etanol produzidos no HB e MS. Em outras palavras, a 35°C houve consumo dos açúcares contidos nos meios de cultura mais rápido e eficiente, pois, os açúcares residuais ao fim da fermentação foram de 1,70 g.L⁻¹ no HB e 0,09 g.L⁻¹ no MS e concomitantemente houve a maior produção de etanol.

Adicionalmente, verificou-se, que após 10 horas de fermentação a fonte de glicose já se encontrava praticamente esgotada em ambos meios fermentativos, conseqüentemente, a escassez desta fonte de seis carbonos levou à levedura a utilizar o próprio produto do metabolismo secundário, o etanol, ocasionando um decréscimo nos níveis de etanol para o tempo de 12 horas, como pode ser visto ao final da fermentação (Figura 3). Esse fenômeno já foi observado por outros pesquisadores e é conhecido como crescimento diauxico (Lavová, et al., 2014). Baixas concentrações de substrato para a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foram mais eficientes, já que o uso da fonte de carbono para a formação de subprodutos, glicerol, por exemplo, é menor e há uma melhora da eficiência de conversão desses açúcares em etanol (produto final) e menor quantidade de açúcar residual.

Os resultados avaliados na fermentação a 40 °C para os meios contendo o HB e o MS estão apresentados na Figura 4, ambos ainda mantidos em estado estacionário (0 rpm).

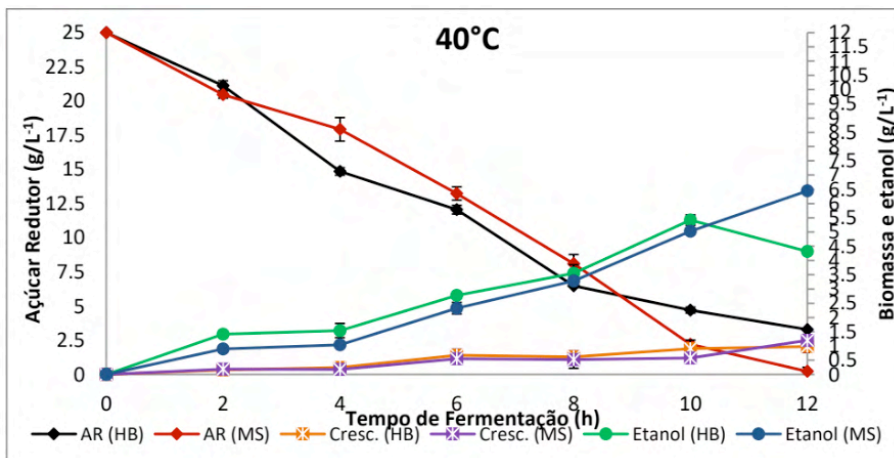


Figura 4 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares pela levedura no meio HB e MS com AR de 25 g.L⁻¹ e frascos mantidos sem agitação (0 rpm) à 40 °C.

Nesta temperatura de 40 °C foram verificados os menores valores do desenvolvimento da levedura (0,98 g.L⁻¹ para o HB e 1,19 g.L⁻¹ para o MS em 12 h da fermentação), contudo, a levedura apresentou boa produção do etanol, sendo, 5,42 g.L⁻¹ para o HB em 10 h e 6,44 g.L⁻¹ para o MS na 12 h da fermentação, indicando que a levedura priorizou a produção deste produto secundário ao invés do seu desenvolvimento (Figura 4).

Dos 25 g.L⁻¹ iniciais de AR que foram ligeiramente aproveitados pela levedura, ao final da fermentação restaram 3,28 g.L⁻¹ no meio HB e apenas 0,22 g.L⁻¹ no meio sintético. O MS apresentou o melhor consumo dos açúcares pela levedura e simultaneamente a maior produção do bioetanol (6,44 g.L⁻¹).

Os próximos resultados (Figuras 5 a 8) relacionam o tempo de fermentação, utilização dos açúcares presentes no meio, crescimento celular e produção de etanol para os experimentos realizados com a mesma concentração inicial de AR descrita anteriormente (25 g.L⁻¹), entretanto, sob agitação de 150 rpm.

