



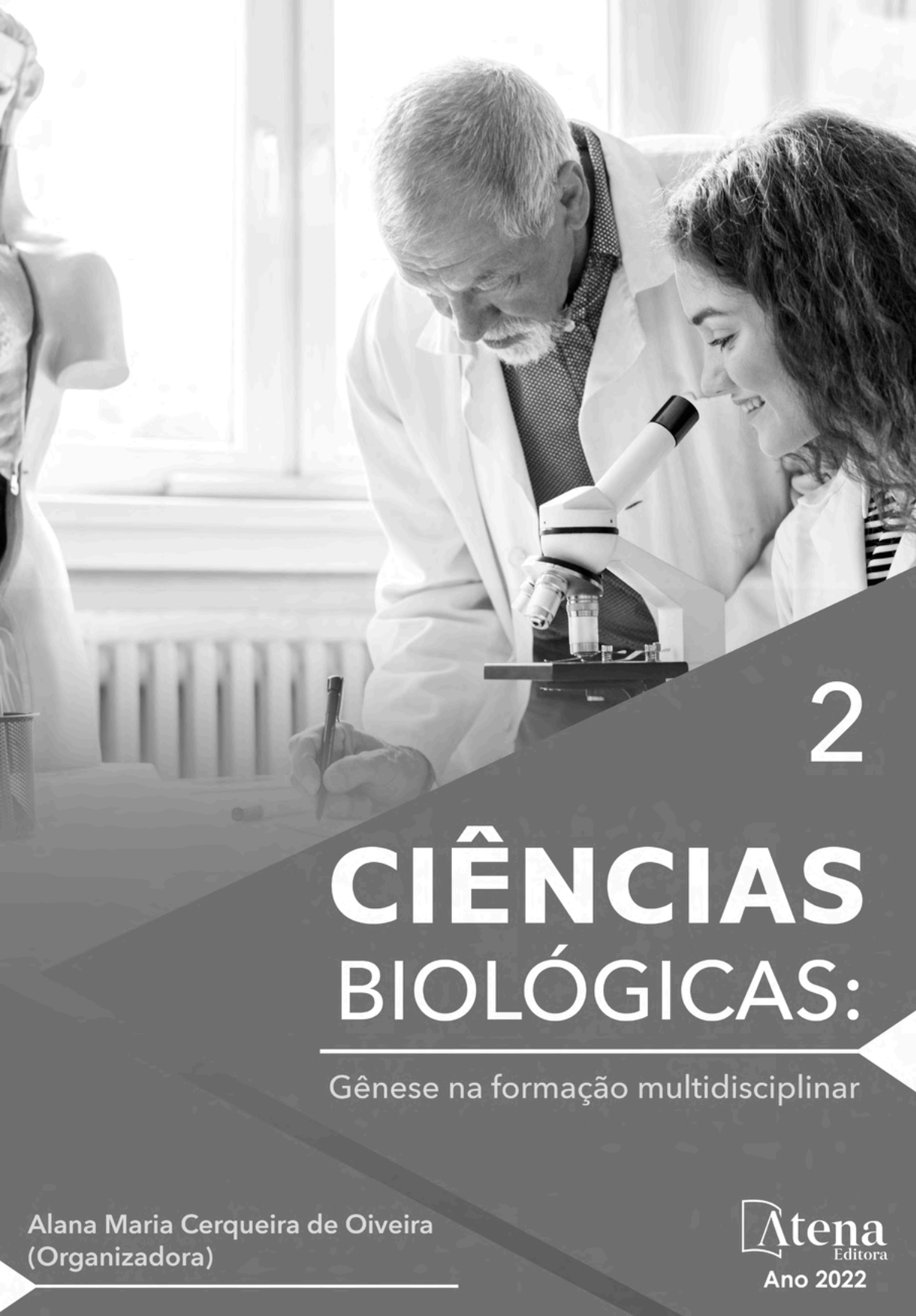
2

# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Gênese na formação multidisciplinar

Alana Maria Cerqueira de Oiveira  
(Organizadora)

**Atena**  
Editora  
Ano 2022



2

# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Gênese na formação multidisciplinar

Alana Maria Cerqueira de Oiveira  
(Organizadora)

**Atena**  
Editora  
Ano 2022

**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

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 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**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

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



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> 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 Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



## Ciências biológicas: gênese na formação multidisciplinar 2

**Diagramação:** Camila Alves de Cremo  
**Correção:** Yaiddy Paola Martinez  
**Indexação:** Amanda Kelly da Costa Veiga  
**Revisão:** Os autores  
**Organizadora:** Alana Maria Cerqueira de Oliveira

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C569 Ciências biológicas: gênese na formação multidisciplinar 2 / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-841-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.417221701>

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](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br



**Atena**  
Editora  
Ano 2022

## 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

O Livro “Ciências biológicas: Gênese na formação multidisciplinar 2”, traz ao leitor vinte capítulos de relevada importância na área de Genética, Citogenética, Imunologia, Parasitologia, Química medicinal, Saúde pública e Ecologia. Entretanto, caracteriza-se como uma obra multidisciplinar que engloba diversas áreas da Ciências biológicas.

Os capítulos estão distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e multidisciplinar a Ciências biológicas, as pesquisas englobam estudos de: mapeamentos genético, citogenético, sequenciamento, genética e educação, análises forenses, doenças genética, eugenesia clássica, engenharia genética, análise por PCR, cultura de células de linfoma e leucemia, saúde mental, resposta imune, vacinação contra a covid-19, vírus Sars-Cov-2, métodos de extração de lipídios, levantamento taxonômico, morfologia vegetal, eficiência de inseticidas, química medicinal, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de infravermelho (IV) e espectrometria de massas (EM), problemática ambiental e de saúde pública, poluentes emergentes e biodiesel.

A obra foi elaborada primordialmente com foco nos profissionais, pesquisadores e estudantes pertencentes às áreas de Ciências biológicas e Ciências da Saúde 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, inglês ou espanhol. Utilizando uma linguagem acessível, concisa e didática, atraindo a atenção do leitor, independente se seu interesse é acadêmico ou profissional.

O livro Ciências biológicas: Gênese na formação multidisciplinar 2”, traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propícia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Alana Maria Cerqueira de Oliveira




## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

#### **LA ERRADICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS: DE LA EUGENESIA CLÁSICA A LA INGENIERÍA GENÉTICA**

Alejandro Gordillo-García

María del Carmen García Rodríguez

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.417221701>

### **CAPÍTULO 2..... 14**

#### **MAPEAMENTOS GENÉTICO, CITOGENÉTICO E DE SEQUENCIAMENTO DO FEIJÃO-FAVA: UMA REVISÃO**

André Oliveira Melo

Marcones Ferreira Costa

Michelli Ferreira dos Santos

Verônica Brito da Silva

Maria Fernanda da Costa Gomes

Gleice Ribeiro Orasmo

Lidiane de Lima Feitoza


Lívia do Vale Martins

Raimundo Nonato Oliveira Silva

Ângela Celis de Almeida Lopes

Regina Lucia Ferreira Gomes

Sérgio Emílio dos Santos Valente


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217012>

### **CAPÍTULO 3..... 34**

#### **GENETICS AND EDUCATION: OVER 50 YEARS GENERATING COLLABORATIONS, BUILDING BRIDGES AND WEAVING NETWORKS IN ENDLESSLY TURBULENT SCENARIOS**

Alberto Sergio Fenocchio

Verónica Graciela Teza

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217013>

### **CAPÍTULO 4..... 38**

#### **DROGAS MAIS CONSUMIDAS NO BRASIL E SUA RELAÇÃO EM CRIMES CONTRA O INDIVÍDUO: COMO UM TESTE RÁPIDO AJUDARIA EM CASOS DE PRISÃO EM FLAGRANTE**

Águida Maiara de Brito

Lustarllone Bento de Oliveira

Melissa Cardoso Deuner

Felipe Monteiro Lima

Joselita Brandão de Sant'Anna


Jackson Henrique Emmanuel de Santana

José Vanderli da Silva

Caio César dos Santos Mognatti

Juliana Paiva Lins


Jéssica dos Santos Folha  
Bruno Henrique Dias Gomes  
Erica Carine Campos Caldas Rosa  
Marcela Gomes Rola

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217014>

**CAPÍTULO 5..... 54**

**IMPLICAÇÕES DA VACINAÇÃO CONTRA A COVID-19 EM GESTANTES E PUÉRPERAS EM CONTEXTO PANDÊMICO: UMA REVISÃO DE LITERATURA**


Ana Luíza Moraes Oliveira  
Jéssica de Moutta Gomes

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217015>

**CAPÍTULO 6..... 66**

**EFEITO DO BIOFILME DE *Arthrographis kalrae* NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS**


Bianca Dorana de Oliveira Souza  
Janneth Josefina Escobar Arcos  
Bruno Fernando Cruz Lucchetti  
Phileno Pinge Filho  
Mario Augusto Ono  
Ayako Sano  
Luciene Airy Nagashima  
Adriane Lenhard-Vidal  
Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda-Rodini  
Eiko Nakagawa Itano

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217016>

**CAPÍTULO 7..... 76**

**POTENTIAL OF *Saccharomyces cerevisiae* IN *Fusarium graminearum* ANTIBIOSIS AND ZEARALENONE DETOXIFICATION**

Andressa Jacqueline de Oliveira  
Mario Augusto Ono  
Melissa Tiemi Hirozawa  
Jaqueline Gozzi Bordini  
Claudemir Zucareli  
Elisabete Yurie Sataque Ono


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217017>

**CAPÍTULO 8..... 93**

**BIOLOGICAL EVALUATION OF A THERAPEUTIC DEVICE THAT IS BASED IN PULSED-ELECTROMAGNETIC FIELDS AND STATIC MAGNETIC FIELDS ON A MURINE MODEL**

Abraham O. Rodríguez-De la Fuente  
José Antonio Heredia-Rojas  
Pilar Carranza-Rosales  
Omar Heredia-Rodríguez  
Gerardo Lozano-Garza


Angel Zavala-Pompa  
Pedro Antonio Noguera-Díaz  
José Alberto Valadez-Lira  
Ricardo Gómez-Flores  
Pedro César Cantú-Martínez  
María Porfiria Barrón-González

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217018>

**CAPÍTULO 9..... 107**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-57**


Marcel Lucas de Almeida  
Valécia de Cassia Mendonça da Costa  
Michelly Cristiny Pereira  
Ivan da Rocha Pitta  
Marina Galdino da Rocha Pitta

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.4172217019>

**CAPÍTULO 10..... 114**

**CONCEPÇÃO DE CLÍNICA AMPLIADA E OS DESAFIOS DAS PRÁTICAS EM SAÚDE MENTAL NA ATUALIDADE**


Celian Araújo da Nóbrega Souza  
Carmen Silva Alves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170110>

**CAPÍTULO 11 ..... 127**

**MADUREZ SEXUAL Y ESPECTRO TRÓFICO DE *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) EN EL PARQUE NACIONAL SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO, MÉXICO**


Emmanuel Velasco-Villalobos  
Elizabeth Valero-Pacheco  
Luis Gerardo Abarca-Arenas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170111>

**CAPÍTULO 12..... 139**

**POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE LONGA LATÊNCIA: MONITORAMENTO DE EFICÁCIA DA INTERVENÇÃO FONOAUDIOLÓGICA EM ESCOLARES COM DISLEXIA**

Ana Luiza de Faria Luiz  
Yara Bagali Alcântara  
Brena Elisa Lucas  
Carolina Almeida Vieira  
Simone Aparecida Capellini  
Ana Cláudia Figueiredo Frizzo


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170112>

**CAPÍTULO 13..... 149**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA**

*Scenedesmus* sp.


Alana Ramos Nobre  
Karollyna Menezes Silva  
Keilla Santos Cerqueira  
Jacqueline Rego da Silva Rodrigues  
Roberto Rodrigues de Saouza

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170113>

**CAPÍTULO 14..... 164**

EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON *Fusarium verticillioides* GROWTH AND FUMONISIN B<sub>1</sub> DETOXIFICATION


Melissa Tiemi Hirozawa  
Mario Augusto Ono  
Sandra Garcia  
Jaqueline Gozzi Bordini  
Andressa Jacqueline de Oliveira  
Elisa Yoko Hirooka  
Elisabete Yurie Sataque Ono

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170114>

**CAPÍTULO 15..... 183**

PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE *Drosophila* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)


Lorena Tayrini de Oliveira da Silva  
Silvana Aparecida Beira  
Camila Heloíse dos Santos  
Janaina Cosmedamiana Metinoski Bueno  
Natana Maria Metinoski Bueno  
Rogério Pincela Mateus  
Luciana Paes de Barros Machado

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170115>

**CAPÍTULO 16..... 207**

BENZOFENONA E OCTOCRILENO COMO POLUENTES EMERGENTES: UMA PROBLEMATICA AMBIENTAL E DE SAÚDE PÚBLICA

Diego Espírito Santo  
Andrielle Karine Ribeiro Mendes  
Débora Cristina de Souza  
Flávia Vieira da Silva Medeiros  
Ana Paula Peron


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170116>

**CAPÍTULO 17..... 228**

MORFOLOGIA VEGETAL: UMA ABORDAGEM PALINOLOGICA DE *HIBISCUS ROSA-SINENSIS* L.

João Marcos Gomes Leite  
Maristela Tavares Gonçalves


Alessandro Oliveira Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170117>

**CAPÍTULO 18.....236**

**CONSIDERAÇÕES SOBRE O FITOPLÂNTON DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO: GRUPOS FUNCIONAIS DE REYNOLDS (GFR) E IMPLICAÇÕES PARA OS MÚLTIPLOS USOS DA ÁGUA**


Vladimir de Sales Nunes  
Mávani Lima Santos  
Caio Carvalho Novais de Moraes  
Bruno César Silva  
René Geraldo Cordeiro Silva Júnior  
Edson Gomes de Moura Júnior  
Ludwig Lima Nunes  
Carlos Vinícius da Silva Cabral  
Angélica Barbosa Jericó  
Nadiane Nunes da Silva  
Gabriel Luiz Celante da Silva  
Benoit Jean Bernard Jahyny

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170118>

**CAPÍTULO 19.....251**

**AVALIAÇÃO DE MISTURAS TERNÁRIAS DIESEL-BIODIESEL-ETANOL PARA APLICAÇÃO COMO COMBUSTÍVEL EM MOTORES DE CICLO DIESEL**


Guilherme Brandão Guerra  
Gisel Chenard Díaz  
Yordanka Reyes Cruz  
Vinicius Rossa  
Donato Alexandre Gomes Aranda  
Rene Gonzalez Carliz

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170119>

**CAPÍTULO 20.....265**

**EFICIÊNCIA DE INSETICIDAS EM TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJOEIRO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL**

Stella Mendes Pio Oliveira  
Guilherme Mendes Pio Oliveira  
Luana Ranieri Massucato


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170120>

**CAPÍTULO 21.....277**

**ANÁLISE DA APLICAÇÃO DO JOGO DIDÁTICO “ECOLOGIA NO LABIRINTO” PARA OS ALUNOS DO ENSINO MÉDIO**

Milena Resende Nascimento  
Mariana Fideles Ferreira  
Francielly Felix da Silva Isaias  
Mayra Luzia da Cruz e Souza


Frederico Miranda  
Polyanna Miranda Alves  
Polyane Ribeiro Machado

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170121>

**CAPÍTULO 22.....281**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM INDIVÍDUOS COM TALASSEMIAS ALFA E BETA E CORRELAÇÃO COM A INCIDÊNCIA NO MUNICÍPIO DE ASSIS E REGIÃO**

Julia Amanda Rodrigues Fracasso  
Luiz Fernando Moraes-Silva  
Guilherme de Oliveira-Paes  
Luisa Taynara Silvério da Costa  
Maria José Malagutti-Ferreira  
Lucinéia dos Santos  
Renata Aparecida de Camargo Bittencourt

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.41722170122>

**SOBRE A ORGANIZADORA.....295**

**ÍNDICE REMISSIVO.....296**

# CAPÍTULO 1

## LA ERRADICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS: DE LA EUGENESIA CLÁSICA A LA INGENIERÍA GENÉTICA

*Data de aceite:* 10/01/2022

*Data de submissão:* 29/09/2021

**Alejandro Gordillo-García**

Center for Logic and Philosophy of Science  
Institute of Philosophy, KU Leuven, Belgium

**María del Carmen García Rodríguez**

Laboratorio de Antimutagénesis,  
Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis  
Ambiental  
Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”,  
UNAM, CDMX, México  
ORCID 0000-0001-5970-0835

**RESUMEN:** En el presente ensayo se muestra una panorámica histórica, científica y filosófica del interés de la humanidad por erradicar las enfermedades genéticas. Se inicia con una descripción de los antecedentes históricos de la eugenesia: “infanticidios selectivos” realizados en la Antigua Esparta y la “crianza selectiva” propuesta por Platón. Posteriormente, se presenta la historia de la eugenesia clásica como el primer intento de erradicar las enfermedades genéticas, enfatizando los errores científicos, abusos y crímenes a la humanidad cometidos. Finalmente, se discuten los más recientes avances en ingeniería genética y su potencial para erradicar las enfermedades genéticas en el futuro no muy lejano, así como sus implicaciones filosóficas y sociales.

**PALABRAS-CLAVE:** Enfermedades genéticas; Eugenesia clásica; Ingeniería genética;

Implicaciones filosóficas y sociales.

### THE ERADICATION OF GENETIC DISEASES: FROM CLASSICAL EUGENICS TO GENETIC ENGINEERING

**ABSTRACT:** This essay offers a historical, scientific, and philosophical overview and discussion of humanity’s interest in eradicating genetic diseases. It begins with a description of the historical antecedents of eugenics: the “selective infanticides” carried out in Ancient Sparta and “selective breeding” proposed by Plato. Subsequently, the history of classical eugenics is presented as the first attempt to eradicate genetic diseases emphasizing the scientific mistakes, abuses and crimes against humanity committed. Finally, the most recent achievements in genetic engineering and their potential to eradicate genetic diseases in the not-too-distant future are discussed, as well as their philosophical and social implications.

**KEYWORDS:** Genetic diseases; Classical eugenics; Genetic engineering; Philosophical and social implications.

### INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, miles de estudiantes de genética se gradúan cada año. Nuevos laboratorios de investigación son abiertos regularmente en universidades, hospitales, clínicas y empresas privadas. Las patentes en genómica y genética van en aumento, así como las publicaciones científicas en revistas relevantes en estas áreas. La demanda de

genetistas en el mercado laboral jamás había sido tan buena, quienes generalmente ejercen como investigadores, profesores, laboratoristas, ingenieros, consultores e incluso abogados. En efecto, la genética es una ciencia en pleno crecimiento que está adquiriendo una mayor influencia en nuestras vidas cotidianas, y al no haber indicios de que esta tendencia vaya a desacelerar, el siglo XXI es un prospecto para convertirse en el “Siglo de la Genética.”

Pero, si les pidiéramos a todos estos científicos y trabajadores del área que por un momento apartaran la vista del ocular del microscopio, que apagaran las centrifugas, los secuenciadores de DNA y los termocicladores (máquinas de PCR; reacción en cadena de polimerasa, por sus siglas en inglés). Si les pidiéramos que solo por un instante dejaran de escribir esos artículos científicos para que nos expliquen por qué investigan y laboran en el área de genética, seguramente nos dirán que, además de percibir un salario, trabajan en esta área porque quieren mejorar la salud humana. Y es que en la actualidad se tiene registro de miles de enfermedades monogénicas.<sup>1</sup> Así mismo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, afectaciones asociadas a alteraciones en múltiples loci en el genoma, llamadas enfermedades poligénicas, como la cardiopatía isquémica (bloqueo o reducción de las arterias coronarias) y los infartos fulminantes (repentina pérdida de funciones neurológicas) encabezaron la lista de causas de muerte del 2000 al 2019.<sup>2</sup> La estructura o el número de cromosomas de un recién nacido también puede ser anormal (mutaciones cromosómicas). Por ejemplo, la trisomía del cromosoma 21 es la causante del síndrome de Down (serie de complicaciones particulares en el desarrollo físico y mental).

¿Cómo puede ayudar un genetista a combatir las enfermedades y condiciones genéticas? En primer lugar, es importante poder detectarlas lo más pronto posible mediante estudios que permitan obtener diagnósticos genéticos en cualquier etapa de la vida (incluidas la pre-natal y pos-natal). En este ámbito, las tecnologías de diagnóstico genético han progresado enormemente en las últimas décadas. Actualmente, existen miles de exámenes genéticos en uso y se están desarrollando aún más. No obstante, diagnosticar una enfermedad sería una actividad médica fútil si no se desarrollaran a la par tratamientos y quizá curas. En el presente ensayo se muestra una panorámica histórica, científica y filosófica del interés de la humanidad por erradicar las enfermedades genéticas partiendo desde los “infanticidios selectivos” realizados en la Antigua Esparta hasta el actual uso de la biotecnología en procedimientos de terapia génica.

## **ANTECEDENTES HISTÓRICOS: LA ANTIGÜEDAD**

Los registros históricos y antropológicos muestran que en la Antigua Esparta (650 a. C.), famosa por su ejército poderoso y sanguinario, se llevaba a cabo lo que hoy se denomina “infanticidio selectivo.” Obviamente, los espartanos no sabían de genes, ni de mutaciones, ni de leyes de la herencia. No sabían por qué algunos bebés nacían con deformidades en



los huesos, con músculos atrofiados, o con proporciones corporales enanas. Pero sí sabían que estos individuos eran diferentes, y consideraron que sus condiciones representaban una discapacidad: jamás se desarrollarían como verdaderos espartanos y representarían una carga para el Estado. Su solución fue arrojar a los bebés y niños con enfermedades o condiciones congénitas por un acantilado hacia su muerte segura.<sup>3</sup> Esta práctica, guiada por motivos más socioculturales que de salud pública, aseguraba que los individuos con genes defectuosos no contribuyeran genéticamente a las siguientes generaciones. Desde luego, no se puede pasar por alto lo innecesariamente cruel que es practicar el “infanticidio selectivo” para erradicar las enfermedades hereditarias.

Otra referencia histórica sobre la erradicación de las enfermedades hereditarias en la Antigüedad la encontramos en la obra *La Republica* (370 a.C.), escrita por Platón en forma de diálogo en donde se discute la “crianza selectiva.” El personaje Sócrates cuestiona a Glaucón sobre sus aves y perros: “¿Y entonces haces que nazcan crías de todos por igual o te esfuerzas para que nazcan especialmente los mejores?... ¿Y si no es así como nacen, consideras que la raza de tus aves y de tus perros será mucho peor?”, a lo que Glaucón responde afirmativamente. Posteriormente, Sócrates sugiere que sería muy bueno hacer lo mismo con seres humanos.<sup>4</sup> Aunque el “infanticidio selectivo” de los Espartanos y la “crianza selectiva” en humanos propuesta por Platón pertenecen a la Antigüedad, no podemos negar que nos resultan perturbadoramente familiares. En efecto, son dos ejemplos de lo que hoy conocemos como “eugenesia.” En pocas palabras, como se explicará a continuación, la eugenesia se basa en la idea de que la especie humana puede ser artificialmente mejorada si utilizamos el conocimiento sobre herencia y las tecnologías disponibles racionalmente para guiar nuestra propia evolución.

## **EUGENESIA CLÁSICA: EL PRIMER INTENTO DE ERRADICAR LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS**

La historia de la eugenesia clásica comienza con la revolución Darwiniana en la segunda mitad del siglo XIX. Basándose en la teoría maltusiana, Darwin dedujo que los seres vivos se encuentran en una “lucha por la existencia” ya que la cantidad de recursos necesarios para la supervivencia y reproducción son proporcionalmente menores a la generación de seres vivos. De acuerdo con la teoría de Darwin, los aproximadamente 4 billones de años de vida en este planeta han sido de incesante competencia, en la cual siempre algunos han salido victoriosos logrando sobrevivir para reproducirse mientras que los demás han perecido necesariamente. Nosotros, por ejemplo, somos los descendientes directos de los ganadores en la lucha por la existencia reciente entre especies del género *Homo* (lucha que perdió el *Homo neanderthalensis*, *Homo erectus* y *Homo floresiensis*). Pero es importante tomar en cuenta que nada asegura que seamos la ascendencia de los próximos pobladores de la Tierra, lo que lleva a preguntarse por qué algunos ganan

y otros pierden en la lucha por la existencia. La genialidad de Darwin fue comprender que el nivel de adaptabilidad a las condiciones locales de vida puede variar de individuo a individuo y de especie a especie. Aunque en su época el conocimiento de genética era pobre, Darwin notó que algunos individuos, por motivos puramente azarosos, pueden nacer con variaciones en sus rasgos corporales, mentales e incluso de comportamiento. Esto no es sorpresa, pues, así como nosotros no somos idénticos a nuestros padres, “nadie supone que todos los individuos de la misma especie estén fundidos absolutamente en el mismo molde.”<sup>5</sup> Ahora, en el contexto correcto, algunas de estas variaciones pueden representar una valiosa ventaja en la “lucha por la existencia.” Un cuello de jirafa más largo para alcanzar el follaje, una toxina más mortífera de un pino para eliminar nematodos, un comportamiento social más desarrollado en humanos para forjar grupos fuertes son ejemplos de variaciones benéficas. Como dijo Darwin, “(...) los individuos caracterizados de este modo tendrán seguramente las mayores probabilidades de conservarse en la lucha por la vida y, por el poderoso principio de herencia, tenderán a producir descendientes con caracteres semejantes. A este principio de conservación o supervivencia de los más adecuados lo he llamado selección natural.”<sup>5</sup>

Aunque Darwin fue ampliamente reconocido por su descubrimiento y trabajo, algunos no pudieron evitar señalar que aún estaba inconcluso pues excluyó el tema de la selección natural en humanos y la posibilidad de guiar racionalmente nuestra propia evolución. Fue su primo Francis Galton quien se encargaría de abordar este tema. Galton tenía una enorme confianza en el poder de la ciencia como motor del progreso social; más aún, cuando leyó la teoría de su primo consideró que comprender el proceso de evolución por selección natural nos confiere la responsabilidad de garantizar la multiplicación de los más aptos de nuestra especie al igual que el decremento de la reproducción de los menos aptos. Denominó “eugenesia” (del griego *eu*: buen, y *genos*: origen o nacimiento) a la “ciencia que trata de todas las influencias que mejoran las cualidades innatas, o materia prima de una raza y también aquellas que la pueden desarrollar hasta alcanzar la máxima superioridad.”<sup>6</sup>

La primera gran victoria pública de Galton fue su descubrimiento de que, además de los rasgos físicos, los rasgos mentales como la inteligencia y la personalidad también son heredables. Su enfoque fue el análisis estadístico de cientos de genealogías familiares registradas en enciclopedias biográficas, registros civiles e historiales médicos. Lo que descubrió fue que las personas con alta inteligencia y rasgos de personalidad particulares (e.g., talento, moralidad, honestidad, responsabilidad social) tienden a tener hijos y nietos con estos mismos rasgos. Por lo tanto, pensó Galton, lo que verdaderamente determina nuestro destino es lo que heredamos biológicamente de nuestros padres y no las circunstancias ambientales y sociales, como el nivel de educación o estatus económico, en las que nos desarrollamos. El trabajo de Galton sentó el precedente y marcó la dirección de las discusiones sobre eugenesia que se darían en las próximas décadas. De acuerdo

con Galton, el hecho de que la inteligencia y la personalidad sean heredables significa que pueden ser manipuladas y moldeadas a nuestra conveniencia: “si una veinteava parte de los costes y esfuerzos que se invierten en mejorar la cría de caballos y ganado se invirtiera en medidas para la mejora de la raza humana, ¡qué galaxia de genios podríamos crear!”<sup>7</sup>

Para comprender fielmente el proyecto Galtoniano se deben tomar en cuenta algunos puntos importantes. En primer lugar, al igual que muchos otros pensadores de su tiempo, Galton consideró que las sociedades humanas estaban pasando por un grave momento de deterioro genético, particularmente en las naciones industrializadas. Muchos estudios indicaban que el estrato social menos favorecido, que incluye a los aquejados por enfermedades genéticas, los pobres y los alcohólicos, tendían a multiplicarse más que los favorecidos,<sup>8</sup> lo que eventualmente podría llevar al deterioro de la sociedad (a este proceso se le conoce como “disgenesia”). Galton buscaba mejorar la salud humana, la inteligencia y el carácter moral mediante el aumento de “matrimonios eugenésicos,” es decir, matrimonio entre individuos aptos. Propuso que esto se lograría educando al público en general sobre la importancia de la eugenesia para que así puedan tomar decisiones informadas sobre su reproducción. A este tipo de eugenesia se le llama “eugenesia positiva” ya que su objetivo es aumentar los buenos rasgos en la población. En contraste, la “eugenesia negativa” busca eliminar los rasgos inferiores.

A finales del siglo XIX y principios del XX, la eugenesia ya era un tema del dominio público en Inglaterra y otros países. En 1907 se formó la *Eugenics Education Society*, la primera en su tipo en el mundo, cuyos principales objetivos fueron modificar la opinión pública sobre la importancia de los ideales eugenésicos, enseñar las leyes de la herencia y “promover la enseñanza eugenésica, en el hogar, en las escuelas y en otros lugares.”<sup>9</sup> Entre sus miembros más influyentes destacan el ex-primer ministro Winston Churchill, el economista John Maynard Keynes, el escritor H. G. Wells, la activista Marie Stopes, entre otros. En esa época, revistas científicas sobre eugenesia como el *Annals of Eugenics*, *The Eugenics Review* y *Biometrika* adquirieron una gran prominencia y difusión. Todos estos esfuerzos por parte de los eugenistas tuvieron sus frutos en 1913 cuando el Parlamento inglés aprobó la primera ley eugenésica conocida como *Mental Deficiency Act* y los británicos celebraban el nacimiento de quien consideraron la primera “bebe eugénica” llamada Eugenette Bolce.

Mientras tanto, la eugenesia comenzaba a insinuarse en las corrientes intelectuales, programas médicos y proyectos políticos de muchos otros países incluyendo Japón, Noruega, Canadá, Brasil y México.<sup>10</sup> Sin embargo, dos países requieren nuestra particular atención pues destacaron por la extensión e idiosincrasias de sus programas eugenésicos: Estados Unidos y la Alemania Nazi. Si bien la eugenesia británica se basaba en la estadística y la biometría, en Estados Unidos fue el redescubrimiento del trabajo de Gregor Mendel lo que dio un fuerte impulso a la eugenesia en ese país. A partir de miles de experimentos de cruzamiento con chicharos, Mendel dedujo sus cuatro principios de la herencia: factores

en pareja, dominancia/recesividad, segregación al azar y transmisión independiente.<sup>11</sup> Mediante estos principios, Mendel predecía con gran exactitud las probabilidades de la herencia de ciertos “factores hereditarios” (hoy llamados “genes”) de la planta *Pisum sativum* como el color de la flor o la forma de los chicharos. Estudios pioneros sobre la herencia de ciertos rasgos y enfermedades humanas como la alcaptonuria demostraron que las leyes Mendelianas también operan en nuestra especie.<sup>12</sup> Sin embargo, aún no se contaba con verificación empírica de la existencia de los genes ni con conocimiento sobre el mecanismo molecular de la herencia, lo que permitió que varios investigadores comenzaran a especular al respecto y exagerar libremente la herencia Mendeliana. Charles Davenport fue el líder de la eugenesia en Estados Unidos. Llevó a cabo numerosos estudios de árboles genealógicos que miles de familias enviaban por correspondencia a su *Eugenics Record Office* en forma de cuestionarios, records de su historial médico y descripciones personales. Cuando Davenport descubría algún rasgo recurrente en una familia, asumía que éste era heredado por leyes Mendelianas. Así, aseguró sin mayor evidencia que la criminalidad, la debilidad mental (hoy llamada discapacidad intelectual), el alcoholismo, el pauperismo, la demencia, la prostitución, el nomadismo y el amor por el mar son rasgos que se pasan a la descendencia por herencia Mendeliana.<sup>13</sup> Estos resultados convencieron a muchos de que “(...) el problema más urgente el día de hoy es cómo limitar y desalentar la sobre-fertilidad de los defectuosos mentales y físicos.”<sup>14</sup> En 1907, el estado de Indiana aprobó la primera ley que estipulaba la esterilización obligatoria a criminales, débiles mentales y violadores. La ley se popularizó rápidamente en el resto del país y más de 60,000 personas fueron esterilizadas.

La eugenesia negativa de Estados Unidos fue ampliamente admirada por los Nazis, quienes enviaban comisionados a ese país para observar el desarrollo de sus programas e importar ideas. Sin embargo, los Nazis fueron más allá e incluyeron en sus programas eugenésicos la eutanasia (muerte intencionada a enfermos) y campos de concentración, además de prohibir ciertos matrimonios, controlar estrictamente la inmigración y aplicar la esterilización obligatoria. Bajo el liderazgo de Adolf Hitler, los Nazis se vieron a sí mismos, la raza Aria, en una “lucha por la existencia.” Los individuos inferiores que vivían una *Lebensunwerten lebens* (vida que no vale la pena ser vivida), como los aquejados por enfermedades y condiciones genéticas, los gitanos, los judíos, los homosexuales, entre otros, debían de ser extirpados de la sociedad en lo que denominaron una “higiene racial.”<sup>15</sup> Como resultado, se estima que los programas eugenésicos Nazis esterilizaron entre 300,000 a 400,000 personas y exterminaron alrededor de 6,000,000 de judíos, 250,000 enfermos, más de 200,000 gitanos, 70,000 criminales y otros miles de homosexuales.<sup>16</sup>

El abuso de los Nazis, y de los demás países que igualmente implementaron medidas eugenésicas, atestigua lo fácil que la ciencia puede ser malinterpretada y distorsionada con fines políticos para legitimar la autoridad, la coerción y la destrucción. En la segunda mitad del siglo XX, la eugenesia clásica perdió credibilidad y cayó en desgracia después

de que el mundo se enterara de los horrores del Nazismo. La que una vez fue considerada la ciencia más importante del momento para garantizar el progreso de la humanidad, pasó a ser mundialmente repudiada. Las leyes eugenésicas en los distintos países se fueron anulando de manera paulatina. La mayoría de los institutos, sociedades y clínicas que se habían dedicado al estudio y difusión de la eugenesia se desintegraron en su totalidad incluyendo la *Eugenics Record Office* de Davenport en Estados Unidos y los centros Nazis. Otras organizaciones tuvieron que reconfigurar totalmente sus nombres y objetivos. Por ejemplo, la *Eugenics Education Society* de Inglaterra cambió su nombre a *Galton Institution* y su objetivo ahora es: “estimular e informar el debate público sobre la herencia humana y las preguntas asociadas, y buscar promover la participación pública y la comunicación de estos temas.”<sup>17</sup> Así mismo, las revistas sobre eugenesia tuvieron que reinventarse como el *Annals of Eugenics*, llamada ahora *Annals of Human Genetics*.

## EUGENESIA EN EL SIGLO XXI: INGENIERÍA GENÉTICA Y LA ERRADICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

Durante la segunda mitad del siglo XX se realizaron los descubrimientos más fundamentales en el área de genética, incluyendo la estructura del DNA, el código genético, el RNA mensajero, entre otros.<sup>18</sup> Sin embargo, fue en la década de los 70s cuando se descubrió la manera de editar el genoma de los seres vivos, lo cual cambiaría para siempre nuestra visión y relación con el mundo natural: A partir de ese momento, la evolución genética se volvió un proceso molecular directamente manipulable.<sup>19</sup> Los genetistas Stanley Cohen y Herbert Boyer desarrollaron la tecnología de DNA recombinante, la cual permite la transferencia de genes entre distintos individuos de distintas especies. Su experimento consistió en cortar fragmentos de DNA (factor R de una bacteria responsable de resistencia inmunológica) utilizando enzimas de restricción (específicamente endonucleasa EcoRI) e introducirlos en un plásmido usando endonucleasas y ligasas de bacterias *E. coli*.<sup>20</sup> El resultado fue trascendental: las *E. coli* genéticamente modificadas heredaban a las siguientes generaciones el fragmento de DNA introducido. Nació la ingeniería genética. Inmediatamente después de este éxito, más científicos comenzaron a experimentar. Muy pronto surgió la industria biotecnológica. Las primeras empresas fueron “Cetus Corporation” y “Genentech”. En 1978, comenzó a comercializarse la primera proteína biosintética humana: insulina obtenida mediante la recombinación del DNA con el uso de bacilos *E. coli* por introducción del código genético de la proinsulina humana.

Desde luego, los científicos y médicos se han planteado si la modificación directa del genoma humano podría erradicar las enfermedades hereditarias. Es decir, no solo mitigar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes, sino eliminar del acervo genético de la humanidad las mutaciones causantes de dichas enfermedades y condiciones genéticas mediante técnicas de edición del genoma. Aunque en el siglo XX los avances en genética médica fueron relativamente lentos debido a la falta de conocimiento sobre genómica y

proteómica, así como por la falta de tecnología lo suficientemente avanzada para hacer ediciones genéticas exactas, en el siglo XXI, nuestro siglo, el panorama ha cambiado radicalmente. En el 2001 se anunció la secuenciación del genoma humano, y en el 2002 se inicio el proyecto HapMap que consiste en determinar los patrones comunes de variación de la secuencia de DNA en el genoma humano.<sup>21,22</sup> Conocer exactamente el orden y la posición de los nucleótidos en nuestro genoma, así como poder determinar específicamente qué genes codifican ciertas proteínas, son grandes ventajas para identificar las mutaciones causantes de enfermedades genéticas y poder desarrollar curas. No obstante, también se necesita comprender detalladamente la codificación de todas las proteínas, las relaciones poligenéticas y las interacciones genoma/ambiente, los cuales son los objetivos de los proyectos Proteoma, Transcriptoma y Epigenoma Humano.<sup>23,24</sup>

Por otra parte, el hallazgo de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (en inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) ha sido de gran trascendencia para la ingeniería genética. En 1987 se publicó un artículo en el cual se describía cómo algunas bacterias (*Streptococcus pyogenes*) se defendían de las infecciones víricas mediante enzimas capaces de distinguir entre su material genético y el del virus.<sup>25</sup> Al mapear los genomas de algunas bacterias se encontraron separadas por «espaciadores» repeticiones palindrómicas de DNA (que se leen igual al derecho y al revés) sin ninguna función aparente, pero parecidas a secuencias presentes en virus y plásmidos.<sup>26</sup> A estas secuencias se les llamó CRISPR. Cuando un virus infecta a una bacteria, toma el control de la maquinaria celular interaccionando con distintos componentes celulares. Como sistema de defensa, las bacterias están equipadas con un complejo formado por proteínas (nucleasas Cas) asociado al RNA producido a partir de las secuencias CRISPR. Al interaccionar con este complejo, el material genético del virus es inactivado y posteriormente degradado. Pero el sistema va más allá. Las proteínas Cas son capaces de guardar una parte del DNA viral, modificarlo e integrarlo en las secuencias CRISPR como una “memoria inmunológica.” En el año 2012, estos hallazgos fueron utilizados para generar una herramienta molecular de edición genética en el laboratorio gracias a los estudios de Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna en los que se logró programar el sistema para que se dirigiera a una posición específica de un DNA cualquiera (no solo vírico) y lo cortara. Este sistema CRISPR/Cas9 es una tecnología que hace posible corregir errores en el genoma y activar o inhibir genes en células y organismos de manera más fácil y precisa que los métodos utilizados anteriormente. CRISPR/Cas9 funciona como unas poderosas y sofisticadas “tijeras moleculares” que se pueden programar para realizar una edición precisa en los genes de interés.<sup>27</sup> Este hallazgo les valió el premio Nobel en el año 2020.

Con la tecnología CRISPR/Cas9 se inaugura una nueva era de la ingeniería genética en la que se puede editar, corregir y alterar el genoma de cualquier célula de una manera fácil, rápida, barata y, sobre todo, altamente precisa. En un futuro relativamente

cercano, esta tecnología servirá para curar enfermedades genéticas y que hasta ahora eran incurables. Ya se está trabajando con esta tecnología en enfermedades como la Corea de Huntington, el Síndrome de Down y la anemia falciforme. De igual manera, hay estudios sobre la reprogramación de células para que corten el genoma del VIH. En el Instituto Tecnológico de Massachussets se anunció en marzo de 2014 que se había conseguido curar a un ratón adulto de una enfermedad hepática (tirosinemia de tipo I) de origen genético utilizando esta tecnología,<sup>28</sup> y en el 2015 se publicó el primer trabajo empleando edición en cigotos humanos.<sup>29</sup> Pero la tecnología CRISPR/Cas9 no solo ha quedado ahí, en el 2020 fue la base para el desarrollo de la primera vacuna de RNA para combatir la pandemia que aún en la actualidad esta enfrentando la humanidad.<sup>30</sup>

Solo en nuestra época se posee el conocimiento suficiente sobre el mecanismo molecular de la herencia biológica y la expresión génica, así como las tecnologías de ingeniería genética capaces de editar los genes anormales. La normalización de la ingeniería genética en hospitales y laboratorios representaría una revolución en la medicina de enormes proporciones como la humanidad jamás ha visto. Es plausible que finalmente solucionemos nuestras enfermedades genéticas. Los genetistas y todos los que trabajan en esta área, con su esfuerzo incansable y brillantes avances, están escribiendo la historia de esta tecnología y, si son exitosos, veremos pronto noticias sobre la erradicación de la primera enfermedad genética por medio de la biotecnología molecular. Hay una esperanza renacida en cuanto a la erradicación de enfermedades genéticas gracias a estas técnicas de bioingeniería, sin embargo, de ninguna manera se deben pasar por alto los riesgos que el uso de la ingeniería genética en la humanidad implica pues podrían ser mayores que los beneficios.

## **CONSIDERACIONES FINALES: EL DILEMA DEL SIGLO XXI**

El filósofo George Santayana afirmó muy acertadamente que “aquellos que no pueden recordar el pasado están condenados a repetirlo.”<sup>31</sup> La eugenesia clásica no es una curiosidad de museo que podamos observar y juzgar desde una distancia segura creyendo que ya fue sepultada en la historia para siempre. Gracias a los recientes avances en bioingeniería y medicina genética, las esperanzas de mejorar la salud humana y dirigir nuestra evolución siguen vigentes. Sin embargo, debido al precedente de la eugenesia clásica, actualmente la humanidad enfrenta un dilema filosófico: ¿cómo utilizar las tecnologías de ingeniería genética para erradicar las enfermedades genéticas y hacer el bien sin caer nuevamente en los errores y perversidades del pasado?

Como se expuso en este ensayo, desde un principio la eugenesia clásica estaba destinada a fracasar debido a que el conocimiento genético era muy pobre y ambiguo. No obstante, los eugenistas actuaron con poco cuestionamiento crítico y asumieron que la genética era una ciencia que dominaban. Si hiciésemos igualmente una evaluación de

la ciencia genética actual para determinar su estado de madurez, encontraremos que aún hay muchos temas de los cuáles no se tiene una comprensión total, particularmente en epigenética, proteómica y genómica. Desconocer aspectos clave de la genética humana pone en duda la efectividad de la edición de genes como solución de las enfermedades genéticas. Los errores del pasado fueron el exceso de confianza en el conocimiento genético del momento, la incapacidad de reconocer la falibilidad humana y la mala ciencia. Los eugenistas se dejaron guiar por el nacionalismo, el sexismo, el racismo y el capacitismo, no por el método científico.

Si realmente queremos que en un futuro cercano se apliquen y normalicen las técnicas de ingeniería genética en el genoma de células germinales y así erradicar eventualmente las enfermedades y condiciones genéticas debemos plantearnos cómo lograrlo sin repetir los errores que cometió la eugenesia clásica, específicamente debemos plantearnos tres preguntas: 1) ¿Es el conocimiento genético actual lo suficientemente maduro y exacto para comprender los riesgos? 2) ¿Está la sociedad intelectual y psicológicamente preparada para este tipo de tecnología? y 3) ¿cuál es el mejor plan para normalizar la bioingeniería genética?

## AGRADECIMIENTOS

Para la realización de la presente investigación se contó con el apoyo del Programa de Becas CONACyT para Estudios de Doctorado en el Extranjero (No. Becario 710049).

## REFERENCIAS

1. Online Mendelian Inheritance in Man: An online catalog of human genes and genetic disorders. OMIM Gene Map Statistics. Web: <https://mirror.omim.org/statistics/geneMap>. Consultado el 21 Julio 2021.
2. Organización Mundial de la Salud. Las 10 principales causas de defunción. Web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. 21 de Julio 2021.
3. Moseley, K. R. (1986). The history of infanticide in western societies. *Issues in Law and Medicine*, **1(5)**, 345-361.
4. Platón. (2009). *La República, Libro V*. (p. 459a-e). Madrid, España: Ediciones AKAL. <http://remacle.org/bloodwolf/philosophes/platon/rep5gr.htm#459>
5. Darwin, C. (2009). *El origen de las especies por medio de la selección natural* (p. 168,92) En: Zuleta A. (traductor). España: Alianza Editorial.
6. Galton, F. (1904). Eugenics: its definition, scope and aims. *The American Journal of Sociology*, **10(1)**, 1-25. <https://www.jstor.org/stable/2762125>



7. Galton, F. (1865). Hereditary genius and character. *Macmillan's Magazine*, **12**, 157-166. p. 165. <https://galton.org/essays/1860-1869/galton-1865-hereditary-talent.pdf>
8. Kevles, D. (1985). Deterioration and deficiency. En: Daniel Kevles (Ed). *In the Name of Eugenics. Genetics and the Uses of Human Heredity*. Chapter V (p. 70-84). California, E.U., California Press.
9. Baker, G. J. (2014). Christianity and Eugenics: The place of religion in the british eugenics education society and the American Eugenics Society, c.1907-1940. *Social History of Medicine*, **27(2)**, 281-302. <https://doi.org/10.1093/shm/hku008>
10. Bashford, A. & Levine, P. (2010). National/Colonial Formations, Part II. En: Alison Bashford and Philippa Levine (Ed). *The Oxford Handbook of the History of Eugenics* (p. 213-538). U.K., Oxford Press.
11. Mendel, J. G. (1866). Experiments in plant hybridization. Druery, C. T.; Bateson, William, traductores (1901). *Journal of the Royal Horticultural Society*, **26**: 1-32. <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>
12. Garrod, A. E. (1902). The incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality. *The Lancet*, **160(4137)**, 1616-1620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)41972-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)41972-6)
13. Kevles, D. (1985). Charles Davenport and the worship of great concepts. En: Daniel Kevles (Ed). *In the Name of Eugenics. Genetics and the Uses of Human Heredity*, Chapter III. (p. 42-56). California, E. U., California Press.
14. Sanger, M. (1921). The eugenic value of birth control propaganda. *Birth Control Review*, **5**.
15. Weiss, S. F. (1987). The race hygiene movement in Germany. *Osiris*, **3**, 193-236. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/368666>
16. United States Holocaust Memorial Museum. Documenting numbers of victims of the holocaust and Nazi persecution. Web: <https://encyclopedia.ushmm.org/content/es/article/documenting-numbers-of-victims-of-the-holocaust-and-nazi-persecution>. 15 de marzo del 2021.
17. Galton Institute. Background of the Galton Institute. Web: <http://www.galtoninstitute.org.uk/about/background-aims-activities/>. 15 de julio 2021.
18. Judson, H. F. (1987). El octavo día de la creación. México, D. F. Ediciones Castell Mexicana.
19. Krinsky, S. 2019. *GMOs Decoded a skeptic's view of genetically modified foods*. Cambridge MA: MIT Press.
20. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70(11)**, 3240-3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
21. International Human Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>

22. International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, **426(6968)**, 789-796. <https://doi.org/10.1038/nature02168>
23. Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallström, B., Hopf, T., Zolg, D. P., Zecha, J., Asplund, A., Li, L. H., Meng, C., Frejno, M., Schmidt, T., Schnatbaum, K., Wilhelm, M., Ponten, F., Uhlen, M., Gagneur, J., Hahne, H. & Kuster, B. (2019). A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular Systems Biology*, **15(2)**, e8503. <https://doi.org/10.15252/msb.20188503>
24. Bradbury, J. (2003). Human epigenome project-Up and running. *PLoS Biology*, **1(3)**, E82. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000082>
25. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, **169(12)**, 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
26. Nakata, A., Amemura, M. & Makino, K. (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, **171(6)**, 3553-3556. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989>
27. Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, **578(7794)**, 229-236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
28. Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T. & Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, **32**, 551-553. <https://doi.org/10.1038/nbt.2884>
29. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X. *et al.* (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein and cell*, **6(5)**, 363-372. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
30. Le, T. K., Paris, C., Khan, K. S., Robson, F., Ng, W-L. & Rocchi, P. (2021). Nucleic acid-based technologies targeting coronaviruses. *Trends Biochemical Sciences*, **46(5)**, 351-365. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.010>
31. Santayana, G. (1906). *The Life of Reason: Introduction and Reason in Common Sense* (p. 172) London: Archibald Constable & CO. Ltd. <https://archive.org/details/thelifeofreasono00santuoft/page/n5/mode/2up>

650 a. C.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Espartanos</li> <li>•Infanticídio selectivo; primeiros intentos en la erradicación de las enfermedades hereditarias.</li> </ul>
370 a. C.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Platon</li> <li>•“La República”: Crianza selectiva.</li> </ul>
1859	<ul style="list-style-type: none"> <li>•C. Darwin</li> <li>•Origen de las especies: Evolución por selección natural.</li> </ul>
1865	<ul style="list-style-type: none"> <li>•F. Galton</li> <li>•Eugenesia</li> </ul>
1865	<ul style="list-style-type: none"> <li>•G. Mendel</li> <li>•Leyes de la herencia. Dominancia/Recesividad.</li> </ul>
1900	<ul style="list-style-type: none"> <li>•H. De Vries, C. Correns, E. Von Tschermak y W. Bateson</li> <li>•Redescubren las Leyes de Mendel. Términos de “genética” y “alelo.”</li> </ul>
1902	<ul style="list-style-type: none"> <li>•A. E. Garrod</li> <li>•Alcaptonuria como una enfermedad genética humana recesiva.</li> </ul>
1907-1949	<ul style="list-style-type: none"> <li>•EU, Alemania, Inglaterra...</li> <li>•Uso irracional de la eugenesia.</li> </ul>
1910	<ul style="list-style-type: none"> <li>•T. H. Morgan</li> <li>•Los genes se encuentran en los cromosomas.</li> </ul>
1944	<ul style="list-style-type: none"> <li>•O. T. Avery, C. McLeod y M. McCarty</li> <li>•DNA es el material genético.</li> </ul>
1953	<ul style="list-style-type: none"> <li>•J. Watson, R. Franklin y F. Crick</li> <li>•Estructura helicoidal del DNA.</li> </ul>
1961-66	<ul style="list-style-type: none"> <li>•S. Ochoa, M. Warren Nirenberg, H. Gobind Khorana entre otros</li> <li>•Código genético.</li> </ul>
1972	<ul style="list-style-type: none"> <li>•W. Fiers y colaboradores</li> <li>•Secuencia de un gen completo.</li> </ul>
1973	<ul style="list-style-type: none"> <li>•S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling</li> <li>•Tecnología de DNA recombinante.</li> </ul>
1983	<ul style="list-style-type: none"> <li>•K. B. Mullis</li> <li>•Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</li> </ul>
2003	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Se publica el borrador de los resultados finales del Proyecto Genoma Humano.</li> </ul>
2004-05	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Secuenciación de nueva generación (NGS).</li> </ul>
2012	<ul style="list-style-type: none"> <li>•J. Doudna y E. Charpentier</li> <li>•Sistema CRISPR-Cas9 de edición genómica.</li> </ul>
2015	<ul style="list-style-type: none"> <li>•P. Liang y colaboradores</li> <li>•Edición genética en cigotos humanos.</li> </ul>
2017	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Comercialización por primera vez de una terapia génica capaz de modificar los glóbulos blancos en pacientes con leucemia.</li> </ul>
2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Primeras vacunas de RNA para combatir la pandemia de la COVID19.</li> </ul>

Figura 1. Acontecimientos históricos en la erradicación de enfermedades genéticas.

# CAPÍTULO 2

## MAPEAMENTOS GENÉTICO, CITOGENÉTICO E DE SEQUENCIAMENTO DO FEIJÃO-FAVA: UMA REVISÃO

Data de aceite: 10/01/2022

### **André Oliveira Melo**

Departamento de Biologia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0001-6655-0476>

### **Marcones Ferreira Costa**

Universidade Federal do Piauí  
Floriano - Piauí  
<http://orcid.org/0000-0001-8210-2673>

### **Michelli Ferreira dos Santos**

Universidade Federal do Piauí  
Picos - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0001-7668-0864>

### **Verônica Brito da Silva**

Departamento de Fitotecnia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0001-7739-5061>

### **Maria Fernanda da Costa Gomes**

Universidade Estadual do Piauí  
São Raimundo Nonato - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0002-1089-8593>

### **Gleice Ribeiro Orasmo**

Departamento de Biologia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0002-4342-3287>

### **Lidiane de Lima Feitoza**

Departamento de Biologia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0001-7884-7058>

### **Lívia do Vale Martins**

Departamento de Biologia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0003-4645-9055>

### **Raimundo Nonato Oliveira Silva**

Universidade Federal do Piauí  
Floriano - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0002-9987-0043>

### **Ângela Celis de Almeida Lopes**

Departamento de Fitotecnia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0002-9546-5403>

### **Regina Lucia Ferreira Gomes**

Departamento de Fitotecnia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<https://orcid.org/0000-0002-7700-6959>

### **Sérgio Emílio dos Santos Valente**

Departamento de Biologia, Universidade  
Federal do Piauí  
Teresina - Piauí  
<http://orcid.org/0000-0003-2953-7330>

**RESUMO:** *Phaseolus lunatus* L. (feijão-fava ou feijão-lima) é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* L. mais exploradas comercialmente. O feijão-fava é uma fonte de emprego e renda para a população carente, além de ser uma importante fonte de proteínas, sendo usado tanto na alimentação humana como na ração para bovinos. Diante da sua reconhecida

importância, este trabalho realizou uma revisão bibliográfica, reunindo os principais trabalhos de diferentes pesquisas sobre mapeamentos genético, citogenético e sequenciamento do genoma do feijão-fava. Esses estudos foram separados em três categorias: (1) investigação da origem evolutiva e diversidade genética molecular, (2) mapeamento citogenético e de sequenciamento, e (3) melhoramento genético do feijão-fava. Estudos adicionais utilizando marcadores moleculares são necessários para analisar a diversidade inexplorada e para a identificação de genes associados a características agrônomicas de interesse dessa leguminosa economicamente importante.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diversidade Genética. Germoplasma. Marcadores moleculares. *Phaseolus lunatus*.

## GENETIC, CYTOGENETIC, AND SEQUENCING MAPPING OF FAVA BEANS: A REVIEW

**ABSTRACT:** *Phaseolus lunatus* L. (Fava beans, Lima beans), is one of the four most commercially exploited species of the *Phaseolus* L. genus. The Lima bean is an income generation for the low-income population; besides it is an important source of proteins used in human and animal nutrition. Because of its known importance, this work performed a bibliographical review, collecting the main works of different researches regarding to the genetic, cytogenetic and sequencing mapping of the fava bean genome. These works were separated into three categories: (1) investigation of evolutionary origin and molecular genetic diversity, (2) cytogenetic and sequencing mapping, and (3) genetic breeding of the fava bean. Additional studies using molecular markers are needed to analyze the unexplored diversity and the identification of genes associated with agronomic traits of interest of this economically important legume species.

**KEYWORDS:** Genetic Diversity. Germplasm. Molecular markers. *Phaseolus lunatus*.

## 1 | INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), popularmente conhecido por feijão-de-lima, fava-de-lima ou simplesmente fava, é superado, em termos de consumo e áreas cultivadas, apenas pelo feijão comum (*P. vulgaris* L.) (ARTEAGA *et al.*, 2018). No cenário mundial, o feijão-fava dispersou-se do seu local de origem, na região da Mesoamérica e dos Andes, para regiões subtropicais do globo (SERRANO-SERRANO *et al.*, 2010). Na América do Norte, os Estados Unidos são o maior produtor de feijão-fava no mundo. Na Europa, é cultivado em pequena escala nos países mediterrâneos (ARTEAGA *et al.*, 2018). No Brasil, o feijão-fava é produzido e comercializado por pequenos produtores na região Nordeste, sendo consumido na forma verde e madura (MORAES *et al.*, 2017).

Bonifácio *et al.* (2012) e Penha *et al.* (2016) destacam o potencial e a diversidade genética do feijão-fava e suas aplicações em programas de conservação e melhoramento genético dessa espécie. Penha *et al.* (2016) também ressaltam que, apesar da importância do feijão-fava, variedades melhoradas dessa leguminosa não são produzidas no Brasil, além de haver poucas informações sobre seu sistema de reprodução e da diversidade

genética existente.

O melhoramento genético atua diretamente na adaptabilidade e produtividade dos cultivos, sendo necessário o conhecimento detalhado da constituição genética das espécies (BERED; NETO; CARVALHO, 1997). Nesse contexto, estudos envolvendo a construção de mapas genéticos, citogenéticos e de sequenciamento têm sido bastante úteis na localização de genes que controlam características de importância morfoagronômica, sendo ferramentas-chave para o melhoramento genético de uma espécie-alvo (HA *et al.*, 2012; ANDARGIE *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2015).

Diante de sua reconhecida importância, o presente trabalho objetivou realizar uma revisão bibliográfica acerca dos mapas genéticos e citogenéticos disponíveis para *P. lunatus* e o recente sequenciamento do seu genoma, bem como sua aplicabilidade ao melhoramento genético, destacando as possíveis implicações dessas pesquisas, além de oferecer um panorama geral desses conhecimentos para futuras aplicações.

## 2 | METODOLOGIA

Este trabalho reuniu os principais conhecimentos acerca da genética, citogenética e genômica do feijão-fava obtidos por meio de marcadores moleculares e citogenéticos, a fim de determinar o seu panorama atual.

A busca pelos artigos foi realizada nas bases de dados Science Direct, Google Acadêmico, PubMed, Springer e biblioteca eletrônica Scientific Electronic Library Online (SCIELO). Foram utilizados os seguintes descritores: feijão-fava, marcadores moleculares, mapeamento genético, mapeamento citogenético, sequenciamento e melhoramento genético, *lima bean*, *molecular markers*, *genetic mapping*, *cytogenetic mapping*, *genetic breeding*, *sequencing* e *Phaseolus lunatus* L.

Fizeram parte da pesquisa os artigos que obedeceram aos seguintes critérios: estudos abordando dados genéticos e citogenéticos de feijão-fava, trabalhos utilizando marcadores moleculares e citogenéticos e estudos que oferecem conhecimentos relevantes para o seu panorama geral.

A partir desses trabalhos e seu compilado de informações, dividimos a revisão em três categorias: (1) investigação da origem evolutiva e diversidade genética molecular, (2) mapeamento citogenético e sequenciamento, e (3) melhoramento genético do feijão-fava. Para o entendimento da evolução do conhecimento obtido em cada categoria ao longo do tempo, os estudos selecionados foram postos, via de regra, em ordem cronológica, sendo cada estudo abordado separadamente.

### 31 MAPEAMENTO GENÉTICO, MAPEAMENTO CITOGENÉTICO E SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE PLANTAS

Diante da importância nutricional e alimentar das espécies vegetais no mundo todo e visando o desenvolvimento de espécies com maior rendimento e resistência a estresses bióticos e abióticos, como resistência a vírus e tolerância à seca, respectivamente, pesquisas genômicas têm sido voltadas ao melhoramento genético de plantas (VARSHNEY *et al.*, 2010; VARSHNEY, GRAMER; SORRELLS, 2005).

Nesse contexto, o desenvolvimento de mapas genéticos, citogenéticos e, mais recentemente, o sequenciamento do genoma de plantas têm se tornado abordagens genéticas clássicas e modernas cada vez mais utilizadas, permitindo a localização de regiões gênicas de interesse, sendo ferramentas-chave para o melhoramento genético vegetal, para o mapeamento genômico comparativo e para obtenção de um mapa de referência para a maioria das espécies vegetais.

Mapas genéticos disponíveis para espécies vegetais têm auxiliado a detecção de genes economicamente importantes. Vários tipos de marcadores podem ser utilizados na construção desses mapas, como: AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*; Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado), RAPDs (*Random Amplified Polymorphism DNA*; Fragmentos de DNA Amplificado ao Acaso), SSRs ou microsatélites (*Simple Sequence Repeats*; Sequências Simples Repetidas) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Polimorfismos de nucleotídeo único) (DURAN *et al.*, 2009; ZOLET *et al.*, 2017). Tais marcadores são importantes para o mapeamento genético e para a seleção assistida por marcador (WANG *et al.* 2006).

Essas marcas genéticas podem, ainda, ser associadas e integradas a cromossomos específicos (mapas citogenéticos ou físicos), permitindo a comparação das distâncias genéticas e físicas, a análise da distribuição de sequências repetitivas no genoma de determinada espécie, bem como a determinação da origem do seu genoma (MARTINS, 2020). Essas marcas correspondentes em cada grupo de ligação são utilizadas como sondas para Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), permitindo a sua integração e localização física nos cromossomos de espécies-alvo (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

O sequenciamento do genoma possibilitou a associação de marcas relacionadas a genes de interesse, permitindo a identificação e clonagem desses genes. Mapear o genoma de uma espécie é um processo relativamente oneroso e laborioso, sendo limitado a apenas algumas espécies vegetais. A primeira espécie a ter o genoma sequenciado e montado foi *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), em 2000, tornando-a um organismo-modelo para o estudo de organização genômica e evolução de plantas (SOUSA *et al.*, 2015; DASH *et al.*, 2016).

Com os avanços das tecnologias de sequenciamento, aliados à sua redução de custo e de tempo, o sequenciamento do genoma de espécies vegetais tem se tornado

cada vez mais acessível, aumentando a disponibilidade de dados para espécies economicamente importantes. Schneider *et al.* (2018) afirmaram que a redução dos custos de sequenciamento e o aumento do investimento em pesquisas relacionadas à Biologia Molecular tem relacionado o uso de marcadores moleculares a estudos cada vez mais específicos.

Estudos comparativos e evolutivos, assim como programas de melhoramento de espécies cultivadas, realizados com uso de marcadores moleculares, permitem avaliar sistematicamente a diversidade genética entre cultivares de uma espécie, construir mapas de ligação mais detalhados e selecionar marcadores associados a características morfológicas de interesse (ALMEIDA, 2006).

A herança de caracteres quantitativos é fundamental para pesquisas no campo da genética agrícola e evolutiva. Através de um mapa genético supersaturado, é possível localizar genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*; *Loci* de características quantitativas) associados a características morfoagronômicas de interesse, além de estudos comparativos de sintenia entre espécies, contribuindo para o entendimento acerca da evolução dos genomas de plantas (ANDARGIE *et al.*, 2013; POLANCO *et al.*, 2019). O número de *loci*, suas posições genômicas, suas interações genéticas e sua resposta a fatores bióticos ou abióticos estão entre os parâmetros utilizados para quantificar a arquitetura genética de características individuais.

Mais recentemente, os avanços nas técnicas de edição do genoma baseados em CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; Repetições palindrômicas curtas agrupadas e interespaçadas) aplicadas na agricultura possibilitam identificar características qualitativas e quantitativas de interesse, além da seleção de genitores (CHEN *et al.*, 2019).

## 4 | O FEIJÃO-FAVA

### 4.1 Descrição e taxonomia

O feijão-fava (*P. lunatus*) é distribuído do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, desde o nível do mar até aproximadamente 2.700m de altitude (DOHLE, 2017). Essa espécie é proximamente relacionada ao feijão comum (*P. vulgaris*) ambas pertencentes à subfamília Papilionoideae, família Leguminosae (AZANI *et al.*, 2017).

O gênero *Phaseolus* L. é um grupo monofilético de origem Mesoamericana, representado por espécies majoritariamente difundidas nos Andes e nas Américas Central e do Sul, sendo o México seu principal centro de diversidade (com 90% das espécies distribuídas), enquanto a Europa e o Brasil são considerados centros de diversificação secundários do grupo (LIOI; RIERGIOVANNI, 2015). Esse gênero é composto por cerca de 75 espécies subagrupadas em dois clados maiores e divididos em oito grupos, sendo: *Pauciflorius*, *Pedicellatus* e *Tuerckheimii* pertencentes ao clado A; e *Filiformis*,



Leptostachyus, Lunatus, Polystachios e Vulgaris pertencentes ao clado B. Pelo menos sete eventos independentes de domesticação ocorreram dentro do gênero, o que gerou o isolamento reprodutivo de cinco espécies domesticadas: *P. acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. polyanthus* Greeman, *P. lunatus* e *P. vulgaris*, sendo as duas últimas de maior destaque mundial (DELGADO-SALINAS; BIBLER; LAVIN, 2006; BITOCCHI *et al.*, 2017).

Delgado-Salinas, Bibler e Lavin (2006) sugerem que a diversificação das espécies de *Phaseolus* ocorreu por volta de 2 milhões de anos atrás. De acordo com Baudoin (1988) e Bitocchi *et al.* (2017), *P. lunatus* é uma espécie predominantemente autógama que inclui arbustos anuais determinados e escaladores indeterminados que são frequentemente perenes devido à sua raiz principal alargada.

## 4.2 Importância econômica

Os feijões do gênero *Phaseolus* são uma importante fonte nutricional, com cerca de 30% de proteínas presentes nos seus grãos, além de serem ricos em carboidratos, ácido fólico e sais minerais, como zinco, cálcio, magnésio e fósforo, dentre outros (USDA, 2015). São amplamente adaptados, de ciclo de vida curto, de fácil produção e de alto consumo, especialmente em países em desenvolvimento. Esses feijões constituem a principal fonte de subsistência para a população de baixa renda, devido ao seu alto valor proteico, além de serem uma fonte geradora de emprego e renda para as famílias carentes (BOUKAR *et al.*, 2016).

O feijão comum é uma das leguminosas de grãos com maior consumo mundial em termos de rendimento total e área cultivada, apresentando um papel importante na alimentação em países em desenvolvimento da África e das Américas Central e do Sul (GIOIA *et al.*, 2019). Dados mais recentes disponibilizados pela da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), relativos ao ano de 2018, indicam que a sua produção mundial foi estimada em cerca de 55 milhões de toneladas métricas (t) (FAO, 2020). O Brasil é considerado o principal produtor de grãos de feijão comum com alta qualidade fisiológica, com área total de 1,5 milhão de hectares (ha), com produção em cerca de 2,4 milhões de toneladas e produtividade média de 1.500 kg/ ha, sendo o estado de Goiás responsável por 37% da sua produção (EMBRAPA, 2021).

O feijão-fava, por sua vez, apresenta produção e produtividade inferiores quando comparado ao feijão comum. Na América do Norte, os Estados Unidos são o maior produtor de feijão-fava no mundo. Na Europa, é cultivado em pequena escala nos países mediterrâneos, principalmente na Espanha, onde é um ingrediente da tradicional “*paella*” (ARTEAGA *et al.*, 2018). No Brasil, os estados do Ceará e da Paraíba são uns dos maiores produtores nacionais de feijão-fava (IBGE, 2019). Algumas regiões apresentam baixos níveis de produção em relação à quantidade de recursos utilizados, principalmente devido à falta de programas de pesquisas sobre nutrição mineral (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em 2019, a produção nacional dessa leguminosa contabilizou 11.449 t (IBGE, 2019).

### 4.3 Mapeamento genético do feijão-fava

As pesquisas com feijão-fava que utilizam marcadores moleculares geralmente possuem três objetivos principais: (1) investigação da origem evolutiva e diversidade genética molecular, (2) mapeamento citogenético e sequenciamento, e (3) aplicações no melhoramento genético. Tal divisão não é exclusiva, o que significa que uma mesma pesquisa pode obter informações e conclusões afins a um ou mais objetivos. Os três pontos acima mencionados são detalhados a seguir.

#### 4.3.1 Origem evolutiva e diversidade genética molecular

Baseando-se em registros de exploradores e botânicos, Mackie (1943) propôs uma origem pré-colombiana para *P. lunatus*. Entretanto, mais informações seriam necessárias para confirmar tal hipótese. Nesse contexto, os avanços das técnicas de biologia molecular propiciaram ferramentas para a realização de estudos relativos à diversidade genética em espécies vegetais (DURAN *et al.*, 2009).

O estudo da evolução de uma espécie vegetal pode ser feito através de um mapa único de referência (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Desse modo, é possível entender a evolução de uma espécie com base nos dados genéticos obtidos de espécies evolutivamente próximas. No caso do feijão-fava, que sofreu domesticações desde os tempos pré-colombianos, a comparação das formas silvestres e cultivadas é de suma importância para a compreensão dos seus processos evolutivos.

A fim de compreender sua distribuição geográfica, Salgado, Gepts e Debouck (1995) analisaram as proteínas de sementes de feijão-fava silvestre e híbridos cultivados. Esses autores concluíram que as formas silvestres podem ser divididas em dois grupos: o primeiro, que possui sementes menores e uma área de distribuição que se estende desde o México, América Central à encosta oriental dos Andes; e o segundo, que possui uma distribuição mais circunscrita na costa oeste dos Andes no Equador e norte do Peru.

Análises da eletroforese de proteínas de sementes confirmaram essa subdivisão e mostraram que os cultivares de sementes grandes foram domesticados a partir de feijões-fava silvestres de sementes grandes no oeste da América do Sul. Lioi (1996) analisou a diversidade de feijão-fava silvestre utilizando a eletroforese da proteína faseolina e, a partir desses dados, sugeriu que a área de distribuição de formas selvagens Mesoamericanas de feijão-fava estende-se do México à Argentina; já as formas selvagens Andinas teriam uma distribuição mais limitada.

Maquet, Vekemans e Baudoin (1999) também realizaram análises comparativas de proteínas de sementes e investigaram as relações filogenéticas entre formas selvagens de feijão-fava e de outras espécies de *Phaseolus*, incluindo o feijão comum, de origem Mesoamericana e Andina. Os resultados sugerem que as espécies Mesoamericanas são filogeneticamente mais distantes do feijão-fava que as Andinas que, por sua vez, revelaram

grande semelhança com o *pool* gênico Mesoamericano de feijão-fava. Dessa forma, foi sugerida uma origem Andina para o feijão-fava e para as espécies selvagens Andinas, sendo candidatas a apresentarem genes de interesse para o melhoramento genético dessa cultura.

Serrano-Serrano *et al.* (2010), usando marcadores moleculares de DNA nuclear e de DNA não-codificante cloroplastidial, avaliaram a estrutura genética e a hipótese de uma origem Andina relativamente recente dessa espécie, conforme apontado por Delgado-Salinas, Bibler e Lavin (2006). Serrano-Serrano *et al.* (2010) analisaram uma coleção de feijão-fava silvestre, três espécies selvagens Andinas (*P. augusti* Harms, *P. pachyrrhizoides* Harms e *P. bolivianus* Piper) e três espécies Mesoamericanas (*P. leptostachyus* Bentham, *P. marechalii* Delgado e *P. novoleonensis* Debouck). Foram identificados 23 haplótipos de DNA não-codificante de cloroplasto e 28 haplótipos de DNA nuclear, sendo ambos bem estruturados com a distribuição geográfica. Os resultados corroboraram com a hipótese da origem Andina do feijão-fava silvestre na época do Pleistoceno e com uma divergência inicial de três *pools* gênicos que teriam evoluído e alcançado a distribuição geográfica atual, principalmente de forma isolada. Sendo assim, tais *pools* são importantes em programas de conservação e melhoramento (MAQUET; VEKEMANS; BAUDOIN, 1999).