Nestes ensaios houve um aumento na biomassa semelhante para os dois meios de cultura (HB e MS) nas quatro temperaturas testadas (25, 30, 35 e 40 °C), quando comparado com o desenvolvimento dos experimentos realizados em estado estacionário (0 rpm). Este fato é resultante da agitação do meio, uma vez que, favorece a aglomeração e o crescimento do micro-organismo por possibilitar maior aeração e a maior disponibilidade de oxigênio para a levedura, favorecendo o seu desenvolvimento celular.

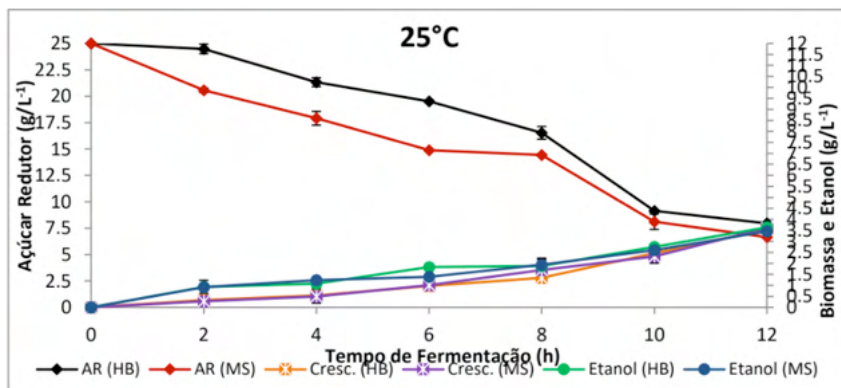


Figura 5 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares pela levedura no meio HB e MS com AR de 25 g.L⁻¹ e 150 rpm à 25 °C.

A agitação utilizada (150 rpm) associada à temperatura de 25 °C promoveu a formação de 3,52 g.L⁻¹ no HB e 3,61 g.L⁻¹ no MS ao final da fermentação, 12 horas; e a produção de 3,63 g.L⁻¹ de etanol no HB e 3,45 g.L⁻¹ de etanol no MS. Como apresentado na Figura 5. Isso ocorreu devido o desenvolvimento da *S. cerevisiae* estar abaixo da sua temperatura ótima. Além disso, a aglomeração pode prejudicar a produção do etanol pela menor difusão de nutrientes entre as células (Ostergaard et al., 2000).

Os resultados da utilização dos açúcares presentes no meio, do crescimento celular e da produção de etanol para os meios HB e MS na temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm estão apresentados na Figura 6.

O maior crescimento da levedura para esta temperatura foi ao fim da fermentação, sendo de 3,90 g.L⁻¹ para o HB e 4,5 g.L⁻¹ no MS. A máxima produção de etanol obtida foi de 6,04 g.L⁻¹ no HB e 6,45 g.L⁻¹ para o MS, em 10 h de fermentação (Figura 6).

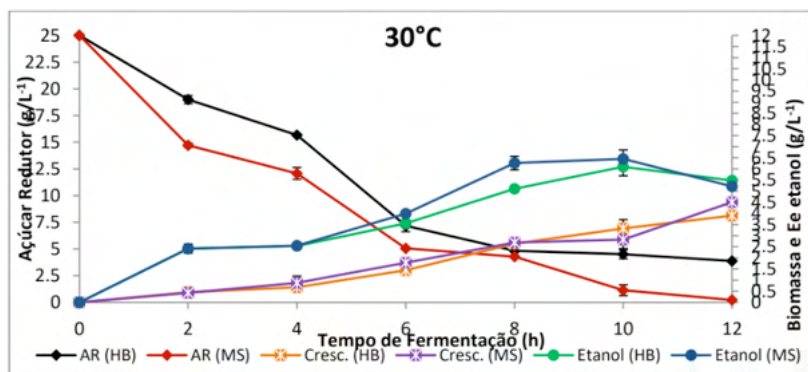


Figura 6 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares pela levedura no meio HB e MS com AR de 25 g.L⁻¹ e 150 rpm à 30 °C.

Pode-se observar que a agitação favoreceu o crescimento celular, ou seja, conforme se aumenta a velocidade de agitação dos frascos, mais acentuado se torna o incremento da biomassa leveduriforme no meio de cultura. Em contrapartida, em um processo onde se queira a conversão das fontes de carbono voltadas principalmente para produção de massa celular do micro-organismo se tornaria vantajoso, pois, além da grande quantidade de biomassa formada, a concentração de etanol nos meios não aumentou de forma proporcional ao crescimento. Isso pode ser devido ao fato de que a levedura não só produz etanol como produto do metabolismo microbiano, mas também outros metabólitos (glicerol), e essa via pode estar sendo favorecida pela agitação,

Na Figura 7 está apresentado o perfil dos resultados obtidos para os mesmo parâmetros, porém, submetidos a temperatura de fermentação de 35 °C.

Em relação à produção de etanol, observou-se que os valores máximos obtidos foram de 8,46 g.L⁻¹ para o HB em 8 h de fermentação e 7,67 g.L⁻¹ para o MS em 10 h, ambos em temperatura de 35°C (Figura 7). Tais dados reforçam que a temperatura ótima de incubação para a obtenção dos maiores índices de etanol pela *S. cerevisiae* ATCC 26602 está em torno de 35 °C.

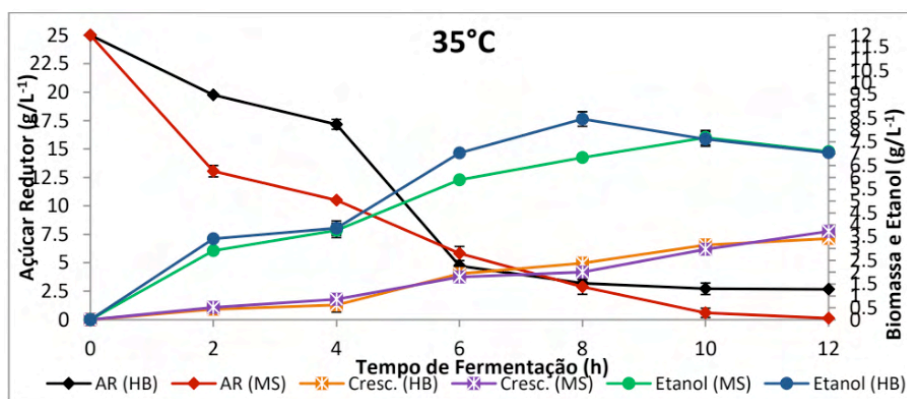


Figura 7 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares pela levedura no meio HB e MS com AR de 25 g.L⁻¹ e 150 rpm à 35 °C.

O pior desempenho para a produção de etanol foi constatado na temperatura de 25 °C, mostrando que a levedura não atua bem em tal temperatura, mesmo em condições de ausência de oxigênio (4,79 g.L⁻¹ de etanol no HB; 4,67 g.L⁻¹ para o MS), e muito menos ao promover a agitação no cultivo (3,63 g.L⁻¹ no HB; 3,45 g.L⁻¹ no MS).

Os resultados obtidos na fermentação a 40 °C e 150 rpm de agitação estão apresentados na Figura 8, para os meios contendo o HB e o MS.

Na Figura 8 está representado que no MS a levedura foi capaz de consumir todo o AR presente no meio e gerou 4,06 g.L⁻¹ de etanol. Mesmo sem consumir todo o açúcar

presente produziu 4,98 g.L⁻¹ de etanol no HB.

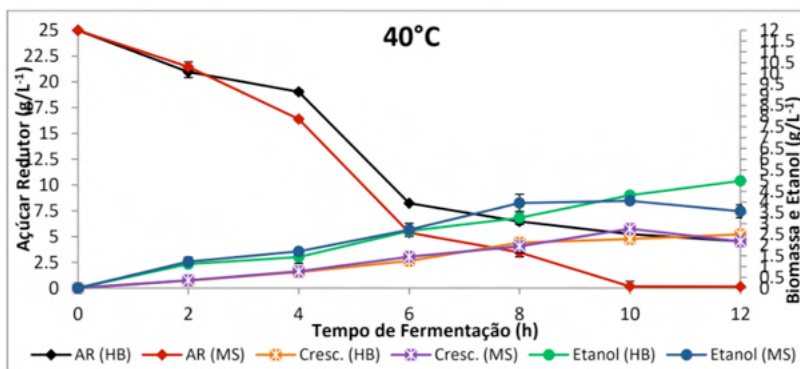


Figura 8 – Produção de etanol, biomassa e consumo de açúcares pela levedura no meio HB e MS com AR de 25 g.L⁻¹ e 150 rpm à 40 °C.