Martínez-Castillo, Colunga-GarcíaMarín e Zizumbo-Villarreal (2008) usaram 90 marcadores SSRs para estimar a diversidade genética de 21 raças primitivas de espécies nativas de feijão-fava da Península de Yucatán no México, com o objetivo de analisar o risco de erosão genética e gerar dados moleculares aplicáveis à conservação *in situ*. Comparado ao *pool* genético silvestre, o *pool* genético domesticado apresentou menor diversidade genética e as variedades locais abundantes apresentaram uma diversidade genética mais baixa que as raças locais comuns e raras. Os dados moleculares confirmaram um alto risco de erosão genética para as raças de feijão-fava domesticado da Península de Yucatán e, por isso, precisam ser conservados *in situ*.

Martínez-Castillo *et al.* (2014) utilizaram 67 populações selvagens de feijão-fava mediante análise de 10 *loci* SSRs. Os resultados mostraram que a variação interpopulacional é maior que a variação intrapopulacional. Foi confirmada a existência de dois *pools* de genes (MI e MII) no México e, ainda, foi proposta a existência de dois subgrupos dentro de MI (MIa e MIb), confirmando que a estrutura genética do feijão-fava silvestre é mais complexa do que se pensava, sendo necessários mais estudos para a ratificação dos subgrupos MIa e MIb.

Andueza-Noh, Martínez-Castillo e Chacón-Sánchez (2015), a fim de avaliar a hipótese de dois eventos de domesticação para as raças indígenas Mesoamericanas com sementes pequenas, caracterizaram 62 acessos de feijão-fava domesticados, 87 selvagens e seis invasores com 10 *loci* SSRs. Os resultados sugerem que houve pelo menos um evento de domesticação na área do *pool* MI no centro-oeste do México e que algumas raças locais são geneticamente relacionadas a acessos selvagens do *pool* MII.

Os autores não conseguiram estabelecer, contudo, o local específico de origem das raças indígenas Mesoamericanas de feijão-fava. Entretanto, os resultados sugerem que essas raças não compõem um grupo geneticamente homogêneo, o que indica a ocorrência de mais de um evento de domesticação e múltiplos eventos de introgressão. Dessa forma, é necessária uma amostragem maior em áreas da América Central, especialmente em Honduras, Nicarágua e Panamá, no norte da América do Sul, além de mais dados do genoma desses acessos para ampliarmos o conhecimento a respeito dos processos de domesticação dessa espécie.

Chacón-Sánchez e Martínez-Castillo (2017) analisaram a estrutura genética do *pool* de genes selvagens de feijão-fava na Mesoamérica por meio de marcadores SNPs. Analisou-se dois eventos de domesticação para MI e MII separadamente, e um evento de domesticação do *pool* gênico MI sucedido por um fluxo gênico com populações selvagens. Os marcadores SNPs também foram usados para avaliar a estrutura genética do feijão-fava, o efeito de sua domesticação na diversidade genética e a detecção de genes candidatos à domesticação. Os resultados confirmaram a existência dos três *pools* de genes de feijão-fava: dois Mesoamericanos (MI e MII) e um Andino (AI), o que corrobora com as informações obtidas por Martínez-Castillo *et al.* (2014). Ainda, foi proposta a possibilidade da existência de outro *pool* gênico Andino (AII) no centro da Colômbia. Quanto aos possíveis cenários de domesticação, um único evento de domesticação do *pool* gênico MI seguido pela mistura com populações selvagens mostrou-se estatisticamente mais provável. As análises genéticas para domesticação indicam o envolvimento de efeitos fundadores, que resultaram na perda da diversidade genética e aumento do desequilíbrio de ligação (LD) nas raças locais. Além disso, as regiões genômicas relacionadas à domesticação dessa espécie foram detectadas.

Penha *et al.* (2016) buscaram estimar as taxas de cruzamento natural e os níveis de diversidade genética de *P. lunatus* var. *lunatus*, variedade botânica domesticada de feijão-fava do Brasil, por meio de 10 *loci* SSRs, a fim de obter informações para sua conservação e melhoramento. Os resultados mostraram que o feijão-fava brasileiro possui uma taxa de cruzamento natural de 38,1%, o que indica a predominância de autofecundação em um sistema de cruzamento misto. A maioria dos cruzamentos ocorreu entre parentes, gerando irmãos completos, meios-irmãos e irmãos que se autofecundam. Segundo os autores, as implicações dos resultados afetam positivamente os programas de melhoramento, uma vez que as altas taxas de cruzamento aceleram a geração de novas linhagens de variedades melhoradas. Entretanto, as implicações para os programas de conservação estão relacionadas à multiplicação e regeneração do material em bancos de germoplasma, que devem ser realizadas sob condições controladas visando evitar a troca de pólen entre as plantas. Além disso, um grande tamanho de amostra é necessário para reter o máximo de diversidade para a conservação *ex situ*. Ainda, percebeu-se que a diversidade de feijão-fava no Brasil é maior que a encontrada em outras regiões da América e comparável

à observada em populações selvagens da Península de Yucatán, no México, que é considerada o centro de diversidade genética de feijão-fava.

Gomes *et. al.* (2019) analisaram a diversidade genética de 153 acessos de feijão-fava, a fim de criar uma coleção nuclear de feijão-fava do Banco Ativo de Germoplasma de *P. lunatus* da Universidade Federal do Piauí (BGP-UFPI), já que bancos de germoplasma com alta variabilidade são excelentes recursos para o estudo da diversidade de uma espécie e para evitar sua erosão genética. Para isso, foram usados 11 marcadores SSRs, gerando um total de 113 alelos com média de 10,27 alelos por *locus*. Os resultados indicaram que esses mesmos alelos poderiam ser representados por um mínimo de 34 dos 153 acessos de feijão-fava, podendo formar uma coleção nuclear representada por 22% dos acessos do BGP-UFPI, com baixa redundância. A avaliação da coleção nuclear indicou que as culturas representativas possuem maior índice de diversidade que a coleção inteira do banco de germoplasma. Os autores concluem que a coleção nuclear irá auxiliar os estudos das variações morfológicas de interesse agrônomo, estudos de campo e estudos de associação genômica com feijão-fava, mas advertem que essa deve ser atualizada periodicamente, incluindo germoplasmas de feijão-fava adicionais na coleção de base, examinando sua resistência a doenças e à seca.

#### 4.3.2 Mapeamento citogenético

A citogenética é uma ferramenta valiosa para caracterização da diversidade dos recursos genéticos vegetais. A análise de cariótipos envolvendo o número, morfologia e tamanho dos cromossomos, presença de constrição secundária e quantidade de heterocromatina são informações importantes para comparar espécies ou detectar polimorfismos entre cromossomos homólogos e não homólogos de indivíduos da mesma espécie ou entre homeólogos de espécies relacionadas (MOSCONI; LAMBROU; EHRENDORFER, 1996). Esses dados, associados a outras características citológicas, têm se mostrado importantes para o reconhecimento de variedades, híbridos e poliploides e na compreensão das relações filogenéticas dentro e entre táxons (GUERRA, 2000).

Os primeiros relatos sobre o número cromossômico em *Phaseolus* ocorreram em 1925, por Karpechenko, que obteve  $2n = 22$  para as espécies de feijão comum (*P. vulgaris*), feijão escarlata (*P. coccineus*), feijão-fava (*P. lunatus*) e feijão tepário (*P. acutifolius*). Dessa forma, estabeleceu-se  $x = 11$  como o número básico de cromossomos do gênero (MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 2000). Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas (2000) realizaram uma revisão bibliográfica de estudos citogenéticos no gênero *Phaseolus* e das diferentes hipóteses para explicar as alterações cromossômicas nesse gênero. Reduções no número cromossômico foram relatadas em três espécies relacionadas do gênero: *P. leptostachyus*, *P. micranthus* Hook. & Arn. e *P. macvaughii* A. Delgado, todos com  $2n = 2x = 20$  cromossomos, sendo essa redução causada por eventos de displóidia

descendente (MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 2000; FONSÊCA; FERRAZ; PEDROSA-HARAND, 2016).

Com o surgimento da técnica de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente), foi possível integrar marcadores genéticos a cromossomos específicos. As sequências de DNA comumente utilizadas como sondas em FISH são: DNA altamente repetitivo em tandem, como os sítios de DNA ribossomais (DNAr) 5 e 35S; sequências centroméricas; teloméricas; repetitivas dispersas, como os elementos transponíveis; e sequências repetitivas e cópia-única inseridas em vetores, como plasmídeos, cosmídeos, Cromossomos Artificiais de Leveduras (YACS) e de Bactérias (BACs) (GUERRA, 2004; JIANG; GILL, 2006).

Estudos citogenéticos moleculares têm sido conduzidos em espécies dos gêneros *Phaseolus*, utilizando como sondas sítios de DNAr (GUERRA *et al.*, 1996; MOSCONE *et al.*, 1999; PEDROSA-HARAND *et al.*, 2009), DNA centromérico, sequências teloméricas (IWATA-OTSUBO *et al.*, 2016), DNA satélite (RIBEIRO *et al.*, 2019) e BACs (PEDROSA-HARAND *et al.*, 2009; BONIFÁCIO *et al.*, 2012; ALMEIDA; PEDROSA-HARAND, 2013).

Lioi e Galasso (2002) investigaram polimorfismos em genótipos selvagens e cultivados de feijão-fava oriundas de *pools* gênicos Mesoamericanos e Andinos e de formas intermediárias. Foram utilizados oligonucleotídeos (oligos), marcados com digoxigenina, como sondas para FISH. Cinco dos marcadores utilizados, (AAT)<sub>5</sub>, (ATG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, exibiram bandas bem definidas e que revelaram altos níveis de variação intraespecífica, sendo uma ferramenta útil para a análise da diversidade genética em feijão-fava.

Almeida (2006) estudou a evolução cariotípica de feijão-fava e do feijão comum através da distribuição de heterocromatina e do número de sítios de DNAr 5S e 35S em acessos Mesoamericanos e Andinos de ambas as espécies e construiu um mapa citogenético comparativo baseado nos padrões de localização e distribuição de sítios DNAr e de regiões heterocromáticas [CMA/DAPI (Cromomicina A<sub>3</sub>/ 4' 6'-diamidino-2-fenilindol)]. Em ambas as espécies, a heterocromatina está geralmente localizada na região pericentromérica da maioria dos cromossomos. O feijão-fava apresentou um par de sítios 35S, enquanto o feijão comum apresentou dois pares em todos os acessos analisados.

Almeida e Pedrosa-Harand (2011) determinaram a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 35S em 17 acessos de feijão-fava pertencentes a diferentes centros de domesticação. Os cromossomos de *P. lunatus*, assim como os de *P. vulgaris*, possuem sítios de DNAr 35S localizados no cromossomo 6. Através de análises adicionais por BAC-FISH, foi observado que o cromossomo 6 é conservado entre as espécies previamente analisadas (*P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. microcarpus* e *P. leptostachyus*), sendo considerado o provável cromossomo ancestral dentro do gênero (ALMEIDA; PEDROSA-HARAND, 2013; FONSÊCA; FERRAZ; PEDROSA-HARAND, 2016).

O mapa físico do feijão comum foi primeiramente realizado por Pedrosa-Harand *et al.* (2009). Os autores mapearam fisicamente três cromossomos dessa espécie, sendo

posteriormente estabelecido por Fonsêca, Ferraz e Pedrosa-Harand (2016), que mapearam os sete pares cromossômicos restantes. Em seguida, a biblioteca de sondas BACs de *P. vulgaris* foi utilizada em estudos carioevolutivos em diferentes espécies do gênero, incluindo *P. lunatus*.

Bonifácio *et al.* (2012) realizaram uma análise comparativa entre os cromossomos do feijão-fava e do feijão comum usando BACs de feijão comum como sondas para FISH, que foram mapeados nos cromossomos do feijão-fava, permitindo estabelecer homeologias cromossômicas e os mecanismos evolutivos que moldaram os cariótipos analisados. Também foram mapeados os sítios de DNAr 5S e 35S, sequências repetitivas contidas em BACs e regiões de heterocromáticas por coloração CMA/DAPI. Corroborando com Almeida (2006), sete dos 22 BACs selecionados de diferentes cromossomos de feijão comum não puderam ser mapeados, pois demonstraram padrões pericentroméricos repetitivos no feijão-fava. Todos os cromossomos puderam ser identificados através de 16 clones de BACs cópia-única. Na maioria das extremidades cromossômicas do feijão comum, foi encontrado um padrão repetitivo subtelomérico, o que não ocorreu com o feijão-fava, apontando falta de conservação dessa repetição subtelomérica. Os resultados indicam alta conservação da macrossintenia (conservação de blocos cromossômicos entre espécies) e colinearidade (manutenção da ordem desses blocos cromossômicos entre espécies) envolvendo os 11 pares cromossômicos entre as espécies analisadas, apesar das diferenças que sugerem ocorrência de inversões pericêntricas nos cromossomos 2, 9 e 10. A pequena quantidade de rearranjos estruturais indica, portanto, alta estabilidade cariotípica do gênero *Phaseolus*.

Posteriormente, Almeida e Pedrosa-Harand (2013) construíram um mapa citogenético comparativo dos cromossomos 3, 4 e 7 do feijão comum e do feijão-fava usando 30 BACs e dois bacteriófagos. Nove BACs apresentaram um padrão repetitivo de DNA com distribuição pericentromérica. Vinte e três BACs cópia-única do feijão comum foram mapeados nos cromossomos 3 (9 BACs), 4 (8 BACs) e 7 (6 BACs) do feijão-fava, ratificando a alta sintenia e colinearidade previamente encontrada entre o feijão comum e o feijão-fava, sendo as principais diferenças cariotípicas associadas à fração repetitiva do DNA.

### 4.3.3 Sequenciamento do genoma

Durante os últimos anos, os avanços das pesquisas genômicas suportadas pelas plataformas de bioinformática e de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram um progresso nos estudos citogenéticos moleculares de sintenia e evolução cromossômica em plantas (CHÈVRE *et al.*, 2018).

Dentre as espécies de *Phaseolus*, o genoma de *P. vulgaris* (~587 Mb) foi o primeiro a ser publicado, mediante abordagem combinada pelas plataformas Roche 454, Illumina e Sanger (SCHMUTZ *et al.*, 2014). Posteriormente, Lobaton *et al.* (2018) ressequenciaram

o genoma inteiro de 35 variedades cultivadas e elites de *P. vulgaris* pertencentes a diferentes programas de melhoramento genético do gênero, bem como de *P. acutifolius* e *P. coccineus*. Os resultados permitiram identificar diferenças de variação genética entre e dentro espécies fornecendo, assim, informações valiosas para programas de melhoramento genético voltados para as espécies do gênero.

Recentemente, Garcia *et al.* (2021) sequenciaram e montaram o genoma (542 Mb) de um acesso de feijão-fava domesticado do *pool* genético MI coletado na Colômbia, mediante sequenciamento Pacific Biosciences e Illumina, além do sequenciamento do genoma completo (WGS), 10X Genomics, GBS (*Genotyping by Sequencing*; Genotipagem por sequenciamento) e sequenciamento de RNA (RNA-seq) associada à montagem do transcriptoma *de novo*. Dos ~28.500 genes anotados, 1.917 genes foram particularmente relacionados à resistência a fatores bióticos, além de identificação de 4.275 genes diferencialmente expressos que podem estar relacionados à deiscência da vagem e ao desenvolvimento das sementes. A montagem de alta qualidade do genoma de *P. lunatus* fornece, portanto, suporte e aplicabilidade para programas de melhoramento genético voltados ao gênero *Phaseolus*.

A comparação estrutural entre 22.180 genes ortólogos de feijão-fava com feijão comum corroborou a alta sintonia apontada por Bonifácio *et al.* (2012) e Almeida e Pedrosa-Harand (2013) e revelou cinco rearranjos cromossômicos: (1) inversão de 5 Mb no braço longo do cromossomo 3 de *P. luntatus* (PI03); (2) inversão de 10 Mb no braço longo do cromossomo PI07; (3) translocação complexa dentro do braço curto do cromossomo PI09; (4) inversão do braço curto do cromossomo PI10; (5) translocação da região pericentromérica do cromossomo 2 de *P. vulgaris* (Pv02) dentro do braço curto do cromossomo PI02. Esses resultados também sugerem que há uma organização em seis grupos com distribuições não sobrepostas e que as raças locais mesoamericanas podem ser subdivididas em três subaglomerados. Além disso, foram estabelecidas associações de *loci* genéticos com características relevantes para os processos de domesticação e melhoramento em feijão-fava.

Os dados obtidos por Garcia *et al.* (2021) são de interesse para todos os três objetivos de pesquisa abordados neste trabalho, uma vez que suas informações e conclusões contribuem para um maior entendimento da evolução e diversidade de *Phaseolus*, para o mapeamento genético de feijão-fava e também para o melhoramento genético do gênero, com ênfase em *P. lunatus*.

#### 4.4 Melhoramento genético

Tecnologias capazes de identificar e selecionar genes que codificam características de interesse econômico têm revolucionado a agricultura (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010). Um exemplo disso são os estudos que avaliaram a resistência de feijão-fava a fatores abióticos, pragas e doenças.



Mhora *et al.* (2016) utilizaram GBS para obter 12 marcadores associados ao fenótipo de resistência à raça F de *Phytophthora phaseoli*, um oomiceto causador de míldio, em feijão-fava. Usando os marcadores específicos para alelo Kompetitive (KASP), foi possível mapear sete *loci* de resistência à raça F de *P. phaseoli* em 256 acessos de feijão-fava. Os ensaios utilizados obtiveram sucesso na genotipagem do painel de diversidade do feijão-fava e de um haplótipo com dois dos sete marcadores ligados, confirmando a funcionalidade dos métodos aplicados para prever os fenótipos de resistência do feijão-fava à raça F de *P. phaseoli*. Os autores apontam para a possibilidade da existência de mais de um gene de resistência à *P. phaseoli* e propõem que seu uso em conjunto, a fim de gerar uma resistência mais duradoura nos acessos de feijão-fava. Além disso, ao mapear esses *loci* no genoma do feijão comum, ratificou-se a alta colinearidade com o feijão-fava (Almeida e Pedrosa-Harand, 2013). Esses dados podem auxiliar programas de melhoramento genético dessa espécie, tanto em relação à pragas quanto a condições ambientais de estresse.

Preocupados com as consequências das mudanças climáticas para a agricultura e visando entender melhor a resposta do feijão-fava a tais mudanças, Martínez-Nieto *et al.* (2020) compararam as características e a adaptabilidade das sementes de três cultivares tradicionais valencianas locais ('Pintat', 'Ull de Perdiu' e 'Cella Negra') e um comercial (denominada 'Peru') de feijão-fava no processo germinativo, submetidas a estresses ambientais (temperatura e estresse hídrico). Para calcular o polimorfismo e a divergência entre os cultivares estudados, foram usados oito marcadores moleculares. Os resultados mostraram que a raça tradicional 'Pintat' apresentou significativa competitividade em relação à cultivar comercial 'Peru' quanto a tolerância à temperatura e à seca. Utilizando uma relação entre a porcentagem e o tempo médio de germinação, a temperatura de 30 °C foi considerada ideal para o grupo de cultivares estudados. Os autores também investigaram uma possível correlação entre as características genéticas e as respostas de germinação das cultivares. Porém, a técnica DNA *barcoding* não encontrou diferenças genéticas entre as raças valencianas. Os autores propõem que as diferentes respostas dessas raças geneticamente próximas podem ser explicadas por mecanismos epigenéticos ou por alguns genes que desempenham um papel relevante nas respostas aos estresses.

Algumas doenças transmitidas por insetos geram prejuízos em quantidade e qualidade para espécies cultivadas do gênero *Phaseolus*. Agarwal *et al.* (2021) avaliaram o feijão comum e feijão-fava em relação à resistência à doença do crumple da folha causada por dois begomovírus transmitidos pela mosca branca (*Bemisia tabaci*): o vírus do crumple da folha da cucurbitácea (CuLCrV) e o vírus do mosaico dourado sida da Flórida (SiGMFV). Foram examinados 82 genótipos de feijão comum e dois de feijão-fava para resistência contra CuLCrV e/ou SiGMFV. Desses, 20 apresentaram níveis altos a moderados de resistência a CuLCrV e/ou SiGMFV, sendo 21 considerados altamente suscetíveis. O sequenciamento permitiu identificar 645.729 SNPs, 30.169 inserções e 38.543 deleções

distribuídos nos 11 cromossomos dessas espécies, sendo o cromossomo 2 (49,67 Mb) com maior número de variantes (73.326). Segundo os autores, os dados obtidos serão úteis em estudos futuros de associação do genoma para identificar a base genética da resistência ao begomovírus em espécies do gênero *Phaseolus*.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Marcadores moleculares e citogenéticos apresentaram uma grande importância nos estudos de feijão-fava. No que tange à origem evolutiva e à diversidade genética dessa espécie, as pesquisas corroboram a hipótese de uma origem Andina na época do Pleistoceno e sugerem a existência de dois *pools* gênicos Mesoamericanos (MI e MII) e dois Andinos (AI e AII). A diversidade de feijão-fava, apesar de ser afetada negativamente pela erosão genética, ainda pode ser bastante explorada por estudos filogenéticos usando marcadores moleculares, a fim de descobrir novas variações e desenvolver variedades melhoradas, principalmente no Brasil, que possui um potencial ainda pouco explorado.

A construção de mapas citogenéticos e o sequenciamento do genoma do feijão-fava elucidaram os mecanismos genéticos/genômicos responsáveis pela separação das linhagens de feijão-fava e feijão comum. As aplicações de melhoramento genético forneceram dados para a identificação de genes relacionados à resistência a fatores bióticos e abióticos, além de propor novos meios na identificação dos acessos de feijão-fava mais resistentes.

Diante disso, é necessário dar continuidade a trabalhos utilizando abordagens baseadas em mapas citogenéticos, sequenciamento e marcadores moleculares para identificar genes associados com características de interesse em *P. lunatus*. É necessária, portanto, a preservação dessa diversidade genética em bancos de germoplasma, além de realizar estudos que explorem a diversidade genética do feijão-fava.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, G. *et al.* Field screen and genotyping of *Phaseolus vulgaris* against two begomoviruses in Georgia, USA. **Insects**, v. 12, n. 1, p. 49, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects12010049>. Acesso em: 22 de jun. 2021.

ALMEIDA, C. C. S. **Mapeamento físico e análise evolutiva em *Phaseolus vulgaris* L. e *P. lunatus* L., utilizando hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/2108>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 3, p. 212-217, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21063080/>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1909-1916, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2106-9>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

ANDARGIE, M. *et al.* Quantitative trait loci analysis of flowering time related traits identified in recombinant inbred lines of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Genome**, v. 56, n. 5, p. 289-294, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0028>. Acesso em: 10 de out. 2021.

ANDUEZA-NOH, R. H.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Domestication of small-seeded lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in Mesoamerica: evidence from microsatellite markers. **Genetica**, v. 143, n. 6, p. 657-669, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10709-015-9863-0>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35048692>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

ARTEAGA, S. *et al.* Screening for salt tolerance in four local varieties of *Phaseolus lunatus* from Spain. **Agriculture**, v. 8, n. 12, p. 201, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/8/12/201/htm>. Acesso em: 17 de jun. 2021.

AZANI, N. *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.12705/661.3>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: GEPTS, P. (ed.). **Genetic resources of Phaseolus bean**. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1988. v. 6, p. 393-407. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5_16). Acesso em: 22 de mai. 2021.

BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, p. 513-520, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781997000300026>. Acesso em: 15 de mai. 2021.

BITOCCHI, E. *et al.* Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 722, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5420584/>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

BONIFÁCIO, E. M. *et al.* Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 8, p. 1513-1520, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1806-x>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

BOUKAR, O. *et al.* Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 757, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00757/full>. Acesso em: 10 de out. 2021.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052002000200002>. Acesso em: 19 jun. 2021.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 149-164, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300010>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Testing domestication scenarios of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mesoamerica: insights from genome-wide genetic markers. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1551, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01551>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

CHEN, K. *et al.* CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 667-697, 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

CHÈVRE, AM. *et al.* Cytogenetics, a science linking genomics and breeding: The *Brassica* Model. In: Liu S, Snowdon R, Chalhoub B (eds) **The *Brassica napus* Genome**. Compendium of Plant Genomes. Springer Nature, Switzerland, pp 21–39, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43694-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43694-4_2). Acesso em: 05 de nov. 2021.

DASH, S. *et al.* Legume information system (LegumeInfo.org): a key component of a set of federated data resources for the legume family. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1181-D1188, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1159>. Acesso em: 10 de out. 2021.

DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, M. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. **Systematic Botany**, v. 31, n. 4, p. 779-791, 2006. Disponível em: <https://sci-hub.ee/10.1600/036364406779695960>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

DOHLE, S. **Development of Resources for Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Breeding and Genetics Research**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Faculdade de Ciências Biológicas, University of California, Davis, 2017. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/2dab14414d90935a5653893bec9ba9cd/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

DURAN, C. *et al.* Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. **Current Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 16-27, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157489309787158198>. Acesso em: 15 de mai. 2021.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2021. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 09 de nov. 2021.

FAOSTAT, **Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2020. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 09 de nov. 2021.

FONSÊCA, A.; FERRAZ, M. E.; PEDROSA-HARAND, A. Speeding up chromosome evolution in *Phaseolus*: multiple rearrangements associated with a one-step descending dysploidy. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 413-421, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0548-3>. Acesso em: 10 de out. 2021.

GARCIA, T. *et al.* Comprehensive genomic resources related to domestication and crop improvement traits in Lima bean. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7846787/>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

GIOIA, T. *et al.* Evolution of SSR diversity from wild types to US advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211342, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0211342>. Acesso em: 10 de out. 2021.

GOMES, R. L. F. *et al.* A lima bean core collection based on molecular markers. **Scientia Agricola**, v. 77, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0140>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and molecular biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-4757200000400049>. Acesso em: 10 de out. 2021.

GUERRA M. **Hibridização In Situ: Princípios Básicos. FISH – conceitos e aplicações na citogenética**, 2004. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, pp 1–33.

HA, J. *et al.* Integration of the draft sequence and physical map as a framework for genomic research in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.). **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 2, n. 3, p. 321-329, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/g3journal/article-abstract/2/3/321/6026048>. Acesso em: 10 de out. de 2021.

IBGE, **Banco de dados agregados: pesquisa: produção agrícola municipal**, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acesso em: 26 de jul. de 2021.

IWATA-OTSUBO, A. *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH)-based karyotyping reveals rapid evolution of centromeric and subtelomeric repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and relatives. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 4, p. 1013-1022, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/g3.115.024984>. Acesso em: 10 de out. 2021.

LIOI, L. Phaseolin diversity in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in American centres of origin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 43, n. 6, p. 575-579, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00138834>. Acesso em: 22 de jun. 2021.

LIOI, L.; GALASSO, I. Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, p. 53-58, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1013809915096>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

LIOI, L.; RIERGIOVANNI, A. R. Common bean cultivation in the Mediterranean Basin. **Legume Perspect**, v. 10, p. 22-24, 2015.

MACKIE, W. Origin, dispersal, and variability of the lima bean, *Phaseolus lunatus*. **Hilgardia**, v. 15, n. 1, p. 1-29, 1943. Disponível em: <http://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v15n01p001>. Acesso em: 22 de jun. 2021.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X.; BAUDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, n. 1, p. 43-54, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01087033>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J. *et al.* Genetic structure within the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 851-864, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24778203/>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; COLUNGA-GARCÍAMARÍN, P.; ZIZUMBO-VILLARREAL, D. Genetic erosion and *in situ* conservation of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces in its Mesoamerican diversity center. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 7, p. 1065-1077, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10722-008-9314-1>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

MARTÍNEZ-NIETO, M. I. *et al.* Resilience capacity assessment of the traditional Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) landraces facing climate change. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 758, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/6/758/htm#B22-agronomy-10-00758>. Acesso em: 22 de jun. 2021.

MARTINS, L. V. **Mapeamento comparativo entre espécies de *Vigna savi* e *Phaseolus vulgaris* L. Mediante BAC- e oligo-FISH**. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Cytogenetic studies in *Phaseolus* L. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 985-987, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-4757200000400043>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

MHORA, T. T. *et al.* Genotyping-by-sequencing to predict resistance to lima bean downy mildew in a diversity panel. **Phytopathology**, v. 106, n. 10, p. 1152-1158, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0087-FI>. Acesso em: 22 de mai. 2021.

MORAES, C. S. *et al.* **Catálogo de fava (*Phaseolus lunatus* L.) conservada na Embrapa**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 2017. 46p.

MOSCONE, E. A.; LAMBROU, M.; EHRENDORFER, F. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of Capsicum (Solanaceae). **Plant systematics and evolution**, v. 202, n. 1, p. 37-63, 1996.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 543-546, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/hb/a/SN4cpfzY4GGYL5cTFDvRXdX/?lang=pt>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

PEDROSA-HARAND, A. *et al.* Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. **Chromosome Research**, v. 17, n. 3, p. 405-417, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9031-4>. Acesso em: 10 de out. 2021.

PENHA, J. S. *et al.* Estimation of natural outcrossing rate and genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L. var. *lunatus*) from Brazil using SSR markers: implications for conservation and breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 6, p. 1355-1364, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0441-9>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

POLANCO, C. *et al.* Construction of a high-density interspecific (*Lens culinaris* x *L. odemensis*) genetic map based on functional markers for mapping morphological and agronomical traits, and QTLs affecting resistance to Ascochyta in lentil. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0214409, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214409>. Acesso em: 10 de out. 2021.

RIBEIRO, T. *et al.* Diversity of repetitive sequences within compact genomes of *Phaseolus* L. beans and allied genera *Cajanus* L. and *Vigna Savi*. **Chromosome Research**, v. 28, n. 2, p. 139-153, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09618-w>. Acesso em: 10 de out. 2021.

SALGADO, A. G.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Evidence for two gene *pools* of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 15-28, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02310680>. Acesso em: 22 de jun. 2021.

SCHMUTZ, L. *et al.* A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics** v. 46, p.707–713, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng.3008>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCHNEIDER, T. *et al.* Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.17, n.1, p.12-24, 2018. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1092560/1/ID443442018v17n1p12RBH.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2021.

SERRANO-SERRANO, M. L. *et al.* Gene *pools* in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: evidences for an Andean origin and past migrations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 76-87, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.028>. Acesso em: 20 de mai. 2021.

SOUSA, C. C. *et al.* Genetic map of cotton with molecular markers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 2, p. 289, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.62033>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. **Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana***. Nature, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35048692>. Acesso em: 10 de out. 2021.

USDA. **United States Department of Agriculture**. 2015. Disponível em: <https://www.usda.gov/>. Acesso em: 10 de out. 2021.

VARSHNEY, R. K. *et al.* More genomic resources for less-studied crops. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 452-460, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.06.007>. Acesso em: 10 de out. 2021.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **Trends in plant science**, v. 10, n. 12, p. 621-630, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.004>. Acesso em: 10 de out. 2021.

WANG, C. *et al.* Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Gossypium raimondii* Ulbrich. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 5, p. 557-561, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-006-0557-y>. Acesso em: 15 de mai. 2021.

ZOLET, A. C. T. *et al.* **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206114/001056131.pdf?sequence=1>. Acesso em: 17 de mai. 2021.

# CAPÍTULO 3

## GENETICS AND EDUCATION: OVER 50 YEARS GENERATING COLLABORATIONS, BUILDING BRIDGES AND WEAVING NETWORKS IN ENDLESSLY TURBULENT SCENARIOS

*Data de aceite: 10/01/2022*

**Alberto Sergio Fenocchio**

**Verónica Graciela Teza**

**ABSTRACT:** The events that happen in society have a direct impact on the so-called “productive” sectors. Assuming this statement as true and following chronologically the history of Argentina from the 70s to the present date, it is possible to confirm that times of crisis offer OPPORTUNITIES. Despite this, the crises hide THREATS that, as in the case of the university career with a “Licentiate Degree (=Bachelor’s Degree) in Genetics, have been shown to be those forces that oppose changes due to the rigidity of circumstantial authorities, professional groups that have been threatened in their areas performance and even by people little affected by the development of innovations if they do not arise from their own aulic circle. The Degree in Genetics began to be offered in 1975, within a society shocked by violence in a newly created Universidad Nacional de Misiones, a true “patchwork”, a fact that unmasked the WEAKNESSES, the almost non-existent infrastructure and support structure necessary for the immense effort that represents the creation of a new career, in a peripheral geographic location (northeast of the country) that threatened the centralist paradigm that still characterizes Argentina today. Faced with the constant attacks launched for about 20 years at the attempt, which did not arise from or in the “central” country, spiritual, immaterial, and professional FORCES emerged in a group

of professors and researchers who gathered support from provincial, national institutions, including international, especially Brazilian, public and private.

**RESUMO:** Os acontecimentos que acontecem na sociedade tem impacto direto sobre os setores ditos “produtivos”. Assumindo essa afirmação como verdadeira e seguindo cronologicamente a história da Argentina desde os anos 70 até a presente data pode-se comprovar que os tempos de crise oferecem OPORTUNIDADES. Apesar disto, as crises ocultam AMEAÇAS que, como no caso da carreira universitária de grau “Licenciatura (=Bacharelado) em Genética, tem se mostrado como aquelas forças que se opõem às mudanças pela rigidez das autoridades circunstanciais, grupos profissionais que vem ameaçadas suas áreas de atuação e ainda por pessoas pouco afetadas ao desenvolvimento de inovações se elas não surgem do seu próprio círculo áulico. A Licenciatura em Genética começou a ser oferecida em 1975, no seio de uma sociedade comocionada pela violência em uma recém criada Universidad Nacional de Misiones, verdadeira “colcha de retalhos”, fato que desmascarou as DEBILIDADES, a quase inexistente infraestrutura e estrutura de sustentação necessária para o imenso esforço que representa a criação de uma nova carreira, em uma localização geográfica periférica (nordeste do país) que ameaçava o paradigma centralista que ainda hoje caracteriza à Argentina. Perante os constantes ataques desferidos durante uns 20 anos à tentativa, que não surgiu do e nem no país “central”, surgiram as FORÇAS espirituais, imateriais, e



profissionais encarnadas num grupo de docentes e pesquisadores que recolheram apoio de Instituições provinciais, nacionais, inclusive internacionais, especialmente brasileiras, públicas e privadas, alicerçando as bases para que hoje na Argentina haja três carreiras universitárias de graduação em Genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Docência, Interação, Sinergia.

The Francisco Conference Sáez is a fixed activity in each Congress of the Argentine Society of Genetics, its name is due to the fact that Prof. Dr. Francisco Sáez has been considered the first cytogeneticist in Latin America.

Due to the nuances of chance he, Uruguayan by birth, developed his studies and worked most of his life in Argentina and was a student and graduate of the Universidad Nacional de La Plata also teaching at the universities of La Plata and Buenos Aires (UBA).

In 1947, like many other people, professors, high-ranking professionals, was banned from the university during General Perón's first government, due to his firm views on freedom of thought and democratic action. Since then he returned to Uruguay where he continued to develop his research and teachings.

This article is based on memory, but memory is fragile and biased, on photographs and footage which generally reflect the most grateful and joyful moments. But the documents report the facts and events with a certain approximation to reality or to the truth, for the reasons explained above, this article is supported by these three sources.

At memories of the political situation and conditions of Argentine universities experienced from 1975 onwards are extremely strong as the country was going through moments of extreme tension, violence and immense economic difficulties.

For to be able to describe what appears in the title of the work, it is necessary to start by saying that Misiones was national territory and was only provincialized in the 50s of the last century. It was a marginal region, far from the centers of power and decision, which were centralized, a situation that, in certain aspects, continues to this day.

In this case, let's talk about a person Mário Rubén Beltrami, born in a small town in the interior of Misiones, who carried out his studies as a teacher of elementary school (primary) and then his university studies in Biology at the National University of La Plata (Province of Buenos Aires). Afterwards, thanks for the circumstances, he took a postgraduate degree at the USDP, in São Paulo (Brazil), a fact that awakens in him an unlimited passion for Genetics.

As soon as you finished your studies Graduated in Biology in La Plata, he returned to Posadas, capital of the Misiones Province, where he developed his teaching work and actively participated in the movement that promoted the creation of a university in this distant region.

In 1966 the Organization of American States (OAS) promoted a program to improve the teaching of Sciences since, for some advanced minds, great changes would occur and

areas such as Ecology and Genetics would be fundamental in the training of professionals who would work in natural sciences. in the future.

In other words, a revolution in the knowledge necessary for environmental protection and for the extremely diverse areas of the field of heritage was already being foreseen, without having occurred yet.

Professor Beltrami was selected to participate in this Program promoted by the OAS in Lima (Perú) and when he returned to Argentina, he returned with a head full of new ideas in relation to improving the teaching of Biology, and the decision to promote ecological and fundamentally studies. Genetics, which guided his academic life from that moment on and even until his last days of life, always thinking, studying and enthusiastically encouraging Genetics as a fundamental area of Biological Sciences.

The person in charge of dictating the Genetics course in Lima (1966) was the person who lit this fire in Professor Beltrami's head and heart (1966), the distinguished professor of Biology and Brazilian Doctor Oswaldo Frota Pessoa.

At the time of Beltrami's return to Argentina, one of the many interruptions to the democratic order occurred, with the installation of a military government that provoked the exile of many intellectuals.

In this serious situation, Prof. Dr. Frota Pessoa offered Professor Beltrami the possibility of doing his postgraduate studies at the University of São Paulo, opening the doors of his Laboratory until the social commotion calmed down in Argentina.

Soon after finishing his studies and assignments at USP in São Paulo, he returned in 1970 with the conviction that it was very necessary for the Public Health area to have a Human Genetics laboratory and, moreover, with the intimate desire to create a career of specific degree in Genetics.

In the seventies, time and events followed one another vertiginously, ending in 1973 one of the many dictatorships and beginning an ephemeral and chaotic democratic period (1973-1976) very difficult to understand, despite this Professor Beltrami fought a lot, first in favor of creation from the National University of Misiones (1973) and immediately in the "transformation", without extinction, of the career of Biology in a Licenciature (= Bachelor) in Genetics that started to function in 1975.

All of this with the enthusiastic collaboration and guidance of Professor Dr. Oswaldo Frota Pessoa with whom he maintained constant epistolary communication (it was still the era of handwritten or typewriter letters).

As the title of this article says, from 1970 to the present 50 years have passed, 46 years since the entrance of the first group to the career of Genetics and 41 years since the first group of graduates with the title of Bachelors (=Bachelors) in Genetics. Today there are more than 1500, which are distributed in Argentina from north to south and from east to west and on all continents, always keeping the spirit that since the beginning Beltrami and his mentor, Prof. Dr. Frota Pessoa, they burned all of us.

He made a point, but after many other Bachelors in Genetics we chose Brazil to continue our postgraduate studies following in his footsteps and like him fifty years ago, we were always very well received, not only as students, but also as professors and researchers.

# CAPÍTULO 4

## DROGAS MAIS CONSUMIDAS NO BRASIL E SUA RELAÇÃO EM CRIMES CONTRA O INDIVÍDUO: COMO UM TESTE RÁPIDO AJUDARIA EM CASOS DE PRISÃO EM FLAGRANTE

Data de aceite: 10/01/2022

### **Águida Maiara de Brito**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/9974074193835939>

### **Lustarllone Bento de Oliveira**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/8523196791970508>

### **Melissa Cardoso Deuner**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/1858895763510462>

### **Felipe Monteiro Lima**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga Sul  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/1716595016675287>

### **Joselita Brandão de Sant'Anna**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/7307926945059462>

### **Jackson Henrique Emmanuel de Santana**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/0551045014158520>

### **José Vanderli da Silva**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/9684793696420465>

### **Caio César dos Santos Mognatti**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/2548302917685608>

### **Juliana Paiva Lins**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/0577086161279377>

### **Jéssica dos Santos Folha**

Secretária Municipal de Saúde  
Valparaíso, GO  
Hospital CAIS II  
<http://lattes.cnpq.br/1624049224269863>

### **Bruno Henrique Dias Gomes**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/1433679199177049>

### **Erica Carine Campos Caldas Rosa**

Centro Universitário ICESP  
Brasília, DF  
<http://lattes.cnpq.br/5179075026961554>

### **Marcela Gomes Rola**

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade  
Taguatinga  
Taguatinga, DF  
<http://lattes.cnpq.br/5551200316101130>

**RESUMO:** O consumo de drogas atualmente configura um problema de saúde pública, embora seus mecanismos de ação e fisiologias envolvidas na manutenção do comportamento adicto sejam bem estabelecidos, ainda é difícil mensurar como o comportamento do indivíduo usuário de drogas pode ser afetado pelo uso constante dessas substâncias. Os indivíduos tidos como adictos são considerados os mais propensos a cometerem crimes, sobretudo crimes de caráter violento, sendo além de um problema de saúde pública, um problema para o sistema penal e carcerário. Devido ao caráter nóxico das substâncias de abuso, estes indivíduos podem ser caracterizados como inimputáveis legais, em decorrência de o vício ser considerada uma doença que requer tratamento e monitoramento do indivíduo viciado, em alguns casos é solicitada a inimizabilidade legal de modo a levar a defesa do celerado a solicitar uma pena alternativa por alegar que este indivíduo cometeu o crime sob uso de substância entorpecente. Deste modo, este capítulo foi desenvolvido com a finalidade de traçar a importância do desenvolvimento de um teste rápido para a detecção de drogas no organismo, visando trazer o conhecimento científico para uma possível aplicabilidade prática, afim de amparar o trabalho pericial, policial e jurídico com o uso da ciência e do método científico em favor da cadeia de custódia que pode ser sustentada pelos testes e análises forenses.

**PALAVRAS-CHAVE:** Drogas; Drogadição; Vício; Crimes; Análises Forenses.

## MOST CONSUMED DRUGS IN BRAZIL AND THEIR RELATIONSHIP IN CRIMES AGAINST THE INDIVIDUAL: HOW WOULD A QUICK TEST HELP IN FLAGRING PRISON CASES

**ABSTRACT:** Drug use is currently a public health problem, although its mechanisms of action and physiologies involved in the maintenance of addictive behavior are well established, it is still difficult to measure how the behavior of individual drug users can be affected by the constant use of these substances. Individuals considered to be addicts are considered the most likely to commit crimes, especially crimes of a violent nature, being, in addition to being a public health problem, a problem for the penal and prison system. Due to the noxious nature of substances of abuse, these individuals can be characterized as legal inimputable, as addiction is considered a disease that requires treatment and monitoring of the addicted individual, in some cases legal inimputability is requested in order to lead to the defense the defendant to request an alternative penalty for alleging that this individual committed the crime under the use of a narcotic substance. Thus, this chapter was developed in order to outline the importance of developing a rapid test for the detection of drugs in the body, aiming to bring scientific knowledge to a possible practical applicability, in order to support the expert, police and legal work with the use of science and the scientific method in favor of the chain of custody that can be supported by forensic testing and analysis.

**KEYWORDS:** Drugs; Drug addiction; Addiction; Crimes; Forensic analysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico

## 1 | INTRODUÇÃO

O consumo de drogas é um assunto de grande importância para as áreas de saúde, segurança e educação, visto que este problema é tratado como uma epidemia, não só no Brasil como no mundo. A maior preocupação atual com o cenário de abuso de drogas ou substâncias entorpecentes é o mecanismo de tolerância e dependência geradas pelo organismo do usuário de drogas. Deste modo, a dependência é a necessidade que o indivíduo tem de voltar a utilizar a substância após ter cessado seu efeito no organismo, esta necessidade é proveniente de uma condição tanto fisiológica quanto psicológica alimentada pelo mecanismo de ação da substância, bem como pelos seus efeitos ao organismo.

Atualmente tratado como questão de saúde pública, a situação de pessoas dependentes de drogas é vista ainda sob o olhar proibicionista, porém estudos comprovam que drogas como a maconha podem ser usadas em caráter medicinal. Desta maneira, não é correto recorrer somente ao caráter ilícito da droga, embora questões sociais delituosas que envolvem o usuário da mesma pode sim ser caracterizados como ilicitude.

Buscando traçar uma linha entre a fisiologia ou mecanismo de ação da droga, o comportamento do indivíduo e o caráter legal que enquadra pessoas que cometem delitos, sobretudo crimes de caráter violento sob o efeito de substâncias entorpecentes que este trabalho é desenvolvido. Sendo o principal motivador para esse levantamento bibliográfico, a elucidação de como o trabalho policial, pericial e judicial seria facilitado, caso o estado de lucidez ou entorpecimento fosse caracterizado no ato da prisão, mais especificamente a prisão em flagrante de indivíduos que cometem crimes violentos sob o uso de drogas.

Considerando o mecanismo de ação dos principais entorpecentes utilizados em território brasileiro, seria possível, de acordo com a ciência, estabelecer se a droga agiu de modo a favorecer o cometimento desse ato? É possível traçar um paralelo em como a ciência e como o código penal brasileiro encara os indivíduos que cometem crimes sob o efeito neuroquímico de drogas de abuso, o uso de entorpecentes pode ser tratado como agravante ou atenuante?

De maneira geral, os usuários de entorpecentes, independentemente de sua natureza, são mais propensos a cometer crimes, sobretudo crimes de caráter violento, deste modo, este trabalho tem como propósito fazer um levantamento de como a ciência classifica a ação dos entorpecentes no organismo do indivíduo entorpecido, além de, se possível, traçar um paralelo entre estes dados científicos e a realidade que enfrentamos perante o uso de drogas atualmente.

Ao longo deste capítulo, será abordado ainda se há algum tipo de detecção de drogas no ato da prisão, e caso não haja, verificar se a utilização de um teste rápido de

detecção dos principais entorpecentes consumidos no Brasil seria uma alternativa cabível para melhor determinação da condição do indivíduo no ato da prisão, pois sabendo do grau de entorpecimento em que o autor do crime cometeu o delito poderia aplicar mais precisamente a penalidade incumbida ao crime. Trazendo assim uma forma de a ciência ajudar nas outras áreas do conhecimento, possibilitando a execução das áreas correlatas em ciências da saúde, trabalhando à serviço da sociedade e das demandas que ocorrem, não ocasionalmente e permitindo a execução interdisciplinar das diversas áreas do conhecimento.

Sendo assim, este capítulo foi elaborado de modo a descrever como as drogas agem no organismo, e buscará fazer um breve levantamento de como os usuários de drogas são tratados pelo sistema policial e jurídico, para que a ciência seja utilizada de modo a contribuir positivamente com pesquisas e estudos nesta área. O principal foco deste capítulo seria os estudos mais recentes, dados e levantamentos dos últimos anos, porém com a dificuldade de encontrar materiais menos obsoletos, o estudo será pautado na pesquisa de artigos das últimas duas décadas.

## **2 | OS MECANISMOS DE DEPENDÊNCIA DAS DROGAS DE ABUSO**

Ao longo dos diversos períodos da humanidade, o uso de substâncias que são capazes de alterar o nível de consciência, trazer estados de relaxamento, euforia ou alterar a forma de interação interpessoal dos indivíduos foram relatados inúmeras vezes. Em algumas culturas o uso destas substâncias era aplicado como ritos de passagem, como tratamentos medicinais ou ainda como formas de acessar o sagrado daquela cultura. Tais usos, com o passar do tempo foram modificados. Atualmente, embora os usos medicinais e espirituais fossem se modificando, estas substâncias começaram a ser utilizadas também com intuito recreativo (FARIA, 2013).

Por muitos anos, o uso de drogas era tachado apenas como uma compleição do caráter, ou seja, a sociedade encarava tal inclinação como má índole, proveniente de uma escolha falha do indivíduo. Após os indivíduos membros da comunidade científica como médicos e magistrados começarem a notar que havia uma grande diferença entre os indivíduos que usavam substâncias como o álcool esporadicamente, possuíam comportamentos distintos dos os indivíduos que utilizavam esta substância de forma descontrolada, os alcoólatras, e sugeriram que estes requeriam mais atenção e tratamento (GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006).

O termo “drogas” é utilizado para designar substâncias que são capazes de afetar a fisiologia do organismo diretamente. Seus efeitos podem ser descritos como efeitos fisiológicos e/ou psicológicos, além de afetarem a vida dos usuários de maneira geral, seja em caráter laboral, suas relações interpessoais ou ainda o caráter econômico do mesmo. Dentro deste conceito, é possível ainda classificar as drogas de acordo com a sua

influência na atividade cerebral, pois existem ativos que podem alterar o funcionamento das atividades cerebrais, suas percepções, influenciar no temperamento, o caráter e até nas atitudes dos indivíduos que delas fazem uso (OMS, 2018).

O conceito de drogas define que estas são substâncias capazes de alterar como o organismo funciona, estas mudanças podem ocorrer no âmbito físico, emocional e psicológico do indivíduo. Esta variação também permeia o caráter social do indivíduo, visto que a adição a drogas pode gerar alterações em seu comportamento e em como esse indivíduo se comporta perante a sociedade. (FARIA, 2013)

Embora o caráter nóxi gere diversas condições insalubres a seus usuários, a procura por estas substâncias estão se tornando cada vez mais recorrentes na sociedade atual. As substâncias que são consideradas portas de entrada para outras drogas mais pesadas são o álcool e o tabaco, drogas que possuem livre comércio em grande parte dos países (GUERRI, 2012).

Atualmente dispomos de dez classes distintas de drogas, são elas: álcool, cafeína, Cannabis, alucinógenos, inalantes, opióides, sedativos, hipnóticos e ansiolíticos, estimulantes, tabaco e outras substâncias tidas como desconhecidas. Elas são classificadas de acordo com seu funcionamento no organismo e/ou em decorrência da sua origem (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Embora os dados oficiais do governo brasileiro estejam obsoletos, é possível dizer que o consumo de drogas em território nacional é um problema atual e crescente. Com a última atualização do Relatório Brasileiro sobre Drogas, apresentado em 2010 e com dados coletados em cerca de sete anos, o panorama de ilicitude social já era considerado preocupante. Se tratando da dificuldade em obter dados fidedignos e uma catalogação do fenômeno social e econômico, o documento apresentado foi elaborado com o intuito de traçar um panorama, bem como salientar a necessidade de pesquisas e estudos acerca deste fenômeno complexo e que vem tomando proporções maiores a cada ano que passa (DUARTE; BARROSO; STEPLIUK, 2009).

Drogadição ou ainda adição a drogas é o termo utilizado para se referir ao indivíduo que usa constantemente substâncias entorpecentes ou psicotrópicas, gerando no mesmo um quadro de dependência que pode afetar seu estado de saúde geral, bem como o contexto social e psicológico do indivíduo (LINS; SCARPARO, 2010).

Estes sintomas são persistentes e alguns traços podem ser observados mesmo após o afastamento da substância ou retirada total da mesma, onde sua retirada abrupta e total pode acarretar no que é conhecido com abstinência e resultar em uma recaída. Isto acarreta o arrebatamento, inclusive fisiológico, que o organismo adquire pelo efeito que a substância provoca no organismo. A adição pode ser caracterizada ainda por padrões patológicos, podendo ser identificada pelo nível de consumo da droga, recorrência do desejo de uso da substância e até mesmo ocasionar defasagens crescentes e recorrentes no cotidiano do indivíduo. O que pode gerar prejuízos em suas relações, perda econômica,



deslocamento social dentre outras diversas perdas e prejuízos para o usuário (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

No âmbito social, novas discussões vêm ganhando fôlego em virtude do debate acerca da necessidade de descriminalizar a droga. Esta discussão é embasada com o intuito de deslegitimar o proibicionismo punitivo, que são estratégias que visam a redução de danos sociais e de saúde pública, visando principalmente a ordem social, porém este proibicionismo tem seus efeitos, e podem exceder a lógica punitiva (SILVA; MAIA, 2016).

A adição é um problema latente em diversas sociedades, este transtorno acomete jovens, adultos e idosos das diferentes classes sociais, níveis de instrução e não está associada somente ao uso de drogas. O termo adição vem sendo utilizado mais frequentemente que o termo viciado, esta adaptação ocorreu porque para uma pessoa adicta, o termo viciado tem uma entonação negativa o que pode ocasionar em um constrangimento e perturbar a dignidade do indivíduo (FAVARO; PAULA, 2012).

Atualmente o maior debate acerca da adição está pautada na lei 10.216/2001, que caracteriza o uso de drogas dentro do âmbito das doenças mentais, o que permite ao usuário um amparo legal acerca do tratamento de sua condição de usuário ou de dependente. Este recurso está atrelado ao desenvolvimento científico, que permite o entendimento e a distinção entre o uso, abuso e a dependência de drogas. Vale ressaltar que o termo “doença” vem sendo substituído pela expressão “transtorno”. Esta compreensão auxilia tanto o tratamento de saúde do indivíduo como a atuação do poder judiciário no caso de envolvimento deste indivíduo em situação de ilicitude (FARIA, 2013).

Além do aspecto social, o enfoque científico permeia os estudos da desordem provocada pelas consequências do uso indiscriminado destas substâncias, que provocam uma desordem a nível neurofisiológica e psíquica, que em termos de saúde é a mais preocupante. Desta forma, é importante entender como este fator neurofisiológico desenrola-se no organismo, pois entendendo como este mecanismo ocorre, pode-se criar alternativas que facilitem o tratamento e remissão desses usuários (FERREIRA *et al.*, 2017).

Considerando um indivíduo dependente, não é possível levar em consideração apenas o fator fisiológico da droga, visto que os aspectos da dependência podem ser observados nos diversos campos da vida do indivíduo, sendo assim desenvolvidos estímulos que modulam o mecanismo de dependência do mesmo. Estes mecanismos podem reforçar a necessidade do indivíduo de consumir tais substâncias, podendo ser observado nas atividades e relações cotidianas do mesmo. É importante salientar que esse mecanismo de dependência pode ser instaurado após uma série de fatores que colocam o indivíduo em condições de risco, onde o ponto culminante é o início do abuso de substâncias ilícitas (CAPISTRANO *et al.*, 2013).

### 3 I FISIOLOGIA DO VÍCIO DAS PRINCIPAIS DROGAS DE ABUSO UTILIZADAS EM TERRITÓRIO BRASILEIRO

Além do aspecto social, a adição às drogas provoca uma desordem a nível neurofisiológica e psíquica. Desta forma, é importante entender como este fator neurofisiológico ocorre no organismo, pois entendendo como este mecanismo ocorre, pode-se criar alternativas que facilitem o tratamento desses usuários (FERREIRA, 2017).

Alguns estudos apontam que o comportamento aditivo é mais complexo que as teorias preveem, de modo que os mecanismos do vício podem ser elucidados cientificamente, mas ainda assim algumas lacunas carecem de preenchimento. Uma dessas lacunas é a necessidade de explicação acerca dos motivos que leva uma pessoa, mesmo após reconhecer os malefícios da droga, continuar a fazer uso da mesma (PEUKER, 2013).

Outras pesquisas apontam que o mecanismo de dependência e drogadição pode ter um viés genético. Esta carga genética pode estar relacionada tanto na causa motivacional de iniciar o uso de drogas como no mecanismo de dependência. Alguns estudos, utilizando pesquisa com gêmeos univitelinos também sugerem que o vício está diretamente relacionado ao meio em que o indivíduo está inserido (PUPULIM *et al.*, 2015).

O mecanismo de vício mais conhecido é o que está relacionado ao sistema recompensa, de modo que já é considerada a hipótese de que a via mesolímbica não seja a única moduladora desse processo. Também são considerados os fatores psicológicos e químicos do vício. Os fatores psicológicos incluem os desejos profundos em se utilizar de artifícios exógenos para a melhoria ou manutenção de um estado intrínseco do indivíduo (seja um estado de humor, um estado depressivo ou até mesmo problemas pessoais), ao passo que os fatores químicos ou fisiológicos são mais conhecidos como crise de abstinência ou a denominada fissura (ROLNIK; SHOLL-FRANCO, 2006).

Alguns estudos apontam que o uso de drogas tem o crescente início precoce, sendo considerado que quanto mais cedo se dá o primeiro uso, maior as chances de adição, bem como pior o prognóstico de tratamento e remissão do usuário. Sendo possível estabelecer que estes usuários possuam intimo envolvimento com acidentes e mortes, podendo incluir neste último, mortes acidentais, violentas e suicídio, além de uma maior predisposição à violência de modo geral e à violência sexual. Esses indivíduos podem ainda desenvolver quadros depressivos, ansiosos e déficits de aprendizagem (PARADA, 2013).

Considerando que o processo de adição pode ocorrer em qualquer faixa etária, convém salientar que quanto mais jovem ocorrer o uso, maior a chance de esse uso culminar em vício. Os mecanismos anatômicos mais diretamente envolvidos no processo de dependência estão associados aos neurônios dopaminérgicos, ao córtex pré-frontal e ao núcleo de *accubens*. Considerando os neurônios dopaminérgicos os maiores envolvidos no processo de dependência química e também diretamente ligados aos processos de fissura do usuário (VELÁSQUEZ-MARTÍNEZ; ORTIZ, 2014).

Considerando que diversos fatores ativam o sistema de recompensa do cérebro, é possível traçar um paralelo entre o uso de drogas e a produção do hormônio dopamina. A Dopamina é produzida de forma aumentada no núcleo de accumbens quando no uso de drogas, porém convém ressaltar que este sistema pode ser alimentado por diversos estímulos associados à sensação de prazer, como praticar esportes, comer, ou prática sexual. As drogas podem agir em diversas vias do sistema nervoso, porém as estruturas mais efetivas são o sistema mesolímbico, que atua diretamente na ação condicionante de uso e reuso da substância e o sistema mesocortical que responde diretamente ao efeito da substância, no mecanismo de compulsão pelo uso da droga e na fissura do usuário (Brasil, 2017).

No cérebro humano as principais áreas envolvidas no sistema recompensam são: sistema dopaminérgico mesocortical que regula as funções nervosas e cognitivas superiores e a capacidade de planejamento e execução de ações, sistema dopaminérgico (mesolímbico) que se origina na área tegumentar ventral e culminam no núcleo de *accumbens*. Ambos os núcleos (mesolímbico e mesocortical) funcionam de forma isolada e se comunicam entre si, dando origem assim ao sistema recompensa cerebral, tendo a dopamina, serotonina, noradrenalina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmissores atuantes desse sistema (BRASIL, 2017).

### 3.1 Maconha

É possível afirmar que a maconha seja a droga mais consumida no Brasil e no mundo, porém poucas pesquisas procuraram elucidar as consequências neuronais a longo prazo pelo uso dessa substância. Os efeitos da substância ativa da *Cannabis sativa*, mais conhecida como *cannabis* ou maconha, podem incluir agitação, inquietação, perda da capacidade sensorial (ou diminuição da mesma), letargia, prejuízo da memória, perda da acuidade motriz, aumento do ritmo cardíaco, astenia, além de provocar uma sensibilização do sistema neurológico, podendo gerar efeitos psicóticos (CRIPPA *et al.*, 2005).

A *Cannabis* apresenta diversos compostos, porém os canabinóides são os mais relevantes a nível científico, pois é este composto que oferece ao usuário o efeito psicoativo. A substância psicoativa conhecida como tetrahydrocannabinol, ou ainda THC (delta-9-tetrahydrocannabinol), possui fórmula  $C_{21}H_{30}O_2$  é a principal substância ativa da planta. Este composto confere ao usuário as propriedades conhecidas como alucinógenas da planta, provoca ainda letargia, aumenta o apetite e altera o estado psicológico do usuário (VANJURA *et al.*, 2018).

Após a descoberta do THC, foi possível detectar que o cérebro possui receptores próprios para os canabinóides, e que quando esses receptores são sensibilizados pela presença do componente supracitado, alguns neurotransmissores deixam de receber estímulos, ou seja, quando os receptores canabinóides são ligados à molécula de THC, outros estímulos são descontinuados, impedindo a expressão desses neurotransmissores

canabinóides (VANJURA *et al.*, 2018).

### 3.2 Cocaína

Extraída das folhas de *Erythroxylum coca*, mais conhecida como coca, é uma substância com poder altamente viciante, pois a sua ação está diretamente ligada ao sistema modulador da dopamina, ou seja, um potente estimulante do sistema nervoso central. Suas primeiras utilizações foram empregadas na medicina, em decorrência da observação da atividade anestésica do extrato da folha de coca. Em decorrência de seu efeito anestésico, foi amplamente utilizada no século XIX, porém seu uso foi descontinuado posteriormente tendo em vista que sua utilização havia ultrapassado a barreira médica e que sua administração ocasionava diversos efeitos adversos, no final do mesmo século seu uso foi oficialmente proibido principalmente na Europa e na América em decorrência do alto grau viciante, pelos efeitos alucinógenos e pelo estado de euforia que a droga provoca (LUFT; MENDES, 2007). O mecanismo de ação desta droga é caracterizado pelo alto poder de penetração nas membranas celulares, atingindo rapidamente a barreira hematoencefálica, sendo posteriormente distribuída por todo o organismo. A hidrólise enzimática induz a produção de benzoilecgonina, metil-éster ecgonina e resulta na produção de ecgonina, e são rapidamente metabolizadas pelo organismo. Possui ainda comportamento de amina e sua ação é indireta, ou seja, não atua nos receptores adrenérgicos ou dopaminérgicos, desta maneira, a biodisponibilidade dos neurotransmissores são aumentadas na fenda sináptica. A recaptura de noradrenalina e dopamina é inibida, facilitando o acúmulo de noradrenalina ou dopamina nas fendas sinápticas. Este processo de recaptura é o principal indutor de euforia e pode estar empregada no mecanismo viciante da droga (LIZASOAIN *et al.*, 2002).

### 3.3 Crack

Esta droga é considerada uma epidemia, o crack é derivado da cocaína e apresenta-se na forma de uma pasta-base, que é o resultado da conversão do cloridrato (pó) em uma pasta de teor alcalino. Seu uso atualmente é considerado um problema de saúde pública e sua utilização é difundida majoritariamente nas classes menos abastadas da sociedade (PULCHERIO *et al.*, 2010).

O crack é um substrato da cocaína, extraído em forma de pasta, conhecido como pasta-base. É um produto de elevada toxicidade, pois contém impurezas em demasia, estas impurezas são muitas vezes, metanol, éter, acetona, ácido benzoico, querosene, gasolina dentre outros substratos que alteram o estado mental, fisiológico e social do indivíduo, estas substâncias também são responsáveis pelo mecanismo viciante do uso desta droga (CASTRO *et al.*, 2015).

O princípio ativo do crack é basicamente igual ao da cocaína, visto que este é um subproduto da cocaína, porém a utilização da pasta-base dá-se por meio de inalação da

fumaça. Ao fumar a droga, os capilares do pulmão facilitam a entrada da substância no organismo, e atuam diretamente nos neurotransmissores de dopamina de modo que a neurotransmissão dopaminérgica ativa o sistema de recompensa cerebral, sendo observada que ocorre de modo direto sobre os neurônios que modulam a atividade de glutamato, GABA, adrenalina, serotonina e receptores opióides. Desta maneira, os efeitos visíveis do crack são similares aos efeitos da cocaína como a euforia, porém o início dos efeitos é mais rápido e sua duração no organismo é de menor duração (PULCHERIO et al., 2010).

### 3.4 LSD

Considerado um poderoso alucinógeno, o LSD (dietilamida do ácido lisérgico), foi descoberto em meados do século XX, após o cientista suíço Albert Hofmann obter dietilamida após inserir ácido lisérgico a uma experiência que o mesmo estava estudando. Ao inalar o produto de sua reação, Hofmann sentiu-se entorpecido, alucinação, delírio, após a experiência, Hofmann concluiu que aquele seria um potente alucinógeno. Com o movimento hippie o então conhecido como LSD (uma abreviação de sua substância principal), começou a ser usado para fins recreativos e foi amplamente utilizado no meio artístico e cultural (ROBIN et al., 2016).

### 3.5 Anfetaminas

Obtida a partir da obtenção de efedrina, substância contida na planta *Ephedra vulgaris*, encontrada em regiões da Europa, Ásia e África foi utilizada primeiramente como medicamento e posteriormente descoberto um isômero denominado de anfetamina mesclado com diversos outros compostos. Começou a ser utilizado como antidepressivo e redutor de apetite, sendo capaz de diminuir os efeitos do cansaço e pela sensação e revigoração, o composto foi amplamente difundido como medicamento e utilizado por soldados da II Guerra Mundial (LÓPEZ-MUÑOZ, et al., 2011).

## 4 | DROGAS E CRIMINALIDADE

Conhecida como “lei de drogas”, a lei 11.343 de 2006 tem o objetivo de prevenir o uso de ilícitos, discorrendo também sobre a reinserção do indivíduo que foi detido sob pena de reclusão por uso de drogas. Este artigo discorre ainda dos termos que se enquadram como tráfico de drogas, produção independente delimitando os termos dos mesmos (BRASIL, 2006).

Atualmente a política de drogas do Brasil, tem sido grandemente discutida e estudada, dada a subjetividade de como o Código Penal Brasileiro encara o indivíduo usuário de drogas e o traficante. A subjetividade deve-se ao fato de que no ato da abordagem policial, a qualificação fica a cargo de quem está documentando o ilícito, e isto depende da forma como o profissional encarará o delito. O contraste social é determinado neste ponto, onde, segundo os estudiosos sociais encaram como “racismo institucionalizado” o fato de ser

sempre os menos abastados sociais, os moradores de regiões periféricas e os indivíduos negros os mais duramente penalizados, com sentenças maiores e uma menor possibilidade de reinserção social; quadro este que é denominado como “ação seletiva do sistema penal” (GUADANHIN; GOMES, 2017).

O ponto crucial é a consequência do sistema proibicionista brasileiro, pois o mesmo busca a manutenção da ordem social e não a construção da referida ordem, sobretudo utilizando de estratégias repressão destinadas a execução da polícia. A militarização por sua vez anula a identidade do indivíduo, e tem como objetivo exterminar o alvo, atitude essa que gera mais e mais conflitos e não permite que a guerra policial cesse, endossando o conflito. A prática meramente punitiva, não se adequa à sociedade que busca basear a negociação dos interesses dos cidadãos, mesmo que divergentes, de modo a apaziguar as diferenças entre as partes policiais, jurídicas e sociais (LIMA, 2004).

Sabendo que a criminalidade é um problema estrutural de grandes proporções, que causa impacto direto na sociedade, encontramos diversos relatos, estudos, e bibliografias que correlacionam a criminalidade e o tráfico de drogas, bem como o uso indiscriminado de substâncias ilícitas. Porém ainda é difícil estabelecer uma relação direta entre a criminalidade e os efeitos das drogas no organismo, de fato. Isto pode ocorrer por diversos fatores, mas a hipótese mais aceita é a falta de dados que sejam fiéis à proporcionalidade dos crimes. Sendo assim, é possível estabelecer que ainda faltem estudos de casos e aplicabilidade científica dos conhecimentos ao que tange os estudos de drogas e criminalidade (SANTOS; KASSOUF, 2007).

Considerando o cenário dos indivíduos encarcerados, é possível relacionar diretamente as causas das detenções ao envolvimento direto ou indireto, em sua maioria, ao uso, porte ou transporte de drogas. Porém diferentemente do que se imagina, não é o uso da droga que leva o indivíduo a cometer atos criminosos e sim a situação onde esse indivíduo se encontrava antes mesmo do vício ser instalado (TORRES; GOMES, 2005).

A relação entre drogas e criminalidade é intimamente relacionada, considerando que a ocorrência de crimes cometidos por indivíduos que utilizam drogas é consideravelmente maior, os mecanismos fisiológicos assim alterados possuem grande proporcionalidade com à prática de delitos. Alterando o quadro geral de organização e funcionamento do indivíduo, este se torna mais propenso à criminalidade. O adito possui um panorama geral de funcionamento mais inclinado à resistência em se manter distante de conflitos, sendo assim sua tolerância em suportar descargas emocionais menores que pessoas que não fazem uso de substâncias ilícitas (CAPISTRANO *et al.*, 2013).

Dentre as maiores justificativas encontradas por indivíduos que cometeram crimes relacionados às drogas, a necessidade de manter o uso da substância em questão e aumentar o uso ou frequência do uso da droga são as mais recorrentes. Também é encontrada a argumentação sobre cometer o delito em decorrência do uso, visto que uma das justificativas para o cometimento do delito é a indução do efeito da substância sob a

atitude do usuário (MANITA, 2000).

As maiores argumentações científicas permeiam o desvio do comportamento do usuário perante as normas sociais. Porém o embasamento científico brasileiro não está completamente atualizado, carecendo de estudos, dados e levantamentos empíricos mais concretos. Sendo os dados utilizados para embasamento nacional espelhados em estudos e pesquisas ocorridas no exterior (WELLAUSEN, 2009).

Os dados nacionais acerca da incidência do uso de drogas e o cenário de agressão e crimes violentos provenientes de laudos ou levantamentos dos Institutos médico-legais ainda são insuficientes. Sendo ressaltado que há grande importância empírica destes levantamentos, sobretudo levantamentos de uso ou abuso de drogas em exames de necropsia poderiam ajudar nas determinações do consumo de substâncias ilícitas e os crimes contra o indivíduo, estes por sua vez poderiam ser cruciais para a formulação e melhoria das políticas cíveis (DRUMOND; SOUZA; HANG-COSTA, 2015).

O teste da toxicologia do indivíduo vitimado por homicídio não é considerado um elemento fundamental no exame necroscópico e este não faz parte dos elementos de cômputo criminal, sendo empregado mais frequentemente em pesquisas de saúde do que em pesquisas de óbito. Os métodos utilizados para a detecção de drogas em âmbito forense empregados ao serviço de saúde, utilizam técnicas de cromatografia associadas a espectrometria, e estes são considerados testes de elevado valor e complexo funcionamento sendo inviáveis seus usos para averiguação de *causa mortis*. Deste modo, as pesquisas de drogas e sua relação a crimes não possuem uma metodologia especificada, de modo que a polícia científica possui o poder de produzir os testes, embora os mesmos não sejam rotineiramente empregados, estes, caso fossem realizados, produziriam provas com verossimilhança ímpar, implicando a presunção de veracidade da prova pericial (DAYRELL; CAIAFFA, 2012).

Uma das etapas cruciais para a sustentação das provas obtidas por meios periciais é a cadeia de custódia, que consiste na documentação das provas com a finalidade de sustentar as evidências encontradas no exame pericial. Estas evidências podem ser comprovadas por meio de testes e análises forenses, que possuem um rigoroso critério de coleta e pesquisa do material coletado. Desta forma, o trabalho do perito criminal deve obedecer aos métodos vigentes e devidamente comprovados cientificamente e empregados de forma correta para que tais provas sejam utilizadas de forma circunstancial no processo (CAIAFFA, 2012)

Os métodos imunocromatográficos são utilizados atualmente para a detecção qualitativa de substâncias, o mesmo utiliza-se de amostras biológicas para a detecção da interação entre antígenos e anticorpos no organismo. Utilizando técnicas analíticas para a detecção de drogas no organismo, as mesmas podem possuir uma aplicabilidade efetiva no âmbito forense. Por se tratar de uma técnica simples, de fácil execução e baixo custo, seu emprego pode gerar resultados satisfatórios em pesquisa de drogas de abuso.

Considerando a alta sensibilidade dos testes imunocromatográficos e a crescente busca por respostas rápidas para a detecção destas substâncias no organismo, estes testes poderiam ter sua implementação incluída nas análises preliminares na detecção de ilícitos, teste que poderia ser empregado efetivamente na análise pericial e compor a cadeia de custódia de forma circunstancial. Este exame por exibir uma alta taxa de sensibilidade e baixa frequência de resultados falso-positivos, conforme testes realizados em laboratório pode ser uma aposta promissora para o futuro da pericial criminal no Brasil (PINTO *et al.*, 2015).

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de drogas no mundo atual vem sendo grande cenário de discussão, em parte pelo crescente aumento do número de usuários e também pelo aumento das substâncias utilizadas pelos mesmos, caracterizando assim um problema de saúde pública. Deste modo, este trabalho visou traçar um panorama entre os conhecimentos científicos que já existem acerca das principais drogas de abuso consumidas no Brasil e as técnicas de detecção das mesmas em caso de prisão.