As leveduras podem realizar além da fermentação, o metabolismo respiratório, o qual exige a presença de oxigênio. O metabolismo respiratório apresenta um maior rendimento em ATP, quando comparado ao metabolismo fermentativo, e produz precursores de aminoácidos essenciais ao crescimento celular (Walker, 1998). Neste trabalho, isto poderia explicar o fato de que as fermentações realizadas com agitação favoreceram o crescimento celular, pois, com maior aeração possibilitou maior disponibilidade de oxigênio no meio.

Os autores Lin et al. (2012) analisaram a influência da temperatura, concentração inicial de glicose e pH na fermentação etanólica da *S. cerevisiae* e verificaram que a taxa específica de crescimento e de produção de etanol máxima ocorreu entre 30 e 45°C. Observaram também, que com o aumento da oferta de substrato não melhorou a produção de etanol, principalmente quando o valor de pH não foi controlado. Este mesmo comportamento ocorreu no presente trabalho, onde a temperatura ótima para a produção de etanol no hidrolisado de resíduos de mandioca foi de 35°C, valor intermediário ao relatado pelos autores.

Os pesquisadores Moshi et al. (2015) avaliaram a produção de etanol a partir de mandioca selvagem e conseguiram níveis de etanol próximos a 10-11% (v/v), e a elevada eficiência de conversão dos açúcares presentes na matéria-prima (97,6%) foi alcançada por hidrólise separada do processo de fermentação e sacarificação simultânea. Nesse trabalho os autores fizeram hidrólise enzimática com α -amilase e glucoamilase obtendo a concentração de 250 g.L⁻¹ em AR que, posteriormente, foram utilizados como substrato pela *S. cerevisiae* incubada a 30 °C. A maior concentração de etanol obtida foi de 84,3 g.L⁻¹. Tais valores são superiores ao máximo obtido na presente pesquisa (10,46 g.L⁻¹ de etanol e 134,84 g.L⁻¹ de AR), essa diferença ocorreu pois, a hidrólise com enzimas é mais específica e libera maior quantidade de açúcares, porém, se torna um processo mais caro

e demorado. Mesmo assim, na temperatura de 35 °C, utilizando a mesma levedura e uma concentração inicial de 25 g.L⁻¹ de AR, ou seja, dez vezes menor do que a concentração usada pelos referidos autores, foram obtidos 10,46 g.L⁻¹ de etanol em 10 h de fermentação, o correspondente a 92,3% do rendimento teórico máximo, valores muito próximos aos relatados por Moshi et al. (2015). Portanto, uma menor concentração inicial de substrato proporcionou bons rendimentos em etanol, e isso pode ser devido ao fato de que meios altamente concentrados em açúcares podem desencadear inibição osmótica microbiana e com isso prejudicar a produção de bioetanol.

CONCLUSÃO

A máxima produção de etanol obtida foi na temperatura de 35 °C em 10 horas de fermentação (10,46 g.L⁻¹) em estado estacionário (0 rpm) e a produtividade foi de 1,04 g.L⁻¹.h⁻¹. A agitação dos meios teve o efeito de estimular o crescimento da levedura. Os meios de cultura contendo o hidrolisado dos resíduos de mandioca sem o processo de desintoxicação podem ser uma alternativa eficiente para a produção de etanol de segunda geração pela levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602. Isto é de grande importância, pois diminuiria uma etapa do processo para produção de Etanol 2G e, também os custos.

REFERÊNCIAS

- Alvira, P. et al., (2010). **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. *Bioresource Technology*, 101, 4851-4861.
- Bharathiraja, B. et al., (2017). **Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 68, 788–807.
- Cereda, M.; Vilpoux, O. (2003). **Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas, Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas**, v.3, São Paulo: Fundação Cargill, 771p.
- Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R., (2004). **Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties**. *Journal of Food Science*, 69, FCT67-FCT72 .
- Lavová, B.; Urminská, D.; Sillerová, S. (2014). **Diauxic growth of *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3 122-123.
- Lin, Y. et al. **Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742**. *Biomass and Bioenergy*, v. 47, n. 1, p. 395–401, 2012.
- Mendes, C. V. T. et al. (2016). **Integrated bioconversion of pulp and paper primary sludge to second generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602**. *Bioresource Technology*, v. 220, n. 1, p. 161-167.