Dentre a população, os indivíduos que se enquadram como usuários de drogas são considerados os indivíduos que mais cometem crimes, sobretudo crimes de caráter violento. Considerando as drogas mais utilizadas em território nacional, torna-se possível estabelecer como essas drogas agem no organismo e se as mesmas são capazes de alterar o comportamento do indivíduo, seja para adquirir mais droga ou no comportamento geral do usuário, partindo da premissa que estas substâncias possuem efeito direto no sistema nervoso central.

Tendo conhecimento da lei intitulada “lei de drogas” atualmente em vigor no Brasil e considerando a subjetividade do código penal brasileiro, é possível estabelecer que somente punir a pessoa que comete o delito não torna o sistema penitenciário eficaz. Sabendo ainda que o sistema prisional permite que um indivíduo adicto receba uma pena alternativa, em centros de tratamentos para usuários de drogas por poder considerá-lo inimputável legal, a importância de identificar corretamente a condição de adicto, uma pessoa refém de um vício, ou ainda o estado em que o mesmo cometeu tal ato delituoso torna-se imprescindível para o desdobramento legal com efetividade na punição do delinquente.

Atualmente, com base nas pesquisas realizadas para execução deste trabalho, não existe um teste eficaz para a detecção rápida de um possível estado de entorpecimento do indivíduo, tornando ainda mais difícil a determinação sobre o estado de lucidez do mesmo no ato da prisão. Deste modo, são cabíveis maiores estudos sobre um possível determinante do estado de entorpecimento do indivíduo no ato de prisão em flagrante, na forma de um teste rápido, visando direcionar ainda melhor a ação policial, pericial e jurídica nos trâmites punitivos legais do celerado.



## REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5 ed. Porto Alegre: ABDR, 2014. 483 p.

BRASIL, **LEI ORDINÁRIA Nº 11.343**, de 23 de agosto de 2006. Retirado de: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/11343.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/11343.htm), último acesso 03/06/2019 às 20:19.

BRASIL, **Ministério da Justiça e Cidadania**, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas Módulo 2: Efeitos das substâncias psicoativas. Sistema para detecção do Uso Abusivo e Dependência de Substâncias Psicoativas: Encaminhamento, Intervenção Breve, Reinserção social e Acompanhamento 2ª edição - Brasília, 2017

CAPISTRANO, Fernanda Carolina *et al.* Impacto Social do Uso Abusivo de Drogas Para Dependentes Químicos Registrados em Prontuários. **Cogitare Enfermagem**, Curitiba - Paraná, ano 2013, v. 18, ed. 3, p. 468-474, Julho-Setembro 2013. DOI ISSN 1414-8536. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=483649281007>. Acesso em: 17 out. 2019.

CASTRO, Raquel Augusta de, e col., Crack: Farmacocinética, farmacodinâmica, efeitos clínicos e tóxicos. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/1782>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

CRIPPA, José Alexandre. *et al.* Efeitos cerebrais da maconha - resultados dos estudos de neuroimagem. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, mar. 2005.

DAYRELL, Márcia; CAIAFFA, Waleska Teixeira. Homicídios e consumo de drogas:: breve revisão contextualizada em uma zona urbana metropolitana. **Revista Médica de Minas Gerais**, [s. l.], ano 2012, v. 22, n. 3, p. 321-327, 2012.

DRUMOND, Eliane de Freitas; SOUZA, Hercília Najara Ferreira de; HANG-COSTA, Talline Arêndes. Homicídios, álcool e drogas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2000-2009. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, ano 2015, v. 24, n. 4, p. 607-616, out-dez 2015. DOI 10.5123/S1679-49742015000400003. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/ress/2015.v24n4/607-616/pt>. Acesso em: 17 out. 2019.

DUARTE, Paulina do Carmo Arruda; BARROSO, Lúcia Pereira; STEMLIUK, Vladimir de Andrade. **Relatório Brasileiro sobre Drogas**. Brasília: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), 2009.

FARIA, Marina Correa de. **Caracterização do padrão de consumo de substâncias psicoativas do jurisdicionados encaminhados pelo ministério público do Distrito Federal e territórios para a intervenção educativa no serviço de estudo e atenção a usuário de álcool e outras drogas no hospital universitário de Brasília**. Orientador: Andréia de Oliveira. 2013 63 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em serviço social) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

FAVARO, Fabiana; PAULA, Samuel Rodrigues de. Dependentes químicos: o perfil da abstinência de drogas, **J Health Sci Inst.**, ano 2012, v. 30, n. 1, p. 41-43, 2012.

FERREIRA, Bruna Araújo de Melo *et al.* O uso e abuso da cocaína: efeitos neurofisiológicos. **Cadernos de Graduação Psicologia, Ciências Biológicas e da Saúde**, Alagoas, ano 2017, v. 4, n. 2, 1 nov. 2017. Ciências Biológicas e de Saúde, p. 359-370. DOI ISSN 2316-3143. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/index.php/fitsbiosauade/article/view/4572/2629>. Acesso em: 15 out. 2019.

GARCIA-MIJARES, Miriam; SILVA, Maria Teresa de Araujo. Dependência de Drogas. **Psicologia USP**, São Paulo, p. 213-240, dez. 2006. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-65642006000400012>. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-65642006000400012](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-65642006000400012). Acesso em: 15 out. 2019.

GUADANHIN, Gustavo de Carvalho; GOMES, Leandro de Castro. Política Criminal De Drogas: A Viabilidade da Redução de Danos Como uma Alternativa ao Proibicionismo no Ordenamento Jurídico Brasileiro. **Revista Brasileira de Ciências Criminais**, São Paulo, v. 127, n. 3, jan. 2017.

GUERRI, Consuelo. Bioquímica de las Adiciones. **Revista de la sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular**: SEBBM, [S. l.], ano 06/2012, v. 172, n. 1, jun. 2016. Dossier Científico, p. 4 - 7.

LIMA, Roberto Kant. DIREITOS CIVIS E DIREITOS HUMANOS: UMA TRADIÇÃO JUDICIÁRIA PRÉ-REPUBLICANA?. **São Paulo em Perspectiva**, n.1, p. 49-59, 2004.

LINS, Regina Soares Wanderley e SCARPARO, Helena Beatriz Kochenberger. Drogadição na contemporaneidade: pessoas, famílias e serviços tecendo redes de complexidade.. **Psicologia Argumento**, v.28, n.62, p. 261-271, set. 2010.

LIZASOAIN, I; MORO, M.A; LORENZO, P.. Cocaína: Aspectos Farmacológicos. **Adicciones Revista Versión Online**, Disponível Online, v. 14, n. 1, p. 57-64, jun. 2002.

LÓPEZ-MUÑOZ, F. et al. Una visión histórica de las drogas de abuso desde la perspectiva criminológica (parte I). **Cuadernos de Medicina forense**, Málaga, v. 17, n. 1, mar. 2011.

LÓPEZ-MUÑOZ, F. et al. Una visión histórica de las drogas de abuso desde la perspectiva criminológica (parte II). **Cuadernos de medicina Forense**, Málaga, v. 17, n. 2, abr./jun. 2011.

LUFT, Ana; MENDES, Florentino Fernandes. Anestesia no paciente usuário de Cocaína. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Porto Alegre, v. 57, n. 3, mai./jun. 2007.

MANITA, Celina. Das descobertas privadas aos crimes públicos: evolução dos significados em trajetórias de droga-crime. **Revista Toxicodependências**, [s. l.], ano 2000, v. 6, n. 2, p. 17-31, 2000.

PARADA, Juliana Joni. Aspectos psicossociais relacionados ao uso de drogas na adolescência. **Percursos Acadêmicos**, Belo Horizonte, ano 201, v. 3, n. 5, p. 10-21, jan-jun 2013.

PINTO, G.A.T. et al. Avaliação da técnica de imunocromatografia para análise de drogas de abuso no contexto da química forense. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 4, n. 3, p. 28-37, dez. 2015. ISSN 2237-9223. Disponível em: <<http://rbc.org.br/ojs/index.php/rbc/article/view/105>>. Acesso em: 17 out. 2019. doi:<http://dx.doi.org/10.15260/rbc.v4i3.105>.

PEUKER, A. C. et al. Processamento Implícito e Dependência Química: Teoria, Avaliação e Perspectivas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 7-14, 2013. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=foh&AN=88927975&lang=p t-br&site=ehost-live>>. Acesso em: 15 out. 2019.

PULCHERIO; G. et al. Crack: da pedra ao tratamento. **Revista de AMRIGS**, Porto Alegre, v. 54, n. 3, p. 337-343, 2010.

PUPULIM, Alisson F. *et al.* Mecanismos de Dependência Química no Tabagismo: Revisão da Literatura. **Revista Médica da UFPR**, Ponta Grossa - PR, ano 2015, v. 2, p. 74-78, Abr/Jun 2015. DOI 10.5380/rmu.v2i2.42122. Disponível em: [https://revistas.ufpr.br/revmedicaufpr/article/view/42122/pdf\\_4](https://revistas.ufpr.br/revmedicaufpr/article/view/42122/pdf_4). Acesso em: 15 out. 2019.

ROBIN, L. Carhart-Harris, et.al. **Neural correlates of the LSD experience revealed by multimodal**. St. Louis, Washington University in St. Louis, 2016.

ROLNIK, Ariel Lorber; SHOLL-FRANCO, Alfred. As profundezas do vício: "Quando eu quiser, eu paro!". **Ciências & Cognição**, ano 2006, v. 09, p. 146-149, 2006. ISSN - 1806-5821. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/cc/v9/v9a16.pdf>

Organização Mundial da Saúde, **Relatório Mundial de Drogas**, junho de 2018, retirado de: <https://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/drogas/index.html>, último acesso em: 03/06/2019 às 20:13.

SANTOS, Marcelo Justus dos; KASSOUF, Ana Lúcia. Uma Investigação Econômica da Influência do Mercado de Drogas Ilícitas Sobre a Criminalidade Brasileira. **Revista EconomiA**, [s. l.], ano 2007, v. 8, ed. 2, p. 187-210, Maio/Agosto 2007.

SILVA, Adrian Barbosa e; MAIA, Laís Vidigal. Política Criminal de drogas no Brasil: o que a criminologia tem a nos dizer?. **Revista eletrônica do direito penal e política criminal – UFRGS**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v. 4, n. 1, p. 87-99, jul. 2016.

SOUSA, Luana Raquel Pinheiro de; LUCENA, Greice Maria Rodrigues de Souza. **A química forense na detecção de drogas de abuso**. Sem Data. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/LUANA%20RAQUEL%20PINHEIRO%20DE%20SOUSA.pdf> Acessado dia 17/10/2019

TORRES, Anália Cardoso; GOMES, Maria do Carmo. Drogas e Prisões: Relações Próximas. **Revista Toxicodependências**, [s. l.], ano 2005, v. 11, n. 2, p. 23-40, 2005.

VANJURA, Mateus de Oliveira. *et al.* Drogas de abuso: maconha e suas consequências. **Revista Científica FAEMA. Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. Ariquemes, v. 9, p. 585-589, mai./jun. 2018.

VELÁSQUEZ-MARTÍNEZ, María Carolina; ORTIZ, José G. Abuso de Drogas:: Generalidades Neurobiológicas y Terapéuticas. **Actualidades en Psicología**, ano 2015, v. 28, n. 117, p. 21-25, 20 ago. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ap.v28i117.14135>. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/1332/133232675005.pdf>. Acesso em: 15 set. 2019

WELLAUSEN, Rafael Stella. **Avaliação dos fatores associados ao uso de álcool e drogas na criminalidade**: Um estudo no sistema penitenciário. Orientador: Denise Ruschel Bandeira. 2009. 136 p. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Mestrando, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

## IMPLICAÇÕES DA VACINAÇÃO CONTRA A COVID-19 EM GESTANTES E PUÉRPERAS EM CONTEXTO PANDÊMICO: UMA REVISÃO DE LITERATURA

*Data de aceite: 10/01/2022*

*Data de submissão: 08/11/2021*

### **Ana Luíza Moraes Oliveira**

Universidade Iguazu Campus V  
Itaperuna – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/5713134308334474>

### **Jéssica de Moutta Gomes**

Universidade Iguazu Campus V  
Itaperuna – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/2293222853552044>

**RESUMO:** O atual cenário de crise sanitária e humanitária de repercussão mundial ocasionada pelo novo coronavírus tem gerado uma exaustiva corrida científica e governamental em prol da produção de vacinas, a fim de imunizar em massa a população, sobretudo, os indivíduos pertencentes aos grupos prioritários. Embora gestantes e puérperas estejam incluídos neste grupo, os meios de comunicação reverberam e enfatizam a todo instante que estudos acerca da vacinação de mulheres nessas condições ainda não foram conclusivos, em função de elas terem sido excluídas de todas as pesquisas, até então publicadas, que envolviam vacinas contra a COVID-19. Esse fato repercute na pulverização de dúvidas na atmosfera social acerca da eficácia e segurança da vacinação nesse grupo. Este estudo visa identificar e analisar as implicações da vacinação contra a COVID-19 em gestantes e puérperas na contemporaneidade. O presente estudo alicerçou-se na pesquisa de

revisão bibliográfica na literatura pertinente aos objetivos. Para a realização desse trabalho foram consultados e rastreados 50 artigos científicos e periódicos, delimitados entre o período de janeiro de 2020 a julho de 2021. Este rastreio foi executado nas bases de dados: Google Acadêmico, Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Library of Medicine (PubMed), Biblioteca Virtual da Saúde (BVS), Observatório Obstétrico Brasileiro COVID-19 (OOBr Covid-19). Apesar de os estudos ainda serem inconclusivos e haver um ínfimo quantitativo de pesquisas sobre a temática no campo científico, foi observado que majoritariamente os artigos pré-selecionados defendem de forma enfática a vacinação de mulheres grávidas e puérperas contra o vírus Sars-Cov-2 devido à vulnerabilidade desses indivíduos no que se refere ao contexto pandêmico.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVID-19; Gestantes; Puérperas; Vacinação.

### IMPLICATIONS OF VACCINATION AGAINST COVID-19 IN PREGNANT AND PUERPERAL WOMEN IN A PANDEMIC CONTEXT: A LITERATURE REVIEW

**ABSTRACT:** The current scenery of sanitary and humanitarian crisis with worldwide repercussion caused by the new coronavirus has generated an exhausting scientific and governmental race in favor of the production of vaccines, in order to immunize the population in masse, especially individuals belonging to priority groups. Although pregnant and postpartum women are included in this group, the media reverberate and emphasize at all times that studies on the vaccination of

women in these conditions have not yet been conclusive, as they have been excluded from all research, which has been published so far, that involved vaccines against COVID-19. This fact affects the spreading of doubts in the social atmosphere about the efficacy and safety of vaccination in this group. This study aims to identify and analyze the implications of vaccination against COVID-19 in pregnant and postpartum women today. The present study was based on the literature review research in the literature relevant to the objectives. To carry out this work, 50 scientific articles and periodicals were consulted and screened, delimited between the period of January 2020 and July 2021. This search was performed in the following databases: Academic Google, Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Library of Medicine (PubMed), Virtual Health Library (BVS) and the Brazilian Obstetric Observatory COVID-19 (OOBr Covid-19). Although the studies are still inconclusive and there is a negligible amount of research on the subject in the scientific field, it was observed that most of the pre-selected articles emphatically defend the vaccination of pregnant and postpartum women against the Sars-Cov-2 virus due to the vulnerability of these individuals with regard to the pandemic context.

**KEYWORDS:** COVID-19; Pregnant Women; Postpartum Women; Vaccination.

## 1 | INTRODUÇÃO

Jornais, rádios, revistas, websites e redes sociais a todo instante vinculam informações sobre o desenrolar da catástrofe mundial gerada pelo vírus *Sars-Cov-2*.

Esse atual cenário de crise sanitária e humanitária de repercussão mundial ocasionada pelo novo coronavírus tem gerado uma exaustiva corrida científica e governamental em prol da produção de vacinas, a fim de imunizar em massa a população, sobretudo, os indivíduos pertencentes aos grupos prioritários.

De acordo com os dados do Observatório Obstétrico Brasileiro Covid-19 (OOBr Covid-19) houve uma elevação de mortes de grávidas e puérperas em 2021, em relação à média semanal de 2020. Em função desse aumento significativo no número de óbitos de mulheres nessas condições, adotou-se a inclusão dessas mulheres no grupo prioritário nas campanhas de vacinação do novo coronavírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; OOBr Covid-19, 2021).

Embora gestantes e puérperas estejam incluídos neste grupo, os meios de comunicação reverberam e enfatizam a todo instante que estudos acerca da vacinação de mulheres nessas condições ainda não foram conclusivos, em função de elas terem sido excluídas de todas as pesquisas, até então publicadas, que envolviam vacinas contra a COVID-19. Esse fato repercute na pulverização de dúvidas na atmosfera social acerca da eficácia e segurança da vacinação nesse grupo.

Diante do exposto, a questão-norteadora que encaminhou o estudo está relacionada às possíveis implicações da imunização ativa artificial de gestantes e puérperas contra o *Sars-CoV-2*.

No que concerne aos objetivos, este estudo visa identificar e analisar as implicações

da vacinação contra a COVID-19 em gestantes e puérperas na contemporaneidade.

Desse modo, entende-se que a vacinação da população é a medida mais eficaz de enfrentar o novo coronavírus, mesmo ainda perdurando na atmosfera social o dilema quanto à promoção de forma segura desses imunizantes as gestantes e puérperas no Brasil.

## 2 | METODOLOGIA

Na perspectiva metodológica, o presente estudo alicerçou-se na pesquisa de revisão bibliográfica na literatura pertinente aos objetivos. Para a realização desse trabalho foram consultados e rastreados 50 artigos científicos sendo a maioria delimitados entre o período de janeiro de 2020 a novembro de 2021. Este rastreio foi executado nas bases de dados: Google Acadêmico, Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Library of Medicine (PubMed), Biblioteca Virtual da Saúde (BVS) e o Observatório Obstétrico Brasileiro COVID-19 (OOBr Covid-19). Após a leitura prévia dos resumos dos artigos rastreados, 19 artigos foram excluídos, uma vez que não eram concernentes a finalidade deste estudo, 31 artigos foram selecionados para compor o artigo de revisão por serem mais adequados aos objetivos propostos. Logo em seguida, estes estudos alvos da seleção foram lidos na íntegra, assim como agrupados conforme o modelo clássico de categorização do conhecimento, baseado nas ideias aristotélicas. Esse modelo consiste em uma organização em que “as categorias são definidas apenas pelas propriedades comuns a todos os seus membros, desta forma, nenhum membro pode ser considerado melhor exemplo da categoria que os demais” (ÂNGELA, 2010, p. 112 e 113). Nesse panorama, as seguintes categorias foram formuladas para a análise:

- a) A vulnerabilidade de gestantes e puérperas em contexto pandêmico;
- b) Implicações da vacinação contra o novo coronavírus em grávidas e puérperas;
- c) Relação médico-paciente na pandemia da COVID-19

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 A vulnerabilidade de gestantes e puérperas em contexto pandêmico

Tanto a gestação, quanto o período puerperal são fases únicas e ímpares da vida de uma mulher sendo marcadas por um novo dimensionamento de vida, uma vez que nesses momentos ocorrem diversas rupturas e construções, sejam nos papéis sociais, sejam nos âmbitos emocionais e biológicos. Portanto, em função dessa mudança intrapessoal somado ao estado imunossupressão e alterações fisiológicas, que as mulheres grávidas assim como as puérperas são caracterizadas como um grupo vulnerável no contexto pandêmico da COVID-19 (ABDEL; CAPEL, 2015; APARECIDO et al., 2021; MAMBER et al., 2020).

Vindo de encontro a esse pensamento, Liu *et al.*, (2020) sugerem que se comparado a mulheres não gestantes, as mulheres gestantes possuem elevado risco de adquirir a forma mais grave da infecção do vírus *SARS-CoV-2*. Logo, a fragilidade relacionada às condições imunológicas e fisiológicas das mulheres em condição gravídica ou puerperal aumenta demasiadamente a susceptibilidade desse grupo à aquisição do vírus (APARECIDO *et al.*, 2021; MAMBER *et al.*, 2020; ELLINGTON MMWR, 2020; PANAGIOTAKOPOULOS MMWR, 2020; MASCARENHAS VHA, *et al.*, 2020).

Em contrapartida, pelo estudo elaborado por Breslin *et al.*, (2020), na qual foi realizada uma coorte retrospectiva com 43 gestantes positivas para *SARS-CoV-2* em 3 instituições em Nova York, foi possível observar que 29 pacientes manifestaram sintomas e as 14 pacientes eram assintomáticos e rastreados de rotina antes do parto. De uma forma geral, 86% apresentaram nenhum sintoma ou manifestações clínicas leves, 9,3%, por sua vez, sintomas moderados e 4,7% sintomas graves.

Apesar de ainda haver questionamentos discordantes no meio científico quanto às manifestações mais comuns nesse grupo de estudo, de acordo com as informações obtidas pelo levantamento realizado pelo Observatório Obstétrico Brasileiro Covid-19 (OOBr Covid-19), notou-se que uma média de aproximadamente 10 gestantes e puérperas faleceram por semana em 2020, correspondendo a um total de 453 mortes no ano passado em 43 semanas epidemiológicas. Quando referente ao ano de 2021 esse cenário agravou-se ainda mais, porque a média de óbitos por semana alcançou o quantitativo de cerca de 25 gestantes e puérperas, sendo esses dados obtidos até 10 de abril de 2021, de modo a totalizar 362 mortes neste ano durante 14 semanas epidemiológicas.

Conforme os dados que passaram pela análise da ONU, medidas visando a promoção de cuidados na gravidez assim como administradas aos recém-nascidos tiveram sua interrupção em cerca de metade dos países das Américas ao longo da pandemia. Esse cenário alarmante só ampliou a condição de vulnerabilidade desse grupo em questão no tocante à aquisição de infecções respiratórias como a COVID-19 e possuindo maior probabilidade de desenvolver sintomas mais graves que podem acarretar em risco de vida, seja da criança, seja da mãe (OPAS, 2021; FERLA *et al.*, 2021).

Outrossim, mergulhando-se no cenário socioeconômico do Brasil e colocando em foco as mulheres do país durante esse panorama pandêmico, pode-se extrair da literatura que a pandemia tem sido vivenciada de forma distinta e de acordo com o gênero e as condições financeiras. Visto que por meio do registro da literatura notou-se que o público feminino no decorrer da pandemia tem sido vítima da sobrecarga de trabalho e cuidados, ora domésticos, ora da própria saúde e de familiares. Esse fardo pesado lançado sobre os ombros das mulheres também se faz presente no grupo de mulheres grávidas e mães de recém-nascidos de modo que favorecem à susceptibilidade desse grupo a doenças como a COVID-19, mas também as psicopatologias. Logo, comprometem a saúde das mulheres de diversas maneiras e aumentam a demanda de cuidados por esse gênero acarretando no

crescimento da frequência de procura por sistemas de saúde. Entretanto, o acesso à saúde de qualidade e que satisfaça as necessidades dessas mulheres ainda está restrito aquelas que são detentoras de poder aquisitivo, uma vez que o SUS ainda não é capaz de suprir dignamente a população (FERLA et al., 2021; WERMELINGER et al., 2010).

Embora houvesse diversos fatores que priorizassem as grávidas e as mães que amamentam no que tange à vacinação, em primeiro momento dos estudos e de campanha de vacinação para a COVID-19 esse grupo se viu excluído. Isso aconteceu em função do ínfimo quantitativo de pesquisas envolvendo imunobiológicos e mulheres nessas condições, uma vez que no campo científico ainda perdura o obscurantismo da ciência no tocante aos efeitos colaterais dessas vacinas na saúde materno-fetal (VAN SPALL, 2021). Já em um segundo momento pandêmico, a vacinação dessas mulheres ficou a cargo da decisão compartilhada entre elas e seus médicos.

### **3.2 Implicações da vacinação contra o novo coronavírus em grávidas e puérperas**

A COVID-19 é um surto ativo (CRAIG et al., 2020). Pesquisas mostram que devido a suas condições, mulheres no ciclo gravídico puerperal apresentam um risco elevado de apresentar formas graves da doença, resultando em internação, cuidados intensivos, ventilação mecânica, parto prematuro, além de abortamento e morte (SÁ et al., 2021).

O aspecto preventivo que tem classificado a gravidez como fator de risco para o desenvolvimento da patologia causada pelo novo Coronavírus tem por base o conhecimento prévio acerca de doenças infecciosas surgidas ao longo do período gestacional, como é o caso do Zika vírus, dos antigos Coronavírus e da gripe causada pelo vírus H1N1 (RODRIGUES et al., 2021).

Considerando a relação do vírus SARS-CoV-10 com o aumento da morbidade materna, mortalidade na gravidez e riscos ao bebê. A Sociedade para Medicina Materno-Fetal (SMFM), National Institutes of Health (NIH) e a National Academy of Medicine têm defendido que a melhor abordagem para proteção de grávidas e lactantes é por meio da vacina (CRAIG et al., 2020).

Embora as mulheres desse grupo não tenham participado das pesquisas iniciais das vacinas, testes posteriores que foram realizados, demonstraram, aparentemente, a segurança e eficácia do imunizante para esse grupo, além de ter sido observado também a transferência de anticorpos para fetos e recém-nascidos (RODRIGUES et al., 2021).

Normalmente, a vacinação de mulheres grávidas é baseada no aumento dos riscos que essas infecções representam para a mãe e/ou bebê. Outras vacinas são aprovadas em todo o mundo para circunstâncias especiais quando o risco de exposição a uma grave doença é alto, como no caso da meningocócica A e febre amarela (CRAIG et al., 2020). Sob essa ótica e tendo como base o histórico de outras experiências de administração de vacinas durante a gravidez, sugere-se e depreende-se que podemos esperar uma



eficácia semelhante para as vacinas COVID-19 em mulheres grávidas em comparação com mulheres não grávidas (SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE, 2020).

As vacinas são imunogênicas e os efeitos colaterais esperados pós-vacinação são geralmente leves a moderados e, geralmente, ocorrem nos primeiros 3 dias de vacinação e se resolvem em 1 a 2 dias, com presença de dores no corpo e na cabeça. Pacientes grávidas que apresentam febre após a vacinação deve ser aconselhada a tomar paracetamol (SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE, 2020).

O aconselhamento da vacinação deve incluir o risco teórico de danos ao feto. As vacinas de mRNA são consideradas de baixo risco, porém, a tomada de decisão individual precisa ser equilibrada com os riscos associados à vacinação e a possibilidade de infecção materna por SARS-CoV-2 (SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE, 2020).

A proteção do recém-nascido contra a infecção depende principalmente da imunidade inata neonatal, além das respostas e anticorpos adquiridos por via transplacentária materna. Estudos já evidenciaram a presença de anticorpos gerados, tanto pela vacina, quanto pela doença, no cordão umbilical e leite materno (FLANNERY et al., 2020).

Um estudo conduzido em lactantes que receberam 2 doses da vacina Pfizer-BioNTech em Israel, encontrou nas amostras dos respectivos leites maternos uma secreção robusta de SARS-CoV-2 anticorpos IgA e IgG, 2 semanas após recebida a dose. Esse achado sugere potencial efeito protetor contra infecção da criança. Alguns outros estudos também evidenciaram achados semelhantes em mulheres infectadas por COVID-19 (PEARL et al., 2021). Portanto, a imunização materna é de suma importância, sendo capaz de proteger tanto a mãe, quanto o seu bebê.

Em contrapartida, em maio de 2021, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) emitiu nota suspendendo o uso da vacina desenvolvida pela AstraZeneca em gestantes tendo em vista a investigação da morte de uma gestante vacinada. Porém, esse é um caso isolado e que ainda não tem comprovações da relação direta entre o óbito e a vacina. Detalhes sobre a transferência transplacentária da vacina não foram descritos (ANVISA, 2021).

Diante dos dados promissores e positivos a respeito da segurança e eficácia da vacina COVID-19 administrada durante a gravidez, dados igualmente tranquilizadores quando se trata de bebês nascidos de indivíduos vacinados, além de não possuir impacto na fertilidade, mulheres grávidas e aquelas que planejam engravidar devem se sentir confiantes na escolha da vacinação para proteger a si mesmas, seus bebês, suas famílias e suas comunidades (RODRIGUES et al., 2021).

O desenvolvimento e a aprovação regulatória da vacina COVID-19 estão progredindo rapidamente. Assim, as informações e recomendações irão evoluir à medida que mais dados forem coletados sobre essas vacinas e seu uso em populações específicas. Embora os estudos sobre a segurança dos imunizantes para a gestante e o feto não serem conclusivos, a preocupação com a vacinação considerando o mero risco teórico de dano

fetal, não é suficiente para justificar a negação do acesso dessas mulheres à vacina em uma pandemia (SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE, 2020).

Logo, depreende-se da literatura que ainda que haja poucos estudos a respeito da temática e que ao menos que haja contraindicação, as grávidas e puérperas podem receber a vacina COVID-19, pois os efeitos colaterais são aceitáveis e não são ameaçadores à vida, portanto, os riscos teóricos relativos à segurança da vacinação de lactantes não superam os seus benefícios (SOCIETY FOR MATERNAL -FETAL MEDICINE, 2020; CRAIG et al., 2020).

### **3.3 Relação médico-paciente na pandemia da COVID-19**

Em consonância a todos os aspectos abordados com relação à vacinação de grávidas e puérperas, destaca-se como sendo primordial na abordagem desse assunto a existência de uma relação médico-paciente harmoniosa, pois esse relacionamento é essencial para o sucesso da promoção e prevenção da saúde desse grupo, sobretudo, em tempos de pandemia da COVID-19 (FRANCO et al., 2020).

A relação médico-paciente é firmada, principalmente, através do estabelecimento de um relacionamento entre o profissional e a paciente pautado no diálogo, respeito e em um olhar mais humanizado por parte do médico. Quando essa relação está bem fundamentada, os aconselhamentos e as orientações provenientes desse profissional repercutirão em maior aceitação, satisfação e continuidade do cuidado pelo paciente.

Além disso, é fundamental que esses profissionais compreendam as demandas e necessidades, bem como os contextos socioeconômicos de cada paciente, uma vez que cada gestante é única e carrega consigo queixas, morbidades e deficiências. Por isso, é essencial adequação das devidas orientações sobre a vacinação de acordo com o quadro clínico e social da paciente. Somado a isso, o médico não pode deixar de comunicar a sua paciente sobre as evidências que impera no meio científico no que se refere a esse grupo de análise tratar-se de uma população de risco no que concerne às complicações graves da infecção pelo coronavírus. Desse modo, essa atitude de vacinação deve ser feita através de um aconselhamento profissional, incluindo os riscos e benefícios para essas mulheres (RUBIN, 2021; MASCARENHAS VHA, et al., 2020; SÁ et al., 2021).

Na contemporaneidade a estratégia mais relevante de prevenção contra a infecção, seguida pela vacinação, é preservar-se da exposição ao vírus. Tendo isso em vista, o papel do médico no que tange a informar esse grupo vulnerável é imperativo. Por isso, no decorrer das consultas é fundamental que esse profissional instrua a paciente sobre a lavagem frequentemente das mãos com água e sabão, realização da assepsia com álcool 70% assim como que evite tocar em objetos e em seguida levar as mãos à face, bem como sempre que possível faça o distanciamento social e o isolamento em caso de suspeitas de COVID-19 (BRASIL, 2020).

Cabe destacar também que, muito embora haja o reconhecimento da importância

desse relacionamento médico-paciente, é necessário que as autoridades públicas governamentais invistam e realizem capacitações, sobre cuidados relacionados à COVID-19 assim como orientações quanto à administração de vacinas em gestantes e mães de recém-nascidos, para profissionais da saúde como médicos e enfermeiros que atuam na atenção primária, secundária e terciária. Com o intuito de romper com os entraves que ainda prejudicam, tanto o relacionamento, quanto o diálogo de qualidade entre esses profissionais e as grávidas assim como as puérperas no quesito vacinação contra o vírus *Sars-Cov-2*.

Ainda nessa linha de raciocínio, depreende-se da literatura e do contexto social que lançar a responsabilidade para uma decisão compartilhada entre médicos e pacientes grávidas no que tange optar ou não pela vacinação é um ato de injustiça, visto que o medo e a insegurança são coletivos, inclusive na tomada de uma decisão de tamanha seriedade (FERLA et al., 2020).

Além disso, nota-se que é imprescindível o respeito por parte do profissional da saúde em relação à autonomia da paciente. Visto que após as devidas orientações e explicações sobre os riscos e os benefícios, bem como o funcionamento desses imunobiológicos no organismo das gestantes e puérperas, essas mulheres possuam a autonomia de decisão, ora pela ocorrência da imunização ativa, ora pela não ocorrência da imunização ativa. Já que esse princípio da bioética preza pelo indivíduo ter o direito de decisão sobre quaisquer questões que envolva o seu corpo e sua vida. Por isso, salienta-se a necessidade de mais estudos envoltos sobre a ação dos imunizantes nesse grupo para que todo o processo vacinal seja realizado com segurança e sem hesitação (SKJEFTE et al., 2021; RIMMER, 2021; CREMESP, 2004).

## 4 | CONCLUSÃO

Apesar de os estudos ainda serem inconclusivos e haver um ínfimo quantitativo de pesquisas sobre a temática no campo científico, foi observado que majoritariamente os artigos pré-selecionados defendem de forma enfática a vacinação de mulheres grávidas e puérperas contra o vírus *Sars-Cov-2* devido à vulnerabilidade desses indivíduos no que se refere ao contexto pandêmico.

Entende-se, portanto, que com esse cenário atroz e pandêmico de COVID-19 não é possível ainda qual quantificar os efeitos gerados na saúde materno-infantil a curto e longo prazo, ora pela imunização, ora pela não imunização, de gestantes e puérperas. Todavia, através deste estudo, observou-se que os benefícios da vacinação transcendem aos possíveis riscos oferecidos por esses imunógenos ao grupo de análise. Destarte, espera-se que em um futuro breve essa lacuna científica seja preenchida por mais informações, bem como pesquisas sobre a atuação desses diversos imunobiológicos no organismo de gestantes e puérperas para que assim a imunização dessas mulheres aconteça de maneira

mais segura e eficaz.

## REFERÊNCIAS

AHUMADA, Magdalena; Ansoleaga, Elisa; Castillo-Carniglia, Alvaro. **Acoso laboral y salud mental en trabajadores chilenos: el papel del género**. Cadernos de Saúde Pública [online]. v. 37, n. 2, 2021. Disponível em: ISSN 1678-4464 <https://doi.org/10.1590/0102-311X00037220>. Acesso em: 15 set. 2021.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGISTS. **Vaccinating Pregnant and Lactating Patients Against COVID-19**. ACOG, Practice Advisory. Disponível em: [https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/114/vaccinating\\_pregnant\\_and\\_lactating\\_patients\\_against\\_covid-19\\_acog\\_0.pdf](https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/114/vaccinating_pregnant_and_lactating_patients_against_covid-19_acog_0.pdf). Acesso em: 14 de maio de 2021.

ANVISA. **Anvisa orienta suspensão de vacina da AstraZeneca/Fiocruz para grávidas**. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-orienta-suspensao-de-vacina-da-astrazeneca-fiocruz-para-gravidas#:~:text=A%20orienta%C3%A7%C3%A3o%20da%20Anvisa%20%C3%A9,Nacional%20de%20Imuniza%C3%A7%C3%A3o%20\(PNI\).&text=A%20Anvisa%20recomendou%20nesta%20segunda,AstraZeneca%2FFiocruz%20em%20mulheres%20gestantes](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-orienta-suspensao-de-vacina-da-astrazeneca-fiocruz-para-gravidas#:~:text=A%20orienta%C3%A7%C3%A3o%20da%20Anvisa%20%C3%A9,Nacional%20de%20Imuniza%C3%A7%C3%A3o%20(PNI).&text=A%20Anvisa%20recomendou%20nesta%20segunda,AstraZeneca%2FFiocruz%20em%20mulheres%20gestantes). Acesso em: 14 de maio de 2021.

APARECIDO, G.F.J. et al. **COVID-19 and its relation to pregnancy and neonates: a systematic review**. Revista Brasileira Saúde Materno Infantil, 21 (03), Jul-Sep 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-93042021000300002>. Acesso em: 7 out. 2021.

BRESLIN N, Baptiste C, Gyamfi-Bannerman C, Miller R, Martinez R, Bernstein K, et al. **Infecção por COVID-19 entre mulheres grávidas assintomáticas e sintomáticas: duas semanas de apresentações confirmadas a um par afiliado de hospitais da cidade de Nova York**. AmJ ObstetGynecol MFM. 2020; 2 (02): 100118. Doi: 10.1016 / j.ajogmf.2020. 100118. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020>. Acesso em: 11 set. 2021.

**COVID-19 tem impactos “devastadores” sobre as mulheres, afirma diretora da OPAS**. OPAS. Pandemia COVID. 26 de maio 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/26-5-2021-covid-19-tem-impactos-devastadores-sobre-mulheres-afirma-diretora-daopas#:~:text=%E2%80%9CDevemos%20lembrar%20que%20os%20desafios,acrescentou%20a%20diretora%20da%20OPAS> Acesso em : 11 set. 2021.

CRAIG, A. M.; HUGHES, B. L., & SWAMY, G. K. **Coronavirus disease 2019 vaccines in pregnancy**. American journal of obstetrics & gynecology MFM, 3(2), 100295. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100295>. Acesso em: 14 de maio de 2021.

CREMESP – Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo. **Cadernos Cremesp – Ética em Ginecologia e Obstetrícia**. 3. ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo, 2004. 141 p. Disponível: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/etica-em-ginecologia-e-obstetricia-2/> . Acesso em: 11 de outubro de 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento da COVID-19**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202004/14140600-2-ms-diretrizes-covid-v2-9-4.pdf>. Acesso em: 11 de outubro de 2021.

CZERESNIA, R.M. et al. **SARS-CoV-2 e gestação: uma revisão dos fatos**. Brasileira Ginecologia Obstétrica, 42 (09), Sept 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715137> . Acesso em: 7 out. 2021.

ELLINGTON S, Strid P, Tong VT, et al. **Characteristics of Women of Reproductive Age with Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection by Pregnancy Status**-United States, January 22–June 7, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2020;69:769–775. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6925a1external icon](http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6925a1external%20icon). Acesso em: 10 set. 2021.

FERLA AA, Gosh CS, Possa LB, Durões M, Padilla M. **A Essencialidade da Força de Trabalho em Saúde no Enfrentamento à Pandemia: Precisamos ir além dos Aplausos**. Saúde em Redes. 2020;6(Supl.2). DOI. 10.18310/2446-48132021v7n1Sup.3546g618. Disponível em: <http://revista.redeunida.org.br/ojs/index.php/rede-unida/article/view/3546#:~:text=A%20ESSENCIALIDADE%20DA%20FOR%C3%87A%20DE,APLAUSOS%20%7C%20Ferla%20%7C%20Sa%C3%BAde%20em%20Redes>. Acesso em: 11 set. 2021.

FLANNERY Dustin D. et al. **Transferência transplacentária de SARS-CoV- 2**. MedRxiv The Preprint Server for Health Sciences. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.10.07.20207480>. Acesso em: 14 de maio de 2021.

FRANCO, L. D. A. et al. **A importância da relação médico-paciente no planejamento família**. Rev. APS, 2020; 23 (Supl. 2): 186–18. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/aps/article/view/33825/22665> . Acesso em: 11 de outubro de 2021.

LIMA, G. N. B. O. **Modelos de categorização: apresentando o modelo clássico e o modelo de protótipos**. Perspectivas em Ciência da Informação, v. 15, n. 2, p. 108-122, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/20.500.11959/brapci/38374> . Acesso em: 28 jul. 2021.

LIU H, Wang LL, Zhao SJ, Kwak-Kim J, Mor G, Liao AH. **Por que as mulheres grávidas são suscetíveis ao COVID-19? Um ponto de vista imunológico**. J Reprod Immunol. 2020; 139: 103122. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103122>. Acesso em: 10 set. 2021.

MASCARENHAS VHA, et al. **COVID-19 e a produção de conhecimento sobre as recomendações na gravidez: revisão de escopo**. Revista Latino-Americana de Enfermagem, 2020; 28: e3348. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rlae/a/WBFTkqSGYsKcqyzYfk9NVBj/?lang=pt> . Acesso em : 28 jul. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. **Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento da Covid-19**, 2020. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/10/Diretrizes-covid-V2-9.4.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica N 1/2021 DAPES/SAPS/MS. 2021. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/03/NT-vacinacao-gestantes-peurperas-e-lactantes.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2021

PANAGIOTAKOPOULOS L, Myers TR, Gee J, Lipkind HS, Kharbanda EO, Ryan DS, et al. **SARS-CoV-2 infection among hospitalized pregnant women: reasons for admission and pregnancy characteristics** - eight U.S. health care centers, March 1-May 30, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2020;69:1355-9. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6938e2.htm>. Acesso em: 11 set. 2021.

PERL SH, UZAN-YULZARI A., KLAINER H, et al. **Anticorpos específicos para SARS-CoV-2 no leite materno após a vacinação com COVID-19 de mulheres que amamentam.** JAMA. 2021; 325 (19): 2013–2014. Disponível em: Doi: 10.1001 / jama.2021.5782. Acesso em: 12 de Abril de 2021.

PIO, Danielle; CAPEL, Mariana. **Os significados do cuidado na gestação.** Revista Psicologia e Saúde, v. 7, n. 1, jan. /jun. 2015, p. 74-81. Disponível em: <https://pssa.ucdb.br/pssa/article/view/406/525>. Acesso em: 7 out. 2021.

RIMMER, A. **Covid-19: Breastfeeding women can have vaccine after guidance turnaround.** BMJ, v. 372, n. 64, 8 jan. 2021. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/372/bmj.n64>. Acesso em: 11 set. 2021.

RODRIGUES Fernanda O.S. et al. **Desfechos maternos da COVID-19 e atualizações sobre a vacinação em gestantes e puérperas.** Brazilian Journal of Development, v.7, n.6, p.57232-57247. Curitiba, Junho de 2021 .DOI:10.34117/bjdv7n6. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/31123#:~:text=Discuss%C3%A3o%3A%20Al%C3%A9m%20de%20desfechos%20em,campanhas%20de%20vacina%C3%A7%C3%A3o%20do%20pa%C3%ADs> . Acesso em: 10 de outubro de 2021.

RUBIN, R. **Pregnant People’s Paradox—Excluded From Vaccine Trials Despite Having a Higher Risk of COVID-19 Complications.** JAMA, v. 325, n. 11, p. 1027–1028, 16 mar. 2021. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2777024>. Acesso em: 11 de outubro de 2021.

SÁ, Renato A. M. D.; et al. **ORIENTAÇÃO PRÁTICA PARA PREVENÇÃO DE COVID-19 - GESTANTES E LACTANTES.** Declaração de Consenso da Associação de ginecologia e obstetrícia do estado do Rio de Janeiro(SGORJ) e Associação de obstetrícia e ginecologia de Santa Catarina(SOGISC) para Vacinação contra SARS-Cov-2. Disponível em: <http://www.sogisc.org.br/index.php/78-destaques/180-orientacao-pratica-para-prevencao-de-covid-19-gestantes-e-lactantes>. Acesso em: 11 de outubro de 2021.

SACCONI, Gabriele; ZULLO Fabrizio; MASCIU Daniele D. **Coronavirus disease 2019 vaccine in pregnant women: not so far! The importance of counseling and the need for evidence-based data.** American journal of obstetrics & gynecology MFM, 3(3), 2021, 100324. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33540139/>. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

SKJEFTJE, M. et al. **COVID-19 vaccine acceptance among pregnant women and mothers of young children: results of a survey in 16 countries.** European Journal of Epidemiology, v. 36, n. 2, p. 197–211, 1 fev. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7920402/> . Acesso em: 11 set. 2021.

SOCIETY FOR MATERNAL -FETAL MEDICINE. **Provider Considerations for Engaging in COVID Vaccination Consideration.** 2020. Disponível em: [https://s3.amazonaws.com/cdn.smfm.org/media/2838/Provider\\_Considerations\\_for\\_Engaging\\_in\\_COVID\\_Vaccination\\_Considerations\\_3-3-21\\_\(final\).pdf](https://s3.amazonaws.com/cdn.smfm.org/media/2838/Provider_Considerations_for_Engaging_in_COVID_Vaccination_Considerations_3-3-21_(final).pdf). Acesso em: 1 de novembro de 2021.

STAFFORD,Irena A.;PARCHEM,Jacqueline G.;SIBAI Baha M. **The coronavirus disease 2019 vaccine in pregnancy: risks, benefits, and recommendations.** American journal of obstetrics and gynecology, 224(5), 484–495. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.01.02>. Acesso em: 30 de Janeiro de 2021.

WERMELINGER, Mônica; Machado, Maria Helena; Tavares, Maria de Fátima Lobato; Oliveira, Eliane dos Santos de; Moysés, Neuza Maria Nogueira. **A Força de Trabalho do Setor de Saúde no Brasil: Focalizando a Feminização**. Divulgação em Saúde para Debate, N° 45, maio 2010, Rio de Janeiro, pp54-70. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/observarh/arquivos/A%20Forca%20de%20Trabalho%20do%20Setor%20de%20Saude%20no%20Brasil%20.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

WU Z, McGoogan JM. **Características e lições importantes do surto da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) na China: resumo de um relatório de 72 314 casos do centro chinês para controle e prevenção de doenças**. JAMA. 2020; 323 (13): 1239-1242. Doi: 10.1001 / jama.2020.2648. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>. Acesso em: 11 set. 2021.

# CAPÍTULO 6

## EFEITO DO BIOFILME DE *Arthrographis kalrae* NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 08/10/2021

### **Bianca Dorana de Oliveira Souza**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2433694369223422>

### **Janneth Josefina Escobar Arcos**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Microbiologia  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/5495339793287381>

### **Bruno Fernando Cruz Lucchetti**

Centro Universitário do Vale do Araguaia  
Barra do Garças - Mato Grosso  
<http://lattes.cnpq.br/7357564854018221>

### **Phileno Pinge Filho**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/1339724757657824>

### **Mario Augusto Ono**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2409390685316192>

### **Ayako Sano**

Universidade de Ryukyus, Departamento de  
Ciências Animais  
Okinawa, Japão  
<https://orcid.org/0000-0001-5240-4750>

### **Luciene Airy Nagashima**

Instituto de Tecnologia do Paraná  
Curitiba - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/5818873020876025>

### **Adriane Lenhard-Vidal**

Centro Universitário Campo Real  
Guarapuava - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/3529713931981829>

### **Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda-Rodini**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2374286387972536>

### **Eiko Nakagawa Itano**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/0678087604864219>

**RESUMO:** *Arthrographis kalrae* é um fungo termodimórfico que causa uma síndrome neurológica complexa e lesões em diferentes órgãos em camundongos. É um fungo considerado raro em humanos, porém em diferentes países já foi descrito em diversas manifestações clínicas humanas, como ceratites, sinusites, meningites, eumicetoma e onicomioses. Considerando que na literatura há poucos estudos sobre os fatores de virulência e a patogenicidade de *A. kalrae*, o objetivo deste estudo foi analisar a resposta imunopatológica de macrófagos infectados com células planctônicas e com biofilme de *A. kalrae*. Para isto, foi realizado ensaio de biofilme em placas de poliestireno em diferentes tempos



de incubação (4, 12, 24, 36 e 48 horas), com quantificação da biomassa total através da coloração de cristal violeta. Para avaliação da resposta imunopatológica, macrófagos RAW 264.7 foram tratados e/ou infectados de acordo com os seguintes grupos: sem tratamento e/ou infecção, infectados com células planctônicas, infectados com células de biofilme, tratados com LPS, tratados com LPS e infectados com células planctônicas e tratados com LPS e infectados com células de biofilme por 15, 24 e 48 horas. Em seguida, a produção de óxido nítrico (ON) foi quantificada através do método de Griess. Para análise estatística, assumiu-se como significativo p-valor < 0,05. Através deste estudo, obtivemos os seguintes resultados: a formação *in vitro* de massa de biofilme de *A. kalrae* aumenta com o decorrer do tempo; ocorre inibição na produção de ON pelos macrófagos infectados por *A. kalrae* na sua forma planctônica ( $p < 0,0001$ ), sendo esta inibição ainda maior com as células de biofilme em relação a sua forma planctônica ( $p < 0,0001$ ). Concluímos pelo estudo que o fungo *A. kalrae* induz supressão na produção de ON pelos macrófagos infectados por *A. kalrae*, e que essa supressão pode ser intensificada na sua forma de biofilme, evidenciando desta forma um de seus mecanismos de patogenicidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células planctônicas, Fatores de virulência, Óxido Nítrico.

### EFFECT OF *Arthrographis kalrae*'s BIOFILM IN THE IMMUNE RESPONSE OF INFECTED MACROPHAGES

**ABSTRACT:** *Arthrographis kalrae* is a thermodimorphic fungus that causes a complex neurological syndrome and damage to different organs in mice. It is a fungus considered rare in humans, but in different countries it has been described in several human clinical manifestations, such as keratitis, sinusitis, meningitis, eumycetoma and onychomycosis. Considering that in the literature, there are few studies on the virulence factors and pathogenicity of *A. kalrae*, the aim of this study was to analyze the immunopathological response of macrophages infected with planktonic cells and with *A. kalrae* biofilm. For this, a biofilm assay was performed on polystyrene plates at different incubation times (4, 12, 24, 36 and 48 hours), with quantification of the total biomass through crystal violet staining. To assess the immunopathological response, RAW 264.7 macrophages were treated and/or infected according to the following groups: without treatment and/or infection, infected with planktonic cells, infected with biofilm cells, treated with LPS, treated with LPS and infected with planktonic cells and treated with LPS and infected with biofilm cells for 15, 24 and 48 hours. Then, the production of nitric oxide (NO) was quantified by the Griess method. For statistical analysis, p-value < 0.05 was assumed to be significant. Through this study, we obtained the following results: *in vitro* biofilm mass formation of *A. kalrae* increases over time; there is inhibition of NO production by macrophages infected by *A. kalrae* in its planktonic form ( $p < 0.0001$ ), and this inhibition is even greater with biofilm cells in relation to its planktonic form ( $p < 0.0001$ ). We conclude from the study that the fungus *A. kalrae* induces NO production suppression by macrophages infected by *A. kalrae*, and that this suppression can be intensified in its biofilm form, thus evidencing one of its pathogenicity mechanisms.

**KEYWORDS:** nitric oxide, planktonic cells, virulence factors.

## 1 | INTRODUÇÃO

O fungo *Arthrographis kalrae* foi descrito primeiramente em 1939 por Cochet como *Arthrographis langeroni* e por Tewari e Macpherson (1971) como *Oidiodendron kalrai*. Posteriormente, Sigler e Carmichael (1983) juntaram as duas espécies e reclassificaram a espécie como *Arthrographis kalrae* (SIGLER; CARMICHAEL, 1983; TEWARI; MACPHERSON, 1971). Este fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Eurotiales e família Eremomycetaceae (SIGLER; CARMICHAEL, 1983).

*A. kalrae* é um fungo termodimórfico que se apresenta na fase filamentososa/micelial a 25°C. Esta fase é caracterizada por hifas septadas com artroconídios ovais a redondos em cadeia na extremidade dos conidióforos. A 37°C este fungo se apresenta na fase leveduriforme caracterizada por células ovais ou elípticas podendo estar misturadas com blastoconídios, artroconídios e até hifas septadas (PICHON et al., 2008). A fase micelial predomina no tecido infectado (TEWARI; MACPHERSON, 1971).

Foi demonstrado que camundongos infectados com a fase leveduriforme de *A. kalrae* apresentam síndrome neurológica complexa, com hiperirritabilidade, ataxia, giros e saltos. As lesões causadas pelo fungo (infiltrado inflamatório e necrose) foram encontradas nos rins, cérebro e baço. Nestes órgãos, e também no fígado e pulmões foram encontrados artroconídios, blastoconídios e/ou fungos na fase leveduriforme (TEWARI; MACPHERSON, 1968).

*A. kalrae* é considerado um patógeno raro em humanos, porém este fungo já foi descrito em diferentes manifestações clínicas em humanos, como ceratite (PERLMAN; BINNS, 1997; TING et al., 2020), eumicetoma (DEGAVRE et al., 1997), sinusite (PONIKAU et al., 1999), meningite (CHIN-HONG et al., 2001) e onicomiose (VOLLEKOVÁ; LISALOVÁ; POCZOVÁ, 2008; SUGIURA; HIRONAGA, 2010). Também há relatos de endocardite (DE DIEGO CANDELA et al., 2010), infecção de córnea em paciente em uso de lentes de contato (THOMAS et al., 2011) e infecção pulmonar (VOS et al., 2012) envolvendo este patógeno, podendo ser fatal.

Nagashima et al. (2016) investigaram a resposta imune celular a *A. kalrae* no decorrer da infecção murina tendo quantificado níveis de citocinas no soro e em homogenato de cérebro de camundongos. Os resultados do estudo sugerem que a resposta imune a *A. kalrae* modula para o padrão Th2 da resposta imune celular.

Biofilme é uma comunidade microbiana associada a uma superfície que é capaz de produzir sua própria matriz extracelular e apresenta fenótipo distinto das suas células em suspensão (células planctônicas) (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). O principal motivo dos estudos envolvendo a formação de biofilme é o fato de que os biofilmes que crescem em dispositivos implantados para o acompanhamento médico do paciente, como os cateteres, são a principal causa de infecções recorrentes em hospitais. As infecções recorrentes estão relacionadas com a resistência dos biofilmes aos medicamentos (DESAI;

MITCHELL; ANDES, 2014).

Em relação à resposta imune, há estudos mostrando que a resposta contra células de biofilme pode diferir da resposta contra células planctônicas. Por exemplo, os biofilmes de *Candida albicans* podem resistir à fagocitose por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e podem alterar seu perfil de produção de citocinas (CHANDRA et al., 2007). O biofilme de *C. albicans* diminui a produção de TNF- $\alpha$  (citocina que facilita a ativação de fagócitos) (KATRAGKOU et al., 2010), IL-6 e MIP1 $\beta$  e aumenta a produção de IL-1 $\beta$ , IL-10 e MCP-1 por monócitos (CHANDRA et al., 2007).

Considerando que existem poucos estudos sobre os fatores de virulência do fungo *A. kalrae* na literatura, este estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento sobre a patogenicidade de *A. kalrae*, avaliando-se efeito deste fungo na resposta imunológica de macrófagos.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizado o isolado de *A. kalrae* IFM55165 cedido pelo Centro de Pesquisa de Fungos Patogênicos e Toxicoses Microbianas da Universidade de Chiba, Japão, proveniente de lesão cutânea de gato. O fungo foi mantido a 37°C em ágar Sabouraud dextrose 4%, com repiques a cada cinco dias.

O ensaio de biofilme foi realizado como descrito por Pitangui et al. (2012) com algumas modificações. Leveduras de *A. kalrae* crescidas em ágar Sabouraud dextrose 4% a 37°C por cinco dias foram coletadas e suspensas em tampão fosfato-salino (PBS) 0.15 M a pH 7.2 estéril. A suspensão foi centrifugada a 1512 x *g* por cinco minutos a temperatura ambiente e o pellet de fungo foi suspenso em 2 mL de PBS. As células fúngicas foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1 x 10<sup>8</sup> células/mL em RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose. Foram acrescentados 200  $\mu$ L desta suspensão aos poços de microplacas de poliestireno de 96 poços em triplicata e como controle negativo foram acrescentados 200  $\mu$ L de RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose também em triplicata. Cada microplaca foi correspondente a um tempo de avaliação, sendo que os tempos avaliados foram: 4h (pré-adesão), 12h, 24h, 36h e 48h. As microplacas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para pré-adesão do biofilme. Após a pré-adesão por 4 horas, o sobrenadante foi removido de cada poço, a biomassa total de biofilme da placa de 4h foi determinada e nas outras placas foram adicionados 200  $\mu$ L de RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose e 10% de soro bovino fetal (SBF), que foram novamente incubadas. Foram feitos dois experimentos independentes nas mesmas condições.

A quantificação da biomassa total de biofilme foi realizada como descrito por Brilhante et al. (2015) com algumas modificações. Atingido o tempo de avaliação de cada teste, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados 2 vezes com 200  $\mu$ L de PBS.

Em seguida, houve fixação com 200  $\mu\text{L}$  de metanol por 15 minutos, remoção do metanol e secagem por 20 minutos em temperatura ambiente. 200  $\mu\text{L}$  da solução de cristal violeta 0,1% foi acrescentada e mantida em cada poço por 15 minutos, depois disso a solução de cristal violeta foi removida e os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirar o corante não fixado. 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33% foram adicionados para liberar o corante e esta solução foi transferida para outra microplaca para leitura espectrofotométrica a 550 nm, os valores foram expressos em densidade óptica (D.O.).

Para avaliação da resposta imunopatológica, macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas de cultura de 48 poços a  $1 \times 10^5$  células/mL em RPMI suplementado com 10% de SBF, em um volume final de 500  $\mu\text{L}$  e incubados a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para adesão.

Leveduras de *A. kalrae* crescidas em ágar Sabouraud dextrose 4% a 37°C por cinco dias e células de biofilme (obtidas conforme o ensaio de biofilme descrito acima) de *A. kalrae* crescidas por 48 horas foram coletadas e suspensas em PBS 0.15 M a pH 7.2. As suspensões foram centrifugadas a 1512 x g por cinco minutos a temperatura ambiente e o pellet de fungo foi suspenso em 2 mL de PBS. As células fúngicas foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração de cada suspensão foi ajustada em  $1 \times 10^6$  células/mL.

Depois de 24 horas de adesão, os sobrenadantes de cultura dos macrófagos foram retirados e 500  $\mu\text{L}$  de cada suspensão especificada abaixo foram adicionados aos macrófagos. Os grupos de macrófagos ( $n=4$ ) foram os seguintes: Grupo 1, macrófagos em RPMI (controle negativo); Grupo 2, macrófagos infectados com células planctônicas de *A. kalrae* (P); Grupo 3, macrófagos infectados com células de biofilme de *A. kalrae* (B); Grupo 4, macrófagos tratados com 25  $\mu\text{g}$  de LPS (lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* 055:B5, SIGMA, controle positivo); Grupo 5, macrófagos tratados com 25  $\mu\text{g}$  de LPS e infectados com células planctônicas de *A. kalrae* (LPS+P); Grupo 6, macrófagos tratados com 25  $\mu\text{g}$  de LPS e infectados com células de biofilme de *A. kalrae* (LPS+B). Estes grupos foram organizados em três placas e cada placa foi incubada por 15, 24 ou 48 horas. Atingido o tempo de infecção, os sobrenadantes foram coletados e mantidos a -80°C até o seu uso.

A produção de óxido nítrico (ON) foi quantificada pelo método de Griess, ou seja, pelo acúmulo de nitrito presente nos sobrenadantes da cultura de macrófagos. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cultura de macrófagos de cada grupo descrito acima, foram colocadas em placas de 96 poços em duplicata para determinação de nitrito e, adicionados a elas, o mesmo volume de reagente de Griess (reagente 1: 50 mg de N-naphthylethylenediamina em 250 mL de água destilada; reagente 2: 5 g de ácido sulfanílico em 500 mL de HCl 3 M). A concentração de nitrito foi determinada em referência à curva padrão de 250  $\mu\text{M}$  a 0  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_2$  feita em duplicata, em que também foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess. A absorbância foi determinada pela leitura da microplaca a 540 nm em uma leitora de microplacas. A quantidade de nitrito presente nos sobrenadantes foi determinada em

relação a curva padrão e os resultados foram expressos em  $\mu$ Molar de nitrito.

Foi utilizado teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida two-way ANOVA com teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos avaliados. Assumiu-se como significativo p-valor  $< 0,05$ . As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

### 3 | RESULTADOS

As leveduras de *A. kalrae* aderiram à superfície de poliestireno depois de 4 horas, ocorrendo aumento da biomassa total no decorrer do tempo de incubação por 12, 24, 36 e 48 horas (figura 1), revelando grande aumento do número de células, o que condiz com a formação do biofilme. A forte agregação de fungos na placa e a presença de estruturas visivelmente compatíveis com o biofilme maduro em 48 horas, foi demonstrada anteriormente por microscopia eletrônica (SOUZA et al., 2021, artigo submetido à *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*).

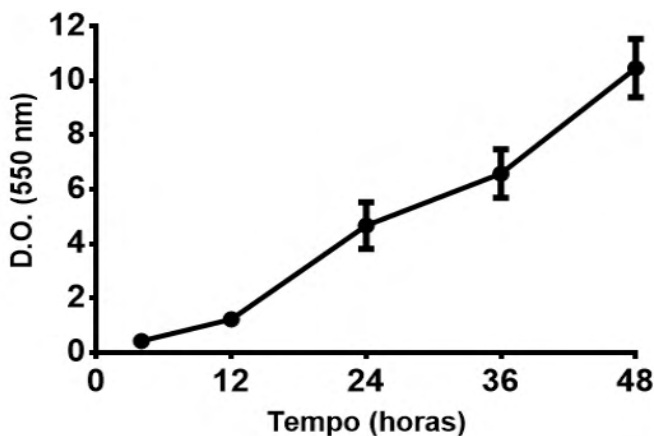


Figura 1. Cinética da formação de biofilme por *A. kalrae* em microplacas de poliestireno determinada por coloração de cristal violeta. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

A quantificação dos níveis de ON (figura 2) através do método de Griess e posterior análise estatística mostrou que em 15 horas de infecção só houve diferença entre os grupos LPS e P, ou seja, o grupo de macrófagos infectados com LPS produziu maior quantidade de ON que o grupo infectado com células planctônicas. Em 24 e 48 horas de infecção, os grupos de macrófagos LPS+P, LPS+B, P e B produziram uma quantidade menor de ON que o grupo LPS ( $p < 0,0001$ ) e os grupos LPS+B, P e B produziram uma quantidade ainda menor de ON que o grupo LPS+P ( $p < 0,0001$ ).

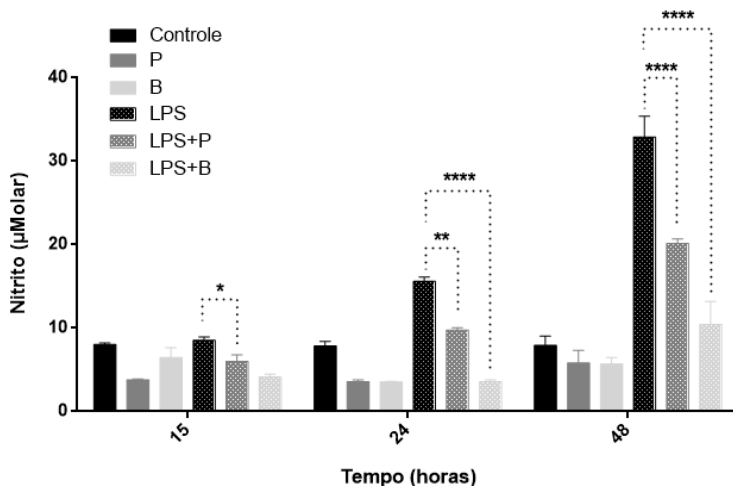


Figura 2. Produção de Óxido Nítrico por macrófagos RAW 264.7. P: macrófagos infectados com células planctônicas; B: macrófagos infectados com células de biofilme; LPS: macrófagos tratados com LPS; LPS+P: macrófagos tratados com LPS e infectados com células planctônicas; LPS+B: macrófagos tratados com LPS e infectados com células de biofilme. Os asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,0001$ ).

## 4 | DISCUSSÃO

O principal motivo dos estudos envolvendo a formação de biofilme é o fato de que os biofilmes que crescem em dispositivos implantados para o acompanhamento médico são a principal causa de infecções recorrentes em hospitais (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014). Um caso de endocardite recorrente por *A. kalrae* foi relatado por De Diego Candela et al. (2010) em que a paciente precisou passar por vários procedimentos cirúrgicos devido a recorrência da infecção por *A. kalrae* e foi a óbito. O uso de uma prótese mecânica pela paciente sugere que o biofilme de *A. kalrae* pode ter sido a causa da gravidade e recorrência da infecção.

Assim como diversas espécies de bactérias, espécies de fungos também são capazes de formar biofilme. Dentre estes fungos, alguns dos mais relevantes clinicamente são *Candida* spp. (KOJIC; DAROUICHE, 2004), *Aspergillus* spp. (BEAUVAIS et al., 2007), *Cryptococcus neoformans* (ASLANYAN et al., 2017) e *Fusarium* spp. (IMAMURA et al., 2008). Além destes, foi demonstrado a formação de biofilme por fungos como *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015), *Paracoccidioides brasiliensis* (SARDI et al., 2015) e mais recentemente por *A. kalrae* (SOUZA et al., 2021, artigo submetido à *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*).

As células da imunidade inata como neutrófilos e macrófagos são protetoras contra fungos (BROWN, 2011) e estas são ativadas quando seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem os diferentes componentes da parede celular dos fungos

(NETEA et al., 2006). No presente estudo, uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) foi utilizada para estudar os efeitos da infecção por *A. kalrae* e diferenciar a resposta inata dessas células à infecção por células planctônicas e células de biofilme. Para avaliar tais respostas, os níveis de ON no sobrenadante de cultura destes macrófagos, foram quantificados e comparados com os níveis de produção de ON por macrófagos tratados com LPS.

Neste estudo, demonstramos que *A. kalrae* é capaz de inibir a produção de ON dos macrófagos. Os macrófagos infectados com o fungo, seja por células planctônicas ou células de biofilme, produziram uma quantidade menor de ON quando comparado ao grupo tratado com LPS (controle positivo). Além disso, o biofilme de *A. kalrae* apresentou maior capacidade de inibição durante infecção por 24 e 48 horas, pois o grupo tratado com LPS mais células de biofilme produziu uma quantidade menor de ON que o grupo tratado com LPS e infectado com células planctônicas. Os grupos infectados apenas com células planctônicas ou células de biofilme permaneceram em todos os tempos de avaliação com níveis baixos de produção de ON. O mecanismo pelo qual este fungo inibe a produção de ON pelos macrófagos ativados serão pesquisados posteriormente.

## 5 | CONCLUSÃO

Em conclusão, o fungo *A. kalrae* induz supressão na produção de ON pelos macrófagos infectados por *A. kalrae*, e essa supressão é intensificada na sua forma de biofilme, evidenciando desta forma um de seus mecanismos de patogenicidade.

## REFERÊNCIAS

- ASLANYAN, L. et al. The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, p. 10, 2017.
- BEAUVAIS, A. et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1588-1600, 2007.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 394-399, 2015.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 21, 2011.
- CHANDRA, J. et al. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2612-2620, 2007.

CHIN-HONG, P. V. et al. Invasive fungal sinusitis and meningitis due to *Arthrographis kalrae* in a patient with AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 804-807, 2001.

DE DIEGO CANDELA, J. et al. Endocarditis caused by *Arthrographis kalrae*. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 90, p. 4-5, 2010.

DEGAVRE, B. et al. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 37, n. 2 (Pt 2), p. 318-320, 1997.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 4, n. 10, p. 1-18, 2014.

IMAMURA, Y. et al. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 171-182, 2008.

KATRAGKOU, A. et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 12, p. 1941-1949, 2010.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

NAGASHIMA, L. A. et al. Immunomodulation over the course of experimental *Arthrographis kalrae* infection in mice. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 2016.

NETEA, M.G. et al. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, 2006.

PERLMAN, E. M.; BINNS, L. Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. **American Journal of Ophthalmology**, v. 123, n. 4, p. 547-549, 1997.

PICHON, N. et al. Fatal-stroke syndrome revealing fungal cerebral vasculitis due to *Arthrographis kalrae* in a immunocompetent patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 3152-3155, 2008.

PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, n. 28, p. 711-718, 2012.

PONIKAU, J. U. et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, p. 877-884, 1999.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SIGLER, L.; CARMICHAEL, J. W. Redisposition of some fungi referred to *Oidium Micorspermum* and a review of *Arthrographis*. **Mycotaxon**, v. 18, n. 2, p. 495-507, 1983.

SOUZA, B. D. O. et al. *In vitro* *Arthrographis kalrae* biofilm formation: scanning electron microscopy and cytotoxic analysis. Artigo não publicado.



SUGIURA, Y.; HIRONAGA, M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 384-389, 2010.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. A new dimorphic fungus, *Oidiodendron kalrae*: morphological and biochemical characteristics. **Mycologia**, v. 63, n. 3, p. 602-611, 1971.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. Cross-protection between *Histoplasma capsulatum* and *Oidiodendron kalrai* in mice. **Mycopathol Mycol Appl.**, v. 29, n. 37(1), p. 97-103, 1969.

TEWARI, R. P.; MACPHERSON, C. R. Pathogenicity and neurological effects of *Oidiodendron kalrae* for mice. **J. Bacteriol.**, v.95, n. 3, p. 1130-1139, 1968.

THOMAS, B. C. et al. Severe *Arthrographis kalrae* keratomycosis in an immunocompetent patient. **Cornea**, v.30, n. 3, p. 364-366, 2011.

TING, D. S. J. et al. *Arthrographis kalrae* Keratitis Complicated by Endophthalmitis: A Case Report With Literature Review. **Eye & Contact Lens**, v. 46, n. 6, p. e59–e65, nov. 2020.

VOLLEKOVÁ, A.; LISALOVÁ, M.; POCZOVÁ, M. (Abstract) *Arthrographis kalrae* – an uncommon causative agent of onychomycosis. **Epidemiology, Microbiology, Immunology**, v.57, n. 2, p. 53-56, 2008.

VOS, C. G. et al. A rare pulmonary infection caused by *Arthrographis kalrae*. **Journal of Medical Microbiology**, v.61 (Pt 4), p. 593-595, 2012.

## POTENTIAL OF *Saccharomyces cerevisiae* IN *Fusarium graminearum* ANTIBIOSIS AND ZEARALENONE DETOXIFICATION

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 08/10/2021

### Andressa Jacqueline de Oliveira

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/5816751074597566>

### Mario Augusto Ono

State University of Londrina, Department of  
Pathological Sciences  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2409390685316192>

### Melissa Tiemi Hirozawa

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/9371346593025432>

### Jaqueline Gozzi Bordini

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/5793406523469122>

### Claudemir Zucareli

State University of Londrina, Department of  
Agronomy  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/7421945211824275>

### Elisabete Yurie Sataque Ono

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology  
Londrina – Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/9080149399359784>

**ABSTRACT:** Considering the serious economic losses and human and animal health hazards caused by the natural occurrence of zearalenone (ZEA), a toxic secondary metabolite produced by *Fusarium graminearum*, the objective of this study was to evaluate the ability of five *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from baker's yeast to inhibit fungal growth and remove ZEA *in vitro*. The antifungal activity of the *Saccharomyces cerevisiae* strains was evaluated against two strains of *F. graminearum* (FRS 26 and FSP 27). All the yeast strains were able to inhibit *F. graminearum* growth, with inhibition rate ranging from  $48.2 \pm 1.6$  to  $73.2 \pm 4.0$  % (FRS 26) and from  $44.2 \pm 2, 5$  to  $63.1 \pm 1.5$  % (FSP 27). Yeast volatile compounds significantly reduced *F. graminearum* FRS 26 growth ( $p < 0.05$ ). On the other hand, there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in growth reduction of both strains of *F. graminearum* by diffusible compounds compared to the control. Furthermore, the ScE strain reduced the mycelial growth of both strains of *F. graminearum* in corn seeds and caused morphological changes in *F. graminearum* FSP 27, such as thinner hyphae. *Saccharomyces cerevisiae* strains also were able to remove ZEA *in vitro*, and the highest reduction in the ZEA concentration was shown by non-viable cells of the ScC ( $84.8 \pm 0.0\%$ ) and ScD ( $86.3 \pm 2.0$  %) strains. *S. cerevisiae* strains inhibited *F. graminearum* growth and showed potential for ZEA removal *in vitro*. It can be included in a new product in animal feed, reducing economic losses and minimizing the risk of ZEA carry-over to human food.