Moshi, A. et al., (2015). **Production of bioethanol from wild cassava *Manihot glaziovii* through various combinations of hydrolysis and fermentation in stirred tank bioreactors.** British Biotechnology Journal. 5, 123-139.

Nelson, N., (1944). **A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose.** Biochemistry. 153, 375–380.

Ostergaard, S. et al. (2000) **Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiol.Mol. Biol., v. 64, n. 1, p. 34-50.

Ruiz, H. A.; Martínez, A.; Vermerris, W., (2016). **Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in Mexico.** Bioenerg Res. 9, 981-984.

Schmatz, A. A. et al., (2021). **Pseudo-Lignin Content Decreased with Hemicellulose and Lignin Removal, Improving Cellulose Accessibility, and Enzymatic Digestibility.** BioEnergy Research. 14, 106-121.

Somogyi, M., (1952). **Notes on sugar determination.** Journal of Biological Chemistry. 195, 19–23.

Tomás-Pejó, E. et al. (2011). **Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion.** In: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. Elsevier, Madrid, 2011, pp. 149-176.

Walker, G. (1998) **Yeast Physiology and Biotechnology.** 1^a. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 362p.

SOBRE A ORGANIZADORA

DRA. ALANA MARIA CERQUEIRA DE OLIVEIRA - Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Estadual de Santa Cruz -UESC (2002) com habilitação pelo CRBM 4 em Patologia Clínica -Análises Clínicas e Biologia Molecular , licenciada em Biologia pela Faculdade Cruzeiro do Sul (2020), licenciada em Pedagogia pela Faculdade Faveni (2021). Em 2021 se especializou em Saúde indígena pela Faculdade Dom Alberto. Obteve seu Mestrado (2006) o Doutorado (2011) em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP. Pós-Doutorado pelo Instituto Nacional de células Tronco, INCTC -USP (2012). O segundo Pós-doutoramento foi realizado pelo departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP (2014). Seu terceiro Pós-Doutorado pelo Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-FFCL-USP (2016). Atualmente é professora Substituta no Instituto Federal do Acre -IFAC.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abelhas melíferas 196, 203, 204

Aleloquímicos 157, 158, 162

Alface 157, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 201

Assistência a pacientes crônicos 70, 73

B

Barragem das águas 212

Bioindicadores 218, 220, 230

Buriti 212, 216, 217

C

Clarificação 233, 234, 239, 240, 241, 242, 243

Coronavírus 22, 23, 24, 25, 26, 33

Covid-19 4, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 116

D

Desmatamento 211, 212, 213, 214, 216, 217

Doenças periodontais 22, 28, 29, 30, 33

E

Educação alimentar 112

Ensino de ciências 185

Enterobacterales 6, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109

Enterobacter cloacae 102, 103, 105

Escherichia coli 5, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 110, 143, 144, 145

Espécies invasoras 185, 187

Estado nutricional 45, 46, 51, 52, 111, 112, 114, 121, 124, 125, 231

Etanol de segunda geração 246, 247, 256

F

Fator-1 4, 1, 2, 4, 5

Fermentação 168, 169, 170, 172, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 245, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256

Filtro de profundidade 233, 235

Fitoplanctônicos 218, 219, 229, 232

Função pulmonar 5, 92, 93, 97, 98, 99

H

Hipóxia 4, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18

I

Indicador de resultado 70, 73, 75, 76, 81

Infecções urinárias 83, 85, 87

Inseticidas 196, 197, 200, 201, 204, 206, 208

K

Klebsiella pneumoniae 6, 102, 103, 109, 127, 128, 134, 141, 142, 143, 144, 145, 146