**KEYWORDS:** Adsorption; yeast; antifungal activity; decontamination.

## POTENCIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* NA ANTIBIOSE DE *Fusarium graminearum* E NA DETOXIFICAÇÃO DE ZEARALENONA

**RESUMO:** Considerando as grandes perdas econômicas e os riscos à saúde humana e animal causados pela ocorrência natural de zearalenona (ZEA), um metabólito secundário tóxico produzido por *Fusarium graminearum*, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermento de pão em inibir o crescimento fúngico e remover ZEA *in vitro*. A atividade antifúngica de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada contra duas cepas de *F. graminearum* (FRS 26 e FSP 27). Todas as cepas de leveduras foram capazes de inibir o crescimento de *F. graminearum*, com taxas de inibição variando de  $48,2 \pm 1,6$  a  $73,2 \pm 4,0$  % (FRS 26) e de  $44,2 \pm 2,5$  a  $63,1 \pm 1,5$  % (FSP 27). Os compostos voláteis das leveduras reduziram significativamente o crescimento de *F. graminearum* FRS 26 ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na redução do crescimento de ambas as cepas de *F. graminearum* por compostos difusíveis em comparação ao controle. Além disso, a cepa ScE reduziu o crescimento micelial de ambas as cepas de *F. graminearum* em sementes de milho e causou alterações morfológicas de *F. graminearum* FSP 27, como o afinamento das hifas. As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de remover a ZEA *in vitro*, sendo que a maior redução da concentração de ZEA foi apresentada por células não viáveis das cepas ScC ( $84,8 \pm 0,0\%$ ) e ScD ( $86,3 \pm 2,0$  %). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* inibiram o crescimento de *F. graminearum* e apresentaram potencial para a remoção de ZEA *in vitro*, podendo ser incluídas em um novo produto na alimentação animal, reduzindo as perdas econômicas e minimizando o risco de transferência de ZEA para a alimentação humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** Adsorção, levedura, atividade antifúngica, descontaminação.

### 1 | INTRODUCTION

Brazil is the third largest corn producer worldwide, with a production of over 110 million tons in the 2019/20 harvest season. Paraná State is the second largest national corn producer, representing 17% of national production in the 2018/19 harvest season (USDA, 2020).

In Brazil, approximately 45 % of corn production is intended for swine and poultry feed production (ABIMILHO, 2018).

Because of its nutritional quality, corn becomes a good substratum for toxigenic fungi contamination, which produces toxic secondary metabolites (mycotoxins) (FERROCHIO *et al.*, 2013). Zearalenone (ZEA), a lactone of  $\beta$ -resorcylic acid, is a mycotoxin produced mainly by *Fusarium graminearum* and commonly detected in wheat and corn. Pigs are the most sensitive animals to the ZEA toxic effects, which are related to their estrogenic properties such as infertility, vulvovaginitis and rectal and vaginal prolapse (KUIPER *et al.*, 1998; MARIN *et al.*, 2013).

The main control strategy to minimize pre-harvest mycotoxin contamination is fungicide application, but its use can be hazardous to human and animal health and to the environment. The increasing demand for pesticide-free agricultural products requires

cleaner and safer technologies (LIU *et al.*, 2011). Biological control of pre- and post-harvest diseases is an effective and safe alternative for minimizing mycotoxins in the food production chain (CHANCHAICHAOVIVAT *et al.*, 2007).

Yeasts can produce extracellular compounds with antimicrobial activity called “killer” toxins (CHANCHAICHAOVIVAT *et al.*, 2007), but the most probable mechanism involved in biological control of filamentous fungi is competition for nutrients and space (CAVAGLIERI *et al.*, 2004). Several studies have shown the potential of yeasts to inhibit fungal growth such as *Fusarium graminearum* (ARMANDO *et al.*, 2013) and *F. fujikuroi* (MATIĆ *et al.*, 2014), *Geotrichum citri-aurantii* (KLEIN and KUPPER, 2018) and *Penicillium italicum* (CUNHA *et al.*, 2018).

A post-harvest approach to minimize mycotoxin contamination is detoxification of contaminated cereals (ZINEDINE *et al.*, 2007). The use of adsorbents as additives in animal feed reduces the risk of mycotoxicosis and minimizes mycotoxin carry-over in products of animal origin (meat, eggs, and milk) (SABATER-VILAR *et al.*, 2007).

Several authors have reported the use of yeast for ZEA, ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> detoxification (FAUCET-MARQUIS *et al.*, 2014; FRUHAUF *et al.*, 2012; JOANNIS-CASSAN *et al.*, 2011). The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* has an inner layer constituted of β-D-glucans and chitin, and an outer layer formed by glycosylated mannoproteins. The mannoprotein and glucan provide numerous readily accessible binding sites with different connection mechanisms, such as hydrogen bonds, hydrophobic or ionic interactions (YIANNIKOURIS *et al.*, 2004; HUWIG *et al.*, 2001).

Although yeasts have been applied as biological control agents, there are few studies about the ability of yeasts to inhibit *F. graminearum* growth. Considering the potential of yeasts to inhibit filamentous fungi growth and mycotoxin removal, as well as the demand for pesticide-free products, the objective of this study was to evaluate *S. cerevisiae* application in *Fusarium graminearum* antibiosis and ZEA removal.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Yeast and fungal strains

*Saccharomyces cerevisiae* strains were obtained from fresh baker’s yeasts which were acquired in Londrina markets, Paraná, Brazil. A total of five yeast strains were obtained and denominated ScA, ScB, ScC, ScD and ScE.

Two *Fusarium graminearum* strains (FSP 27 and FRS 26) used as fungal test were provided by the Mycological collection of the Toxigenic Fungi and Mycotoxins Laboratory of the Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (São Paulo-Brazil).

## 2.2 Antifungal activity evaluation

Antifungal activity was evaluated according to Zhao *et al.* (2014), Velluti *et al.* (2004) and Matic *et al.* (2014) with some modifications. Yeast cells were cultured in YPD (yeast, peptone, dextrose) agar, incubated at  $25 \pm 1$  °C for 24 h. Then an aliquot of the inoculum subculture was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL YPD broth, which was incubated at  $25 \pm 1$  °C, 150 rpm for 48 h. Yeast cell concentrations were standardized at  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  cells/mL. One millilitre of cell suspension was homogenized and poured into 20 mL Sabouraud agar. An 8 mm agar plug from an actively grown mycelium of *F. graminearum* FRS 26 and *F. graminearum* FSP 27 was placed on the centre of the Petri dish. All the plates were incubated at  $25 \pm 1$  °C for 7 days and fungal colony diameters were measured. Experiments were performed in triplicate. The inhibition ratios of *F. graminearum* mycelium growth were calculated according to the following formula:

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = [(C - T) / C] \times 100 \% \quad (\text{Formula 1})$$

Where:

C = control colony diameter

T = treatment colony diameter

## 2.3 Evaluation of the antifungal activity of volatile compounds

The antifungal activity of volatile compounds produced by yeasts was evaluated according to the mouth-to-mouth method (Medina-Córdova *et al.*, 2016). An 8 mm disc of fungal growth was inoculated (upper plate) in a Petri dish containing 20 mL potato dextrose agar (PDA). In another Petri dish, 20 mL of YPD agar was added and then an aliquot of 100 mL suspension containing  $10^8$  yeast cells/mL was spread (lower plate). After medium solidification and microorganism inoculation, the plates were paired, sealed with parafilm, and incubated at  $25 \pm 1$  °C for 7 days. Mouth-to-mouth plates without yeast inoculum were used as controls. Experiments were performed in triplicate. The inhibition ratios of *F. graminearum* mycelium growth were calculated according to the formula described in item 2.2.

## 2.4 Evaluation of diffusible compound effect on *F. graminearum* growth

Diffusible compounds were evaluated as described by Medina-Córdova *et al.* (2016). In Petri dishes containing PDA, an eight mm disk of *F. graminearum* mycelium with seven-day growth in PDA was placed in each plate, and an aliquot of 10 mL yeast cells ( $1 \times 10^8$  cells/mL) 3 cm on the opposite side was inoculated and incubated at  $25 \pm 1$  °C, for 7 days. After the incubation time, the colony growth diameter was measured, and the inhibition ratios of *F. graminearum* mycelium growth were calculated according to the formula described in item 2.2.

## 2.5 *F. graminearum* mycelium preparation for ultrastructural study

For this experiment, the yeast strain which showed the highest antifungal activity on solid medium was selected. The methodology was adapted from Zhao *et al.* (2014) and Miguel *et al.* (2015). The yeast strain was cultured in Erlenmeyer flasks containing 50 mL YPD broth, and shaken at 150 rpm,  $25 \pm 1$  °C for 24 h. The yeast cell concentration was standardized at  $10^5$  cells/mL. An 8 mm potato dextrose agar (PDA) plug of *F. graminearum* actively grown for seven days at  $25 \pm 1$  °C was added to the culture. The Erlenmeyer flasks were incubated at 150 rpm,  $25 \pm 1$  °C for five days. Then the culture was stopped by centrifugation ( $9620 \times g$  for 15 min at 0 °C). *F. graminearum* mycelium was collected for scanning electron microscopy analysis.

## 2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

Samples of *F. graminearum* mycelium were fixed with 2.5% glutaraldehyde at 25 °C for 4 h, rinsed 4 times with 0.1 mol/L phosphate-saline buffer (PBS) and subsequently treated with 1 % osmium tetroxide at  $20 \pm 1$  °C for 1 h. The samples were subjected to gradual dehydration in ethanol concentrations (70 %, 80 %, 90 % and 100 %) for 15 min each and dried to the critical point (CPD 030 Critical Point BALTEC Dryer, Leica Microsystems, Liechtenstein). After drying, the samples were glued on stubs using carbon tape and coated with gold (Sputter Coater BALTEC SDC 050, Leica Microsystems, Liechtenstein). The mycelia were analysed using an FEI Quanta 200 scanning electron microscope.

## 2.7 Evaluation of the antifungal activity on corn seeds

### 2.7.1 *F. graminearum* inoculum preparation

Three 8 mm discs of *F. graminearum* growth were inoculated at equidistant points in 250 mL Erlenmeyers flasks, containing 10 g ground corn and 10 mL distilled water were added, then the substrate was autoclaved twice at  $121 \pm 1$  °C for 30 min. The culture was incubated at  $25 \pm 1$  °C for 7 days. Subsequently, 3 g of the culture were added to a tube containing 15 mL saline solution (0.85 % NaCl + 0.01 % Tween 80) and 20 glass beads. The tube was vigorously shaken for 2 min.

### 2.7.2 Yeast inoculum preparation

Yeast cells were reactivated in YPD agar and incubated at  $28 \pm 1$  °C for 48 h. Then a loop of yeast growth was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL YPD broth and the culture was incubated at  $28 \pm 1$  °C, 150 rpm for 48 h. The culture was stopped by centrifugation at  $9620 \times g$  at 4 °C, for 15 min. The yeast cells were suspended in YPD containing 1 % carboxymethylcellulose and standardized at  $1 \times 10^8$  cells/mL concentration.

### 2.7.3 Yeast and *F. graminearum* inoculation on corn seeds

Antibiosis in corn seeds was evaluated according to Brasil (2009) following the instructions for the Blotter test to evaluate seed health. Corn seeds were disinfested by washing for 3 min in 1 % sodium hypochlorite followed by 3 consecutive washes with sterile distilled water for 10 min.

Corn seeds were then placed in 150 mm diameter Petri dishes, containing three filter paper disks, previously moistened with sterile distilled water (2.5 times dry paper weight). The plates were incubated at  $25 \pm 1$  °C for 24 h, subsequently the seeds were frozen at  $-20 \pm 1$  °C for 24 h. The corn seeds were kept at room temperature for 2 h to proceed with fungus and yeast application.

The corn seeds were immersed in a suspension containing  $1 \times 10^8$  yeast cells/mL for 30 min. They were transferred to 150 mm diameter Petri dishes containing three filter paper disks previously moistened as described above. An aliquot of 30 mL *F. graminearum* mycelia suspension was applied to each seed.

The corn seeds were arranged individually, 1-2 cm apart, in 150 mm Petri dishes, on three layers of moistened filter paper disks, as previously described. The Petri dishes were placed under white fluorescent light bulbs in a BOD with 12-h photoperiod at  $28 \pm 2$  °C, for 5 days.

The results were classified by means of a scale of points adapted from the method described by Sharma (2011): seeds without fungal growth = 0; seeds with growth in the germ = 2; seeds with growth in the pericarp = 3; seeds with total growth = 4. Percent inhibition of fungal growth was calculated by Formula 2:

$$\text{Inhibition Rate (\%)} = [(Po - Pn) / Po] \times 100\% \quad (\text{Formula 2})$$

Where:

Po = total fungal growth score in the control

Pn = fungal growth score in the treatment

## 2.8 Detoxification assay

The ZEA detoxification assay was performed according to Armando *et al.* (2012) and Bordini *et al.* (2014) with some modifications. Yeast strains were grown in YPD agar and incubated at  $25 \pm 1$  °C for 24 h. Subsequently, the culture was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL sterile YPD broth and incubated at  $25 \pm 1$  °C, 150 rpm for 24 h. The experiments were divided into two groups: viable cells (no heat treatment) and unviable cells (heated at 121 °C for 15 min). Afterwards the cell suspensions (viable and unviable) were centrifuged ( $9620 \times g$  at 0 °C for 15 min). The resulting pellet was washed three times with PBS solution, pH 7.4 and four times using ultrapure sterile water. The suspension was standardized at  $10^8$  cells/mL in a final volume of 25 mL. This suspension was centrifuged; the pellet was suspended in 10 mL PBS (pH 7.4) to a ZEA final concentration of 500 ng/mL. The assays were then incubated at 37 °C, 250 rpm for 1 h. The experiment was stopped

by centrifugation (9620 *xg* at 0 °C for 15 min). The supernatant was used to determine the ZEA adsorbed.

The controls (without yeast) were prepared simultaneously and the ZEA adsorbed was calculated subtracting the concentration determined in the controls and the supernatant of tests with yeast cells, according to the formula:

$$\text{Adsorption ratio (\%)} = [(Z - Z') / Z] \times 100 \% \quad (\text{Formula 3})$$

Where:

Z = ZEA concentration detected in the control (ng/mL)

Z' = ZEA concentration detected in the supernatant of adsorption tests (ng/mL)

## 2.9 Zearalenone determination

The supernatant was subjected to clean-up with immunoaffinity column (ZearalaTest®; VICAM, Milfort, MA, USA), according to the manufacturer's instructions (with adaptations). An aliquot of 5 mL of the supernatant was diluted 1: 5 with ultrapure water, then 10 mL of this dilution was applied to the immunoaffinity column. The column was washed with ultrapure water, and ZEA was eluted with 1.5 mL methanol, dried under nitrogen stream at 45 °C and stored at - 20 °C.

ZEA was determined according to Bordini *et al.* (2014). The sample residues were dissolved in 200 mL methanol: water (70: 30, v/ v) and 20 mL were injected into a reversed phase high performance liquid chromatography system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector, Shimadzu, Tokyo, Japan), using a C-18 Luna Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 mm, Scharlau, Barcelona, Spain). The excitation and emission wavelengths were 280 and 460 nm, respectively. The mobile phase was methanol: water (70: 30, v/ v) at a flow rate of 1 mL/min.

The detection and quantification limits were 1.3 ng/mL and 2.35 ng/mL, respectively, defined as 3-fold and 5-fold the standard deviation of 7 replications of an unspiked sample (INMETRO, 2007).

## 2.10 Statistical analysis

Differences in the mean inhibition ratio of yeast strains against *F. graminearum* isolates were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Differences in mean ZEA removal (%) were evaluated statistically using ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test and differences were assessed in mean ZEA removal (%) between viable and unviable yeast cells using the t test ( $p < 0.05$ ).

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

Several researchers have studied the antagonistic effect of yeast on *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum* and *Fusarium guttiforme* (ARMANDO *et al.*, 2013; KORRES *et al.*, 2011; MATIĆ *et al.*, 2014; SCHISLER *et al.*, 2015).



Walker *et al.* (1995) associated the antagonistic activity of yeasts with the ability to synthesize killer toxins. Other authors associated the antagonistic effect with competition for nutrients (ARMANDO *et al.*, 2013). The mechanisms of antimicrobial activity include antibiosis, competition, parasitism, and extracellular production of substances (KÖHL *et al.*, 2015; SCHISLER *et al.*, 2015).

The antifungal activity of yeast strains against *F. graminearum* FRS 26 and FSP 27 is shown in Tables 1 and 2, respectively. The yeast strains showed different inhibition degrees against *F. graminearum* FRS 26 (from  $48.2 \pm 1.6$  to  $73.2 \pm 4.0$  %) and *F. graminearum* FSP 27 (from  $44.2 \pm 2.5$  to  $63.1 \pm 1.5$  %). Regarding *F. graminearum* FRS 26, all the yeast strains showed the highest inhibition rate at  $10^7$  cells /mL. For the ScA, ScB and ScD strains, the inhibition rate was proportional to the cell concentration, but for the ScC and ScE strains the inhibition rate did not differ significantly between  $10^5$  and  $10^6$  cells/mL. Regarding *F. graminearum* FSP 27, all the strains also showed the highest inhibition rate at  $10^7$  cells/ mL, but there was no significant difference among the cell concentrations for the ScA, ScC and ScE strains. These results were similar to those reported by Korres *et al.* (2011) who demonstrated that *Candida krusei* BT0701 inhibited 75.8 % of *Fusarium guttiforme* E-261 growth, while *Kloeckera apis* BT0703 showed 41.4 % inhibition of *F. guttiforme* E-261 growth. On the other hand, Armando *et al.* (2013) reported that *F. graminearum* growth was completely inhibited by *S. cerevisiae* RC016.

Yeast strains	Cell concentration (cells/ mL)		
	$10^5$	$10^6$	$10^7$
	Inhibition ratio (%)		
ScA	$52.4 \pm 2.4$ <sup>b C</sup>	$58.9 \pm 2.5$ <sup>b B</sup>	$71.4 \pm 3.0$ <sup>b A</sup>
ScB	$51.5 \pm 3.3$ <sup>cb C</sup>	$64.0 \pm 1.3$ <sup>a B</sup>	$69.9 \pm 1.3$ <sup>ab A</sup>
ScC	$52.1 \pm 0.7$ <sup>b B</sup>	$53.9 \pm 1.7$ <sup>c B</sup>	$69.3 \pm 7.0$ <sup>ab A</sup>
ScD	$48.2 \pm 1.6$ <sup>c C</sup>	$51.8 \pm 1.6$ <sup>c B</sup>	$65.5 \pm 1.5$ <sup>ab A</sup>
ScE	$56.0 \pm 0.9$ <sup>a B</sup>	$57.7 \pm 0.9$ <sup>b B</sup>	$73.2 \pm 4.0$ <sup>a A</sup>

\* Means followed by different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) for each yeast strain.

\* Means followed by different uppercase letter in the same line are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) among the three cell concentrations of the same yeast strain.

Table 1. Inhibition ratio (%) of yeast strains at different cell concentrations against *F. graminearum* FRS 26.

Yeast strain	Cell concentration (cells/ mL)		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
	Inhibition ratio (%)		
ScA	54.3 ± 0.6 <sup>a B</sup>	56.3 ± 3.1 <sup>aB</sup>	60.1 ± 1.8 <sup>aA</sup>
ScB	44.2 ± 2.5 <sup>cC</sup>	56.3 ± 4.6 <sup>aB</sup>	62.1 ± 2.5 <sup>aA</sup>
ScC	49.2 ± 3.1 <sup>b B</sup>	53.3 ± 1.1 <sup>aA</sup>	56.1 ± 1.5 <sup>bA</sup>
ScD	46.7 ± 2.6 <sup>b cC</sup>	53.5 ± 2.3 <sup>aAB</sup>	61.1 ± 3.1 <sup>aA</sup>
ScE	56.8 ± 1.2 <sup>a B</sup>	58.1 ± 3.4 <sup>aB</sup>	63.1 ± 1.5 <sup>aA</sup>

\* Means followed by different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) for each yeast strain.

\* Means followed by different uppercase letter in the same line are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) among the three cell concentrations of the same yeast strain.

Table 2. Inhibition ratio (%) of yeast strains at different cell concentrations against *F. graminearum* FSP 27.

The antifungal activity of volatile compounds produced by yeast strains against *F. graminearum* FRS 26 and FSP 27 is shown in Table 3. Volatile compounds of all the yeasts reduced *F. graminearum* growth from 30.4 % ± 6.4 to 34.6 % ± 5.5 (FRS 26) and from 3.4 % ± 4.8 to 26.5 % ± 6.3 (FSP 27), but only FRS 26 growth reduced significantly in relation to the control ( $p < 0.05$ ). The inhibition of fungal growth by volatile compounds was higher than that reported by Ferraz *et al.* (2016), but lower than that reported by Medina-Córdova *et al.* (2016) and Grzegorzczuk *et al.* (2017). Ferraz *et al.* (2016) evaluated 95 yeasts and only one inhibited less than 10.0 % *Geotrichum citri-aurantii* growth by volatile compound production. Medina-Córdova *et al.* (2016) demonstrated that the volatile compounds produced by *Debaryomyces hansenii* inhibited *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans* growth by 54.2 and 43.5 %, respectively, in comparison with the control ( $p < 0.05$ ). Grzegorzczuk *et al.* (2017) reported that *Wickerhamomyces anomalus* inhibited 47.3 % and 98.0 % of *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* growth by volatile compound production.

Yeast strain	<i>F. graminearum</i> FRS 26		<i>F. graminearum</i> FSP 27	
	Mycelial growth (mm)	Inhibition ratio (%)	Mycelial growth (mm)	Inhibition ratio (%)
ScA	56 ± 3 <sup>B</sup>	32.4 ± 3.7 <sup>a</sup>	53 ± 5 <sup>A</sup>	26.5 ± 6.3 <sup>a</sup>
ScB	55 ± 4 <sup>B</sup>	34.6 ± 5.5 <sup>a</sup>	65 ± 6 <sup>A</sup>	10.1 ± 9.3 <sup>a</sup>
ScC	57 ± 3 <sup>B</sup>	31.6 ± 4.6 <sup>a</sup>	57 ± 6 <sup>A</sup>	22.1 ± 8.8 <sup>a</sup>
ScD	57 ± 5 <sup>B</sup>	31.8 ± 3.5 <sup>a</sup>	70 ± 4 <sup>A</sup>	3.4 ± 4.8 <sup>a</sup>
ScE	58 ± 6 <sup>B</sup>	30.4 ± 6.4 <sup>a</sup>	58 ± 8 <sup>A</sup>	19.8 ± 13.0 <sup>a</sup>

Control <sup>1</sup>	81 ± 6 <sup>A</sup>	-	73 ± 2 <sup>A</sup>	-
----------------------	---------------------	---	---------------------	---

\* Means followed by different uppercase letter in the same column are significantly different by t-test ( $p < 0.05$ )

\* Means followed by different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) for each yeast strain.

<sup>1</sup> plates without yeast inoculum

Table 3. Inhibition ratio (%) of volatile compounds produced by yeasts on fungal growth.

The antifungal activity of diffusible compounds from yeast strains against *F. graminearum* FRS 26 and FSP 27 is shown in Table 4. Inhibition of FSP 27 ranged from  $5.0 \pm 8.8\%$  to  $12.8 \pm 9.3\%$ , but there was no statistical difference from the control ( $p > 0.05$ ). Fungal growth inhibition was lower than that reported by Medina-Córdova *et al.* (2016) who stated that diffusible compounds of *Debaryomyces hansenii* inhibited *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* and *F. subglutinans* growth in 56.3 %, 38.9 % and 25.9 %, respectively.

There were no significant differences regarding the effect of volatile compounds and diffusible compounds from the yeast strains on fungal growth. *S. cerevisiae* ScE was selected for the study of structural modifications and antibiosis on corn seeds because it showed the highest antibiosis by the agar diffusion method.

Yeast strain	<i>F. graminearum</i> FRS26		<i>F. graminearum</i> FSP 27	
	Mycelial growth (mm)	Inhibition ratio (%)	Mycelial growth (mm)	Inhibition ratio (%)
ScA	63 ± 6 <sup>A</sup>	-	61 ± 7 <sup>A</sup>	10.6 ± 8.3 <sup>a</sup>
ScB	67 ± 4 <sup>A</sup>	-	60 ± 3 <sup>A</sup>	12.8 ± 9.3 <sup>a</sup>
ScC	62 ± 8 <sup>A</sup>	-	65 ± 6 <sup>A</sup>	5.0 ± 8.8 <sup>a</sup>
ScD	63 ± 11 <sup>A</sup>	-	65 ± 7 <sup>A</sup>	5.5 ± 20.0 <sup>a</sup>
ScE	63 ± 6 <sup>A</sup>	-	61 ± 7 <sup>A</sup>	10.1 ± 13.0 <sup>a</sup>
Control <sup>1</sup>	62 ± 11 <sup>A</sup>	-	69 ± 11 <sup>A</sup>	-

\* Means followed by different uppercase letter in the same column are significantly different by the t-test ( $p < 0.05$ )

\* Means followed by different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) for each yeast strain

<sup>1</sup> plates without yeast inoculum

- no inhibition

Table 4. Inhibition ratio (%) of diffusible compounds produced by yeasts on fungal growth.

Evaluation of morphological changes can be applied to the study of the antagonistic mechanism. Some yeasts with antagonistic potential can synthesize enzymes such as

glucanases, chitinases and proteases which cause morphological changes in hyphae (JANISIEWICZ and KORSTEN, 2002). The scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that *Saccharomyces cerevisiae* ScE caused defects on hyphae morphology of *F. graminearum* FSP 27 (Figure 1 C) such as thinner hyphae (Figure 1 A). The mycelial organization revealed by SEM also showed an extracellular material around the hyphae. However, it was not possible to observe morphological changes in *Fusarium graminearum* FRS 26 mycelia in the presence of the ScE strain. The results of the mycelial ultrastructural study in addition to the absence of fungal growth inhibition by diffusible compounds suggest that the main antagonistic mechanism involved in *F. graminearum* antibiosis by *S. cerevisiae* ScE is competition for nutrients. On the other hand, Korres *et al.* (2011) reported that *Kloeckera apis* BT0703 and *Candida krusei* BT0701 caused changes in *Fusarium guttiforme* hyphae and were able to adhere to the surface of the hyphae indicating that the mode of action was associated with hyperparasitism.

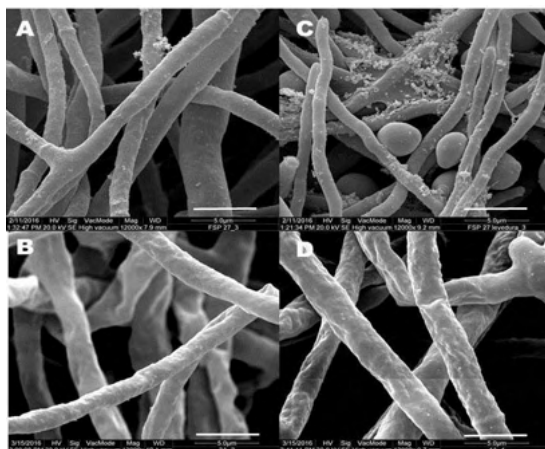


Figure 1. Electron micrographs of *F. graminearum* mycelia FSP 27 and FRS 26 on 5<sup>th</sup> day incubation at 25 °C on the absence (control) - A (*F. graminearum* FSP 27) and B (*F. graminearum* FRS 26), and presence (treatment) - C (*F. graminearum* FSP 27) and D (*F. graminearum* FRS 26) of ScE yeast strain. Bar: 5.0 µm.

Corn is susceptible to several soil-borne diseases. *F. graminearum* is an important phytopathogen and when present in the soil can cause root rot (DAGUERRE *et al.*, 2014; PAL *et al.*, 2001). Prolonged use of agrochemicals may harm the ecological environment of soil; therefore, it is necessary to develop biological control methods that minimize the incidence of seed diseases (HE *et al.*, 2019; MATIĆ *et al.*, 2014). The *S. cerevisiae* ScE strain reduced the growth of both strains of *F. graminearum* on corn seeds (Figure 2) compared to the control ( $p < 0.05$ ). The percent growth inhibition was  $23.0 \pm 4.9$  % for FRS 26 and  $17.9 \pm 2.7$  % for FSP 27 (Figure 2). These results are in line with Matić *et al.* (2014). *Pichia guilliermondii* R9, *Metschnikowia pulcherrima* R23 and R26 reduced the infection

rate of *F. fujikuroi* by 14.3 %, 16.7 % and 18.0 %, respectively (MATIĆ *et al.*, 2014). These results indicate that *S. cerevisiae*, used as baker's yeast, has potential to prevent soil-borne diseases.

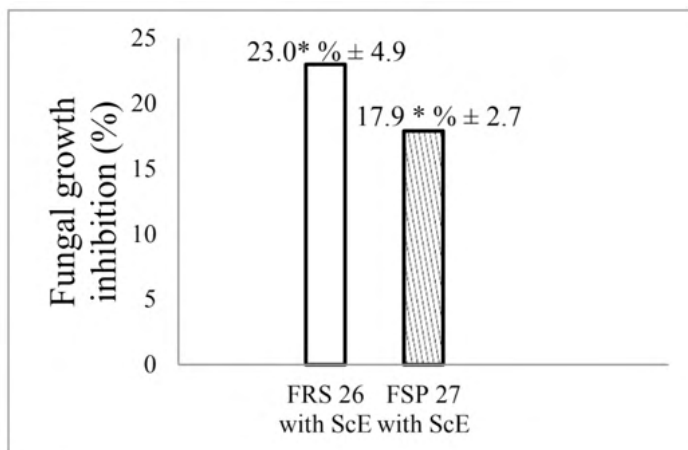


Figure 2. Evaluation of the ScE antagonistic capacity in BALU 761 corn seeds. Data from trials were collected after five days of incubation at 28 °C. Each bar represents the average  $\pm$  SD of four replicates. The results were classified by means of a scale of points ranging from 0 (seeds without fungal growth) to 4 (seeds with total growth). The percentage of growth inhibition was then calculated by the quotient of the control score difference and the treatment score, divided by the control score multiplied by 100. Mean values significantly different from the control according to the t-test ( $p < 0.05$ ) are indicated by an asterisk.

Some researchers have reported the application of yeast or yeast's cell wall for mycotoxin adsorption (BORDINI *et al.*, 2014; FREIMUND *et al.*, 2003; FRUHAUF *et al.*, 2012). The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is composed of two layers, comprising mainly mannoproteins, glucan ( $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6 glucan polysaccharide) and chitin (polymer of  $\beta$ -1,4 N-acetylglucosamine) linked by covalent bonds (KOGAN and KOCHER, 2007; SHETTY *et al.*, 2007). The different ability of the yeast cell wall for mycotoxin adsorption is assigned to glucans present in its structure (HUWIG *et al.*, 2001). The interaction between ZEA and  $\beta$ -D-glucans occurs by stereochemical complementarity, involving van der Waals interactions. The hydroxyl and ketone groups of ZEA bind via hydrogen bonds, and other stable molecular forces, to the hydroxyl groups of the single helix structure of (1,3)  $\beta$ -D-glucan (YIANNIKOURIS *et al.*, 2004; YIANNIKOURIS *et al.*, 2003).

In this study, *in vitro* ZEA removal by viable yeast cells ranged from  $67.1 \pm 4.1$  % (ScE) to  $76.0 \pm 0.0$  % (ScA). There was no significant difference in mean ZEA removal among the viable yeast strains. Unviable cells (heat inactivated) showed ZEA removal ranging from  $78.0 \pm 0.6$  (ScE) to  $86.3 \pm 2.0$  % (ScD) (Table 5). Comparing the ZEA removal (%) by the same *S. cerevisiae* strain, unviable cells of the ScC and ScD strains showed higher ability ( $p < 0.05$ ) than the viable cells. Other strains showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) in

mean ZEA removal (%) between viable and unviable cells. This result indicates that ZEA removal from the medium does not occur by enzymatic degradation but by adsorption to the cell wall, since unviable cells were more efficient in ZEA removal. The heat treatment may have altered the conformation of the yeast cell wall, making the hydroxyl groups present in  $\beta$ -D-glucan more available for toxin-glucan complex formation (YIANNIKOURIS *et al.*, 2004).

Yeast strains	% ZEA removal	
	Viable cells	Unviable cells <sup>1</sup>
ScA	76.0 $\pm$ 0.0 <sup>aA</sup>	82.0 $\pm$ 2.6 <sup>abA</sup>
ScB	75.71 $\pm$ 0.8 <sup>aA</sup>	80.2 $\pm$ 2.3 <sup>abA</sup>
ScC	75.6 $\pm$ 1.7 <sup>aB</sup>	84.8 $\pm$ 0.0 <sup>abA</sup>
ScD	71.1 $\pm$ 4.7 <sup>aB</sup>	86.3 $\pm$ 2.0 <sup>aA</sup>
ScE	67.1 $\pm$ 4.1 <sup>aA</sup>	78.0 $\pm$ 0.6 <sup>ba</sup>

\* Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) for each yeast strain.

\* Means followed by uppercase different letter in the same line are significantly different by the t test ( $p < 0.05$ )

<sup>1</sup> Unviable cells: heat treatment (121 °C for 15 min)

Table 5. *In vitro* ZEA removal (%) by viable and unviable yeast cells ( $10^8$  cells/mL) at 500 ng/ mL ZEA concentration.

ZEA removal (%) was similar to that reported by Faucet-Marquis *et al.* (2014), but higher than that obtained by Armando *et al.* (2012) and Bordini *et al.* (2014) (pure yeast cell wall). Faucet-Marquis *et al.* (2014) reported maximum values of 75 % ZEA adsorption using 5 mg yeast cell wall derivative (ZEA concentration of 20 mg/mL, at pH 5). Armando *et al.* (2012) evaluated the potential of *S. cerevisiae* strains for ZEA detoxification and reported binding percentage ranging from 56.7 to 74.2 % at 0.5 mg/mL ZEA concentration. Bordini *et al.* (2014) evaluated ZEA adsorption capacity by a mixture of organic (yeast cell wall) and inorganic (activated charcoal) adsorbents. The adsorbent mixture at 75: 25 ratio showed higher efficiency for ZEA adsorption ( $> 96.1$  %) than the pure yeast cell wall (55.7 - 78.1 %).

In summary, the present study showed inhibition of *Fusarium graminearum* growth by *S. cerevisiae* strains and competition for nutrients was the probable mechanism. All the *Saccharomyces cerevisiae* strains showed potential for *in vitro* ZEA removal. *Saccharomyces cerevisiae* is Generally Recognized as Safe (GRAS), therefore there is no risk for its application in food and feed. It can be included in a new product to inhibit *F. graminearum* growth or for ZEA removal in animal feed, reducing economic losses and minimizing the risk of ZEA carry-over to human food.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CNPq (The Brazilian Government Organization for Grant Aid and Fellowship to Brazilian Researchers) - grant number 405452/2016-0, FINEP, the Araucária Foundation (Project announcement 09/2016, Research project agreement 001/2017) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support. The CNPq research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S. Ono (grant number 311116/2020-5), M.A. Ono (grant number 311922/2018-0), as well as the CAPES/Dr scholarship by A.J. Oliveira, J.G. Bordni and M.T. Hirozawa. The authors are grateful to the Laboratory of Electronic Microscopy and Microanalysis (LMEM-UEL/FINEP) for support in scanning electron microscopy analysis, as well as to the Toxicogenic Fungi and Mycotoxins Laboratory of the Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (São Paulo-Brazil) for providing *Fusarium graminearum* strains (FSP 27 and FRS 26).