L

Lipase 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184

M

Mauritia flexuosa I 8, 211, 212

Microalgas 218, 219, 222

Microorganismo multirresistente 102, 108

Multirresistência antimicrobianos 128

P

Pacientes oncológicos 4, 45, 46, 47, 51, 52, 53, 55

Pau-santo 157, 158

periodontite 22, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32

Periodontite 22, 29

Podcast 7, 185, 186, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194

Polinizadores 196, 197, 198, 200, 201, 202, 204, 210

Potencial alelopático 157, 158, 165, 166, 167

precipitação seletiva de proteínas 233, 235, 243

Q

Qualidade da água 8, 218, 219, 221, 222, 227, 228, 229, 230, 232

R

Reservatório hidrelétrico 218, 225

Resíduo agroindustrial 169, 172

Resíduos de mandioca 245, 246, 247, 248, 255, 256

Resistência ao cisalhamento 34, 38, 40

Resistência à tração 34, 35, 36

Riacho pinto 212, 214, 216

Rinite alérgica 5, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100

S

Sars-COV-2 33

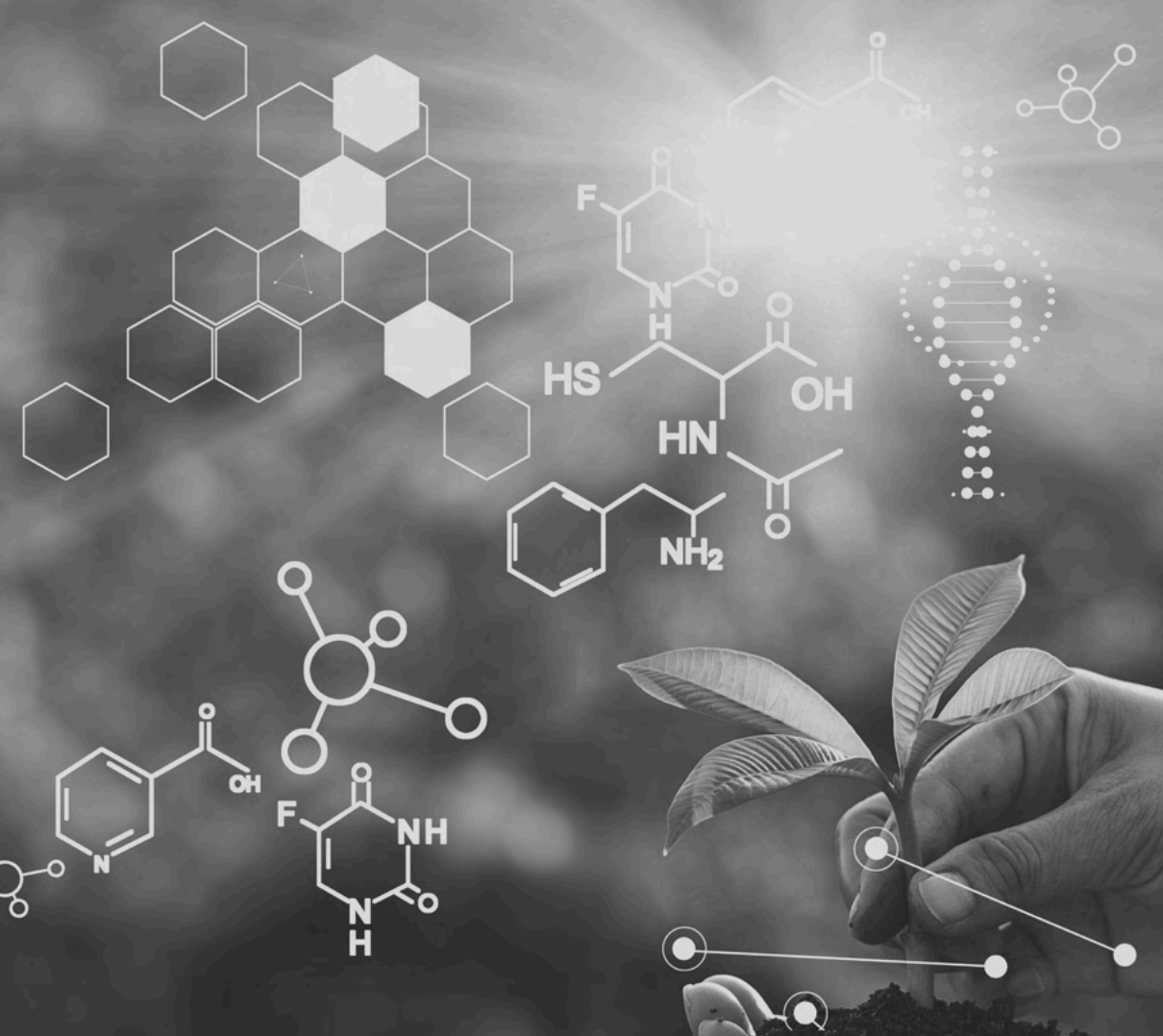
Serratia marcescens 102, 103, 105

Síndrome de down 6, 29, 111

Staphylococcus aureus 6, 110, 147, 148, 149, 151, 152, 154, 155, 156

V


Vancomicina 6, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154



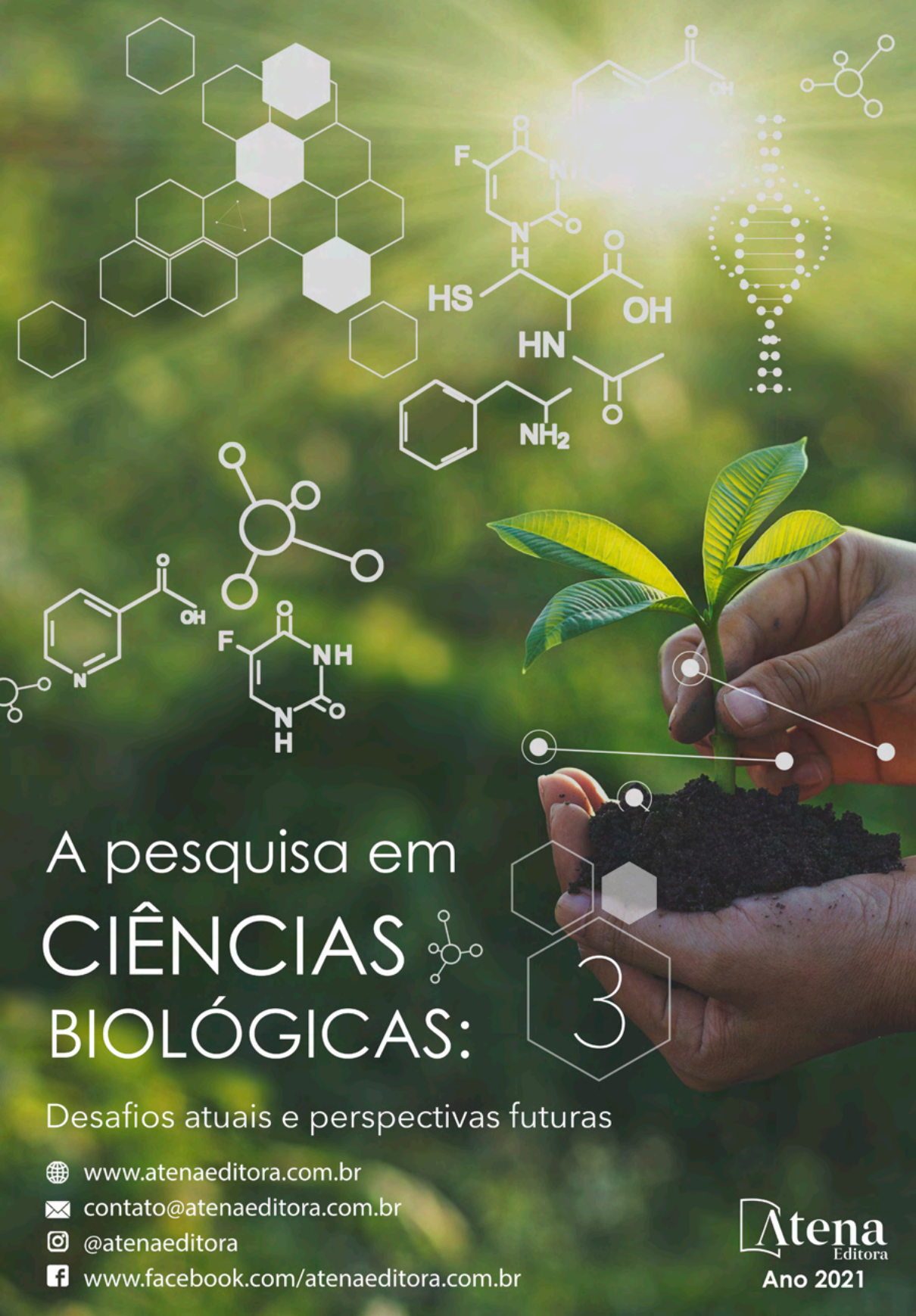
A pesquisa em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

3

Desafios atuais e perspectivas futuras


-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2021



A pesquisa em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Desafios atuais e perspectivas futuras

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2021