## REFERENCES

ABIMILHO - Associação Brasileira das Indústrias do Milho. **Estatísticas**, 2018. Available online: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>> accessed on: May 2019.

ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 182–188, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.016>

ARMANDO, M. R.; PIZZOLITTO, R. P.; DOGI, C. A.; CRISTOFOLINI, A.; MERKIS, C.; POLONI, V.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256–264, 2012.

BORDINI, J. G.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, A. S.; ONO, M. A.; ZANINELLI, T. H.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E.Y.S. *In vitro* zearalenone adsorption by a mixture of organic and inorganic adsorbents application of the Box Behnken approach. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 283-289, 2014. <https://doi.org/10.3920/wmj2013.1675>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes. 2009. ISBN 978-85-99851-64-7. Available online: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/semntese-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes/view>> accessed in July 2019.

CAVAGLIERI, L.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B<sub>1</sub> production. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 747–754, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.06.001>

CHANCHAIHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, v. 42, p. 326–335, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.016>

CUNHA, T.; FERRAZ, L. P.; WEHR, P. P.; KUPPER, K. C. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, 20–27, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.019>

DAGUERRE, Y.; SIEGEL, K.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, p. 97–125, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001>

FAUCET-MARQUIS, V.; JOANNIS-CASSAN, C.; HADJEBE-MEDJDOUB, K.; BALLEST, N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and ochratoxin A. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7583–7596, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5917-y>

FERRAZ, L. P.; CUNHA, T.; SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188–189, p. 72–79, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M. C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M. L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 215–220, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.005>

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; RYS, P. Efficient Adsorption of the Mycotoxins Zearalenone and T-2 Toxin on a Modified Yeast Glucan. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B38, n. 3, p. 243–255, 2003. <https://doi.org/10.1081/PFC-120019892>

FRUHAUF, S.; SCHWARTZ, H.; OTTNER, F.; KRŠKA, R.; VEKIRU, E. Yeast cell-based feed additives: studies on aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 2, p. 217–231 2012. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.630679>

GRZEGORCZYK, M.; ZAROWSKA, B.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. **Food Microbiology**, v. 61, p. 93–101, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.005>

HE, AN-IE; LIU, J.; WANG, XIN-HUA; ZHANG, QUAN-GUO; SONG, W.; CHEN, J. Soil application of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 granules promotes growth and resistance to *Fusarium graminearum* in maize. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, p. 599–606, 2019. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62089-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62089-1)

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179–188, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00360-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00360-5)

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho de 2007.



JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 411–441, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>

JOANNIS-CASSAN, C.; TOZLOVANU, M.; HADJEBI-MEDJDOUB, K.; BALLEST, N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Binding of Zearalenone, Aflatoxin B<sub>1</sub>, and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 7, p. 1175–1185, 2011. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-023>

KLEIN, M. N.; KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161–165, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.134>

KÖHL, J.; LOMBAERS, C.; MORETTI, A.; BANDYOPADHYAY, R.; SOMMA, S.; KASTELEIN, P. Analysis of microbial taxonomical groups present in maize stalks suppressive to colonization by toxigenic *Fusarium* spp.: A strategy for the identification of potential antagonists. **Biological Control**, v. 83, p. 20–28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.007>

KORRES, A. M. N.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1251–1258, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.001>

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Å. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252–4263, 1998. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>

LIU, J.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; VERO, S.; TIAN, S.; HERSHKOVITZ, V. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatu*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 76–83, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.007>

MARIN, D. E.; PISTOL, G. C.; NEAGOE, I. V.; CALIN, L.; TARANU, I. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 408–415, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>

MATIĆ, S.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. **Biological Control**, v. 73, p. 59–67, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.03.008>

MEDINA-CÓRDOVA, N.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ASCENCIO, F.; CASTELLANOS, T.; CAMPA-CÓRDOVA, A. I.; ANGULO, C. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). **Biological Control**, v. 97, p. 70–79, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.006>

MIGUEL, T. Á.; BORDINI, J. G.; SAITO, G. H.; ANDRADE, C. G. T.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y.; VIZONI, É.; ONO, E. Y. S. Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B<sub>1</sub> production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 293–299, 2015. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246120120383>

PAL, K. K.; TILAK, K. V. B. R.; SAXENA, A. K.; DEY, R.; SINGH, C. S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 156, p. 209–223, 2001. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00103>

SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN, M. H. J.; DOELEN M. A. M.; FINK-GREMMELES, J. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone micotoxins. **Mycopathologia**, v. 163, p. 81–90, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-0093-6>

SHARMA, P. Alarming occurrence of *Fusarium* wilt disease in pea (*Pisum sativum* L.) cultivations of Jabalpur district in Central India revealed by an array of pathogenicity tests. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 2, p. 981–994, 2011. <https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.6.981.994>

SCHISLER, D. A.; BOEHM, M. J.; PAUL, P. A.; ROONEY, A. P.; DUNLAP, C. A. Reduction of *Fusarium* head blight using prothioconazole and prothioconazole-tolerant variants of the *Fusarium* head blight antagonist *Cryptococcus flavescens* OH 182.9. **Biological Control**, v. 86, p. 36–45, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.002>

SHETTY, P. H.; HALD, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 41–46, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013>

USDA - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, 2020. Custom Query. Available in: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>> , accessed: January 2021.

VELLUTI, A.; MARÍN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, v. 21, p. 649–656, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.009>

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, p. 213–222, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x>

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C. G.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J. P. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 783–789, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1023576520932>

YIANNIKOURIS, A.; FRANCOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C. G.; JEMINET, G.; BERTIN, G. Influence of pH on complexing of model  $\beta$ -D-glucans with zearalenone. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2741–2746, 2004. <https://doi.org/10.1021/bm049775g>

ZHAO, Y.; SELVARAJ, J. N.; XING, F.; ZHOU, L.; WANG, Y.; SONG, H.; TAN, X.; SUN, L.; SANGARE, L.; FOLLY, Y. M. E.; LIU, Y. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C., MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

# CAPÍTULO 8

## BIOLOGICAL EVALUATION OF A THERAPEUTIC DEVICE THAT IS BASED IN PULSED-ELECTROMAGNETIC FIELDS AND STATIC MAGNETIC FIELDS ON A MURINE MODEL

*Data de aceite:* 10/01/2022

*Data de submissão:* 07/10/2021

### **Abraham O. Rodríguez-De la Fuente**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0001-5665-7819>

### **José Antonio Heredia-Rojas**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0001-7453-8573>

### **Pilar Carranza-Rosales**

Centro de Investigación Biomédica del Noreste,  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Monterrey, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0002-1890-4468>

### **Omar Heredia-Rodríguez**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<http://www.fcb.uanl.mx/nw/es/2012-03-05-22-25-25/profesores-en-el-sni/details/39/998-omar-heredia-rodriguez>

### **Gerardo Lozano-Garza**

Centro de Investigación Biomédica del Noreste,  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Monterrey, Nuevo León, México  
<https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Gerardo-H-Lozano-Garza-2001458984>

### **Angel Zavala-Pompa**

Centro de Investigación Biomédica del Noreste,  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Monterrey, Nuevo León, México  
<https://www.linkedin.com/in/angelzavalapompa/?originalSubdomain=mx>

### **Pedro Antonio Noguera-Díaz**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.  
<https://www.researchgate.net/profile/Pedro-Noguera-2>

### **José Alberto Valadez-Lira**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Microbiología e Inmunología  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0003-4378-7221>

### **Ricardo Gómez-Flores**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Microbiología e Inmunología  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0002-9518-4433>

### **Pedro César Cantú-Martínez**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0001-8924-5343>

### **María Porfiria Barrón-González**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento  
de Biología Celular y Genética  
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0002-8386-444X>

**ABSTRACT:** There is number of publications trying to demonstrate the efficacy of magnetic fields treatments in medicine. By the way, pulsed electromagnetic fields (PEMF's) and static magnetic fields (SMF's) technologies have been used on several pathological conditions with promising results. More recently, these magnetic fields have been also used to treat several types of cancer. However, there are conflicting results and remains continuing concern that exposure to electromagnetic devices may cause deleterious health effects. The current study was aimed to further evaluate the potential cytogenotoxic effects induced in rats exposed in a device that uses PEMF's combined with SMF's. Thirty sexually mature 14-week-old male and female Sprague Dawley rats were distributed into three groups: (a) 5 males and 5 females independently exposed to PEMF's combined with SMF's, (b) animals treated with SMF's only, and (c) non-exposed animals. Micronucleus test in rat bone-marrow and male germ cells analysis were performed following standardized procedures. The observed results showed a lack of alterations on micronuclei frequency, on scored polychromatic erythrocytes percentage, and on sperm counts and morphological characteristics of male germ cells in animals exposed to magnetic fields device compared to unexposed animals. These results suggest that magnetic fields generated in this therapeutic device did not have any detectable cytotoxic or genotoxic effect in exposed rats. In view of these findings and the contradictory reports in the literature, it is necessary to carry out more research to help to clarify the controversy regarding cytogenotoxic risk associated with medical magnetic fields exposures.

**KEYWORDS:** PEMF-medical device, static magnetic fields device, cytotoxicity, genotoxicity, micronuclei, sperm abnormalities.

**RESUMEN:** Hay una diversidad de publicaciones que intentan demostrar la eficacia de los tratamientos con campos magnéticos en el área médica. Las tecnologías que usan campos electromagnéticos pulsados (PEMF, por sus siglas en inglés) y campos magnéticos estáticos (SMF, por sus siglas en inglés) han sido utilizadas en varias condiciones patológicas con resultados prometedores. Más recientemente, los tratamientos magnéticos también se han utilizado para tratar varios tipos de cáncer. Sin embargo, hay resultados contradictorios reportados en la literatura y sigue existiendo preocupación entre la comunidad científica de que la exposición a dispositivos electromagnéticos pueda causar efectos nocivos para la salud. El presente estudio, tuvo por objeto evaluar los posibles efectos cito-genotóxicos inducidos en ratas expuestas en un dispositivo terapéutico que utiliza PEMF en combinación con SMF, originalmente diseñado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer en humanos. Para tal efecto, 30 ratas Sprague Dawley, machos y hembras, sexualmente maduras y de 14 semanas de edad se distribuyeron en tres grupos de estudio: (a) 5 machos y 5 hembras expuestas de forma independiente a PEMF combinados con SMF, (b) animales tratados solo con SMF y (c) animales no expuestos. Se realizaron pruebas citogenéticas; como la prueba de micronúcleos en médula ósea, y el análisis de células germinales masculinas siguiendo protocolos previamente estandarizados. Los resultados observados, mostraron ausencia de alteraciones en la frecuencia de micronúcleos, en el porcentaje de eritrocitos policromáticos, en el recuento de espermatozoides y las características morfológicas de las células germinales masculinas en animales expuestos al dispositivo terapéutico, en comparación con los animales no expuestos. Estos resultados sugieren que los campos magnéticos generados en esta máquina de uso médico no tuvieron ningún efecto citotóxico o genotóxico detectable en

las ratas expuestas. En vista de estos hallazgos, y de los informes contradictorios publicados en la literatura, se hace pertinente y necesario llevar a cabo más estudios sobre la inocuidad de estos dispositivos utilizando otros tipos celulares y una variedad de pruebas citogenéticas. **PALABRAS CLAVE:** Campos magnéticos, genotoxicidad, micronúcleos, espermatozoide, mutación.

## 1 | INTRODUCTION

Several techniques that involve electromagnetic fields (EMF's) procedures have been used for therapeutic purposes, but have also been correlated with deleterious health effects. The bio-effects of exposure to electromagnetic fields have been studied for many years. However, among scientific community, there is still no agreement on whether these effects are physiologically significant (Macklis, 1993; Miller and Green, 2010; Binhi, 2012).

Interest in the health effects of EMF's on human populations was rekindled by a series of epidemiological studies carried out during the late 1970's and early 1980's (Jauchem and Merritt, 1991). By the way, Milham (1982) analyzed the occupational grouping of cancer deaths in adult white men who died between 1950 and 1979; an increased mortality ratio for leukemia was found. More recent studies in adult human beings have suggested increased occupationally associated EMF's risks for breast cancer, abnormal pregnancies, chromosomal abnormalities, congenital deformities, and several other health conditions (Ahlbom et al., 2001; Pearce et al., 2007; Hug et al., 2010). Based in these studies and others, there is no doubt that life bodies can be affected by EMF's at several levels. Actually, these fields are the most probable candidate to affect cellular interactions and it is possible to consider a diversity of cellular effects induced of both, electric and magnetic fields (Cifra et al., 2011).

With regard to PEMF's, they have been used for the past 40 years to treat therapeutically resistant problems of the musculoskeletal system. Recently, diverse approaches using PEMF's procedures were tested for therapeutic effects in several types of cancer (Haro et al., 2005; Grosel et al., 2006).

While the issue of potential genotoxic and cytotoxic effects of EMF's is controversial, there are many commercial machines that use several types of magnetic fields that are unproven or have not been properly tested. In view of this, we have aimed the present study to further evaluate the cytological effects induced in rats exposed in a patented medical device (Davidson, 2001), originally designed to treat several types of cancer in human beings. This machine uses PEMF's and SMF's. For the present study, we decided to confine our *in vivo* experimental investigation to single parameters, i.e., the analysis of micronuclei in bone marrow, sperm analysis, and morphological characteristics of male germ cells in exposed Sprague-Dawley rats.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### Animals

14-week-old, sexually mature, male and female rats (Sprague-Dawley line) were used. Animals weighing 250-300 g for females, and 400-450g for males were born and raised in our breeding colony. After 10 days quarantine period, animals were then randomly distributed into experimental and control groups. At the time of experiments the animals were housed at 25° C in standardized acrylic cages (five animals per cage) under a 12-12 h light/dark cycle, with free access to standard diet and tap water. This research project fulfilled all requirements of the University's Animal Care and Use for Research Protocol, which is based on the National Guidelines for Ethics and Biosafety under the General Law of Health for issues regarding Health Research, Ministry of Health, Mexico City.

### Magnetic Field Machine and Measurements

Magnetic fields were generated by a patented machine that combine PEMF's and SMF's exposure according to Davidson (2001). In summary; this machine comprised a quantity of permanent neodymium magnets arranged in a side-by-side relationship. Each permanent magnet being adjacent to the magnetic north pole and magnetic south pole of an adjacent permanent magnet, respectively. Thus, the plurality of these magnets forms a ring of permanent magnets. The device further includes an electrically conductive wire wound substantially around the ring, and tubing wrapped around the ring of permanent magnets between windings of the wire. A cooling device introduces a flow of coolant through the tubing. This machine also includes a control circuit, connected to the wire, for selectively generating a coil current for passing through the wire. The current has an AC component and a DC component. According to the manufacturer, the frequency of the AC component is programmable and is set to substantially match a resonant frequency associated with the organisms to be treated. Thus, the coil current creates an electromagnetic field that interacts with the magnetic field generated by the ring of permanent magnets to generate a complex field that causes ionic collisions within the cells to be treated. This device was originally designed to treat several types of cancer in humans (Davidson, 2001).

Magnetic flux density (rms) was measured in the middle of the ring where the magnetic fields were homogeneous using an axial Hall-effect probe (Bell FW 6010 teslameter, Orlando FL.) Moreover, an oscilloscope (BK-Precision model 2120) was coupled to the system to monitor the resultant field. A pulsed 120 Hz square wave form electromagnetic field was then generated, with a maximum peak of 17.6 mT (rms) at the center of the exposure zone where cages containing animals were placed. On the other hand, the SMF's were measured with the teslameter, setting the apparatus in DC mode, this value was a maximum peak of 8.6 mT at the middle of the exposure zone. Furthermore, the local geomagnetic field was measured by using an axial high sensitivity Hall probe (Integrity Design IDR-321 geomagnetometer,

Essex Jct., VT9) and the average value was 20  $\mu$ T within the exposure zone. The local temperature in the exposure zone was also measured setting the Bell FW 6010 teslameter in Temp mode. The measured temperature value was an average of  $25.3 \pm 0.5$  °C when the machine was on, and  $24.9 \pm 0.3$  °C when the machine was off, no statistically significant differences were observed between two conditions (Kolmogorov-Smirnov test for normality, followed by paired *t*-test).

## Experimental Protocol

Three experimental regimens were considered for bioassays: (a) 5 male and 5 female rats, independently exposed to 120 Hz PEMF's combined with SMF's for three consecutive days, two exposures of 50 min each with no-exposure intervals of 1 h between exposures, (b) 5 male and 5 female rats, independently exposed only to SMF's, without current in the coil, and (c) non-treated animals, including 5 males and 5 females without any magnetic exposure. During the no-exposure intervals, the cages containing the animals were allocated in the same exposure room where any detectable EMF was measured. In the case of micronuclei analysis, both male and female animals were used. For germ-cell tests, only males were analyzed.

## Micronucleus Test

Animals were killed at the end of exposure time. Following sacrifice, Acridine Orange fluorescent staining was applied to the micronucleus (MN) test, according to the previous described procedure (Hayashi et al., 1983). In summary; bone marrow from both femurs was flushed with 0.5 mL of fetal calf serum into a microfuge tube using a 1mL syringe fitted with a 22 G needle. The cells were concentrated by gentle centrifugation at 600x *g* for 1-3 min and a small drop of resuspended cells was placed on a clean microscope slide to make a thin smear. All smears were air-dried, fixed in absolute methanol and stained using Acridine Orange (Fisher Sci. Co., Fair Lawn, NY)

Coded slides were examined under x1000 magnification using a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. Immature, polychromatic erythrocytes (PCE's) were identified by their orange-red color, mature erythrocytes by their green color and the MN by their yellowish color. For each rat, 500 erythrocytes were examined to obtain the percentage of PCE's. In addition, for each rat, 2000 consecutive PCE's were examined to determine the incidence of MN. Decoding of the slides was done after completing the microscopic analysis.

## Male Germ Cells and Sperm Morphology Analysis

For sperm counts, orchidectomy was performed by open castration method. A midline or pre-scrotal incision was made and the testes were milked out on the incision site. The testicles were then exposed by incising the *tunica vaginalis*. The spermatic cord was exposed, ligated and incised. Semen samples were thereafter collected from the cauda

epididymis according to a previously described procedure of Oyeyemi and Ubiogoro (2005). These samples were then analyzed immediately after collection. The spermatozoa were scored by using an improved Neubauer chamber as described by Pant and Srivastava (2003).

For sperm morphology analysis, smears were prepared from epididymis following the previously described method of Wyrobeck (1979). Spermatozoa preparations were stained using 1% Eosin Y dye/1 h (Fisher Sci. Co., Fair Lawn, NY) and examined under high power magnification (x1000). 100 cells per slide, 10 smears for each animal, for a total of 5000 cells per analyzed group, were evaluated in a blind way, for the presence of bicephalic or biflagellate forms, and abnormalities in head shape such as enlarged and amorphous head were expressed as a percentage of sperm morphology abnormalities.

All reagents were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) unless otherwise specified.

### Statistical Analysis

The statistical differences among groups were estimated using analysis of variance for normal distributions. In the case of the percentage of sperm morphology abnormalities, the data obtained were first transformed by using the arcsine function. After this, an analysis of variance for normal distributions and the correspondent parametric Tukey test for establishing individual differences were performed. The normality of the data was determined by the Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0.05$ ). All analyses were done using the SPSS package version 22.0. Differences were considered to be significant when the probability values were lower than 0.05.

## 3 | RESULTS

The current *in vivo* study was aimed to evaluate the possible cytogenotoxic effects of magnetic field exposure from a patented therapeutic machine in both male and female Sprague-Dawley rats on the micronuclei frequency and PCE percentages, and on male germ cells; sperm counts, and sperm morphology abnormality percentages. In the figure 1, the frequency of micronuclei from bone marrow of exposed rats is showed. No statistically significant differences were found among groups in both male and female animals, suggesting no clastogenic effect induced by PEMF's or SMF's exposure ( $p > 0.05$ ). On the other hand, figure 2 shows the grouped means of percentages of polychromatic erythrocytes (PCE's) from the analyzed groups. These values indicated no statistically significant differences among groups, for both male and female animals ( $p > 0.05$ ). These results suggested that the number of PCE's were no altered by magnetic field exposure of both PEMF's or SMF's.



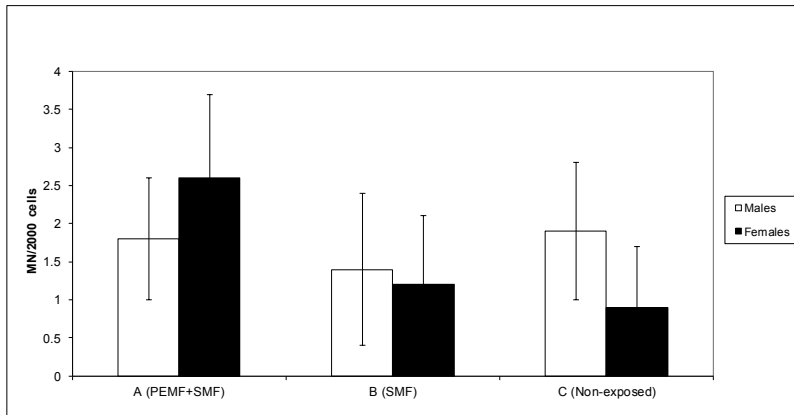


Figure 1. Micronucleus (MN) frequency from bone marrow polychromatic erythrocytes of Sprague Dawley rats. (a) animals exposed to 120 Hz PEMF's combined with SMF's for three consecutive days, two exposures of 50 min each with no-exposure periods of 1 h between exposures, (b) rats exposed to SMF's, without current in the coil, and (c) non-treated animals. No statistically significant differences were found among groups in both male and female animals ( $p > 0.05$ ). Bars represent grouped means  $\pm$  S.D.

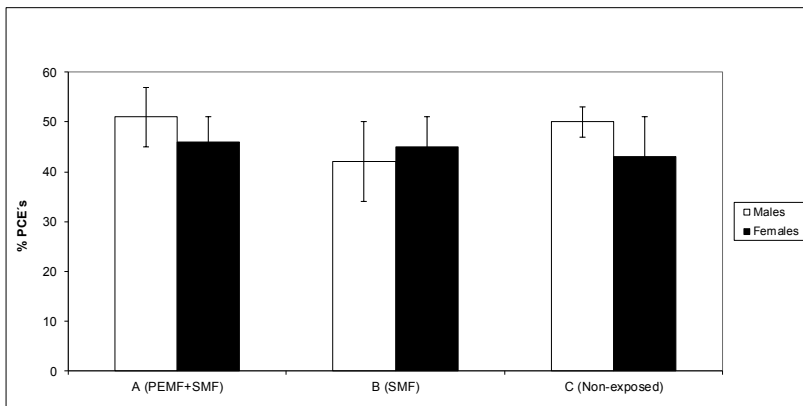


Figure 2. Percentages of polychromatic erythrocytes (PCE's) from bone marrow of Sprague Dawley rats. (a) animals exposed to 120 Hz PEMF's combined with SMF's for three consecutive days, two exposures of 50 min each with no-exposure periods of 1 h between exposures, (b) rats exposed to SMF's, without current in the coil, and (c) non-exposed animals. No statistically significant differences were found among groups in both male and female animals ( $p > 0.05$ ). Bars represent grouped means  $\pm$  S.D.

With regard to male germ cells analysis, the observed results showed no alterations in either the sperm counts (Figure 3), and morphological characteristics of spermatid cells (Figure 4) when compared the grouped means among groups ( $p > 0.05$ ).

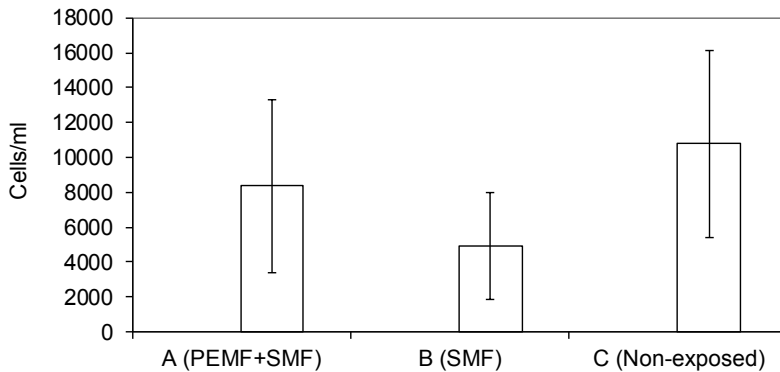


Figure 3. Effect of magnetic field exposure on sperm counts of Sprague Dawley rats. (a) animals exposed to 120 Hz PEMF's combined with SMF's for three consecutive days, two exposures of 50 min each with no-exposure periods of 1 h between exposures, (b) rats exposed to SMF's, without current in the coil, and (c) non-exposed animals. No statistically significant differences were found among groups ( $p > 0.05$ ). Bars represent grouped means  $\pm$  S.D.

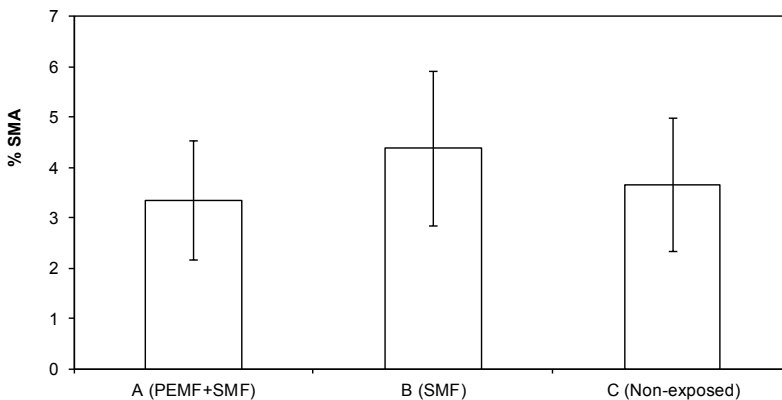


Figure 4. Percentages of sperm morphology abnormalities (SMA) in male germ cells of Sprague Dawley rats. (a) animals exposed to 120 Hz PEMF's combined with SMF's for three consecutive days, two exposures of 50 min each with no-exposure periods of 1 h between exposures, (b) rats exposed to SMF's, without current in the coil, and (c) non-exposed animals. No statistically significant differences were found among groups ( $p > 0.05$ ). Bars represent grouped means  $\pm$  S.D.

## 4 | DISCUSSION

Biomedical effects attributed to magnetic fields have been widely discussed during the last years. The question has been raised as to whether exposition to these fields can originate genetic damage or other biological disfunctions. On the other hand, since the early part of the 20<sup>th</sup> century, attempts had been undertaken to treat or otherwise cure human diseases using magnetic field techniques. However, many research reports agree that life organisms could be affected in a negative way by exposure to electromagnetic radiation

(Feychting et al., 2005). In the current study, we did not find any measurable genotoxic or cytotoxic effect induced in mature rats by an *in vivo* exposure to a therapeutic machine that combine PEMF's and SMF's exposure conditions.

Results presented here, indicated no alterations in micronuclei frequency and in PCE percentages of treated animals due to magnetic field exposure. These results agreed with previous reports that used the MN assay, indicating no genotoxic or cytotoxic effects induced by magnetic fields (Scarfi et al., 1994; Scarfi et al., 1999; Frahm et al., 2006; Okudan et al., 2010). Furthermore, it was observed that extremely-low frequency EMF's exposure at 1.0 mT and 60 Hz did not increase the MN frequency by ionizing radiation in mouse embryonic fibroblast NIH3T3 cells (Jin et al., 2012). On the contrary, there are several papers with positive results, indicating a genotoxic effect due to magnetic field exposure (Simkó et al., 1998; Celikler et al., 2009). Winker et al. (2005) also claimed for a clastogenic potential of low-frequency EMF's, which may lead to considerable chromosomal damage in dividing human diploid fibroblasts. Moreover, Erdal et al. (2007) found a higher MN frequency in Wistar rat tibial bone marrow cells treated with a long term extremely low-frequency EMF's exposure, in comparison to non-exposed or acutely exposed animals.

The controversial concern regarding EMF's cytogenotoxic effects, is originated from the fact that many scientists believe that EMF's therapeutic devices produce as a little quantity of energy and are therefore too weak to induce any alteration on cells. Moreover, the inconclusive nature of laboratory bioassays and the fact that there are no epidemiological studies of patients exposed to such therapeutic devices turns this concern very complex. In contrast, the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) included and categorized the extremely low frequency magnetic fields as "possibly carcinogenic to humans"; this was based on pooled analyses of epidemiological research that reported an association between exposure to low-level magnetic fields and several types of cancer.

With regard to the issue that weak fields may have too little energy to induce any genotoxic effect or DNA damage, it has been proposed that because low frequency electromagnetic radiation does not transmit enough energy to affect chemical bonds, then, it is generally accepted that extremely low frequency EMF's are not enable to cause DNA direct damage (Adair, 1998). On the other hand, several hypotheses have been put forward of how EMF's can alter the structure of DNA indirectly. Secondary currents and, hence, a movement of electrons in DNA might be induced (Valberg et al., 1997). This could generate guanine radicals, which, upon reaction with water may be converted to oxidative DNA damage (Giese, 2006). In a recent investigation, Focke et al. (2010) found that exposure of human primary fibroblasts to a 50 Hz EMF's at a flux density of 1.0 mT induced a slight but significant increase of DNA fragmentation as assessed by the Comet Assay. Furthermore, they observed that EMF-induced responses in the Comet Assay were dependent on cell proliferation, suggesting that DNA replication rather than the DNA itself may be altered.

On the other hand, the results obtained in the present research indicated that

exposure to pulsed EMF's or SMF's emitted by the therapeutic device showed no influence on sperm cells of exposed animals compared with the un-exposed controls. The sperm counts were not altered by exposure, suggesting no effect in cell cycle progression. These results coincided with the findings of Lundsberg et al. (1995) who found no association of occupational EMF exposure on sperm concentration among males. By the way, even with higher frequency electromagnetic radiation, Aitken et al. (2005) observed that sperm number, morphology and vitality of male germ cells were not significantly affected when mice were treated with 900 MHz radio-frequency electromagnetic radiation. On the contrary, Furuya et al. (1998) found that the application of EMF's at 50 Hz with intensities between 1.0 mT to 100 mT affected the proliferative and differentiative capacity of mouse spermatogonia. Moreover, anomalous effects on spermatogenesis in mice that were exposed to a 1.5-T static magnetic field were informed by Narra et al. (1996). Ramadan et al. (2002) also reported that exposure of mice to fractionated doses of high oscillating magnetic fields (20 mT) induced a statistically significant decreased sperm count, and daily sperm production. Likewise, a significant decreased sperm count was found in mature Sprague-Dawley rats exposed to a 50 Hz and 25 $\mu$ T for 18 consecutive weeks (Al-Akhras et al., 2006). Furthermore, Hong et al. (2005) reported that a 50 Hz EMF's exposure have the potential to induce DNA strand breaks in testicular cells and sperm chromatin condensation of exposed mice.

Regarding the sperm morphology abnormalities, the outlined results presented here are in good agreement of those of Withers et al. (1985) who did not find alterations in sperm heads, however, in their work they exposed mice to 0.3 T static magnetic fields from a magnetic resonance device. Similarly, the Spanish group of Tablado et al. (1998) demonstrated that morphological characteristics of epididymal sperm of mice were not affected after exposition to 0.7 T therapeutic magnets. We have previously published a lack of alterations on morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 mT magnetic fields (Heredia-Rojas et al., 2004). On the contrary, Roychoudhury et al. (2009) found alterations of spermatozoa and fertilization rates in rabbits exposed to 50 Hz magnetic fields. For human beings, it is generally accepted that there is some evidence that suggests that magnetic field exposure may have deleterious effects on sperm quality (De-Kun et al., 2010).

On the other hand, conflicting findings have been reported by Lorio et al. (2007) who observed significant increased values of kinematic parameters of spermatozoa after an exposure to EMF's of 5 mT and 50 Hz frequency. In contrast, a 5 mT sine wave (50 Hz) and a 2.5 mT square wave (50 Hz) exposure did not produce any significant alteration on sperm motility. These results indicate that EMF's exposure can improve spermatozoa motility, and that this effect depends on the field characteristics.

In conclusion, the current study suggested that an *in vivo* exposure to PEMF's combined with SMF's emitted by a patented therapeutic device, originally designed for treating several types of cancer in humans, did not have any measurable effect on MN frequency and PCE

percentages of exposed rats and on sperm counts and morphological characteristics of male germ cells. These results support, in part, the innocuity of this therapeutical machine in mammals. However, we consider that is necessary to carry out more research using various cell types and cytological endpoints under different experimental conditions to add more evidence of innocuity of the mentioned therapeutic device, and at the same time, help to clarify the controversy concerning the possible cytotoxic and genotoxic risk associated with a therapeutic magnetic field exposure.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. James G. Davidson for gently proportionated the PEMF's medical device. We also thank Dr. César Elizondo-González for his technical assistance in magnetic field exposure facilities and measurements. The present study was partially supported by PAICYT CN1548-21 and CN1548-21.

## REFERENCES

1. Adair R.K. (1998). **Extremely low frequency electromagnetic fields do not interact directly with DNA.** Bioelectromagnetics 19:136-138.
2. Ahlbom I.C., Cardis E., Green A., et al. (2001). **Review of the epidemiologic literature on EMF and health.** Environ Health Perspect 109(6):911-933.
3. Aitken R.J., Bennetts L.E., Sawyer D., et al. (2005). **Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline.** Int J Androl 28:171-179.
4. Al-Akhras M.A., Darmani H., Elbetieha A. (2006). **Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats.** Bioelectromagnetics 27(2):127-131.
5. Binhi V.N. (2012). **Two types of magnetic biological effects: individual and batch effects.** Biofizika 57(2):338-345.
6. Celikler S., Aydemir N., Vatan O., et al. (2009). **A biomonitoring study of genotoxic risk to workers of transformers and distribution line stations.** Int J Environ Health Res 19(6):421-430.
7. Cifra M., Fields J.Z., Farhadi A. (2011). **Electromagnetic cellular interactions (Review).** Prog Biophys Mol Biol 2011; 105:223-246.
8. Davidson J.G. (2001). **System and method for treating cells using electromagnetic-based radiation.** Patent No. 6,235,251 B1. United States of America.
9. De-Kun L., Bei Y., Zheng L., et al. (2010). **Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality.** Reprod Toxicol 29:86-92.

10. Erdal N., Gürgül S., Celik A. (2007). **Cytogenetic effects of extremely low frequency magnetic field on Wistar rat bone marrow.** *Mutat Res* 630(1-2):69-77.
11. Feychting M., Ahlbom A., Kheifets L. (2005). **EMF and health.** *Annu Rev Public Health* 26:165-189.
12. Focke F., Schuermann D., Kuster N., et al. (2010). **DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure.** *Mutat Res* 683:74-83.
13. Frahm J., Lantow M., Lupke M., et al. (2006). **Alteration in cellular functions in mouse macrophages after exposure to 50 Hz magnetic fields.** *J Cell Biochem* 99(1):168-177.
14. Furuya H., Aikawa H., Hagino T., et al. (1998). **Flow cytometric analysis of the effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis.** *Nippon Eiseigaku Zasshi* 53(2):420-425.
15. Giese B. (2006). **Electron transfer through DNA and peptides.** *Bioorg Med Chem* 14:6139-6143.
16. Grosel A., Sersa G., Kranjc S., et al. (2006). **Electro-gene therapy with p53 of murine sarcomas alone or combined with electrochemotherapy using cisplatin.** *DNA Cell Biol* 25(12):674-683.
17. Haro A.M.R., Smyth A., Hughes P., et al. (2005). **Electro-sensitisation of mammalian cells and tissues to ultrasound: a novel tumour treatment modality.** *Cancer Lett* 222(1):49-55.
18. Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. (1983). **An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test.** *Mutat Res* 120:241-247.
19. Heredia-Rojas J.A., Caballero-Hernández D.E., Rodríguez-De la Fuente A.O., et al. (2004). **Lack of alterations on meiotic chromosomes and morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 mT magnetic field.** *Bioelectromagnetics* 25:63-68.
20. Hong R., Zhang Y., Liu Y., et al. (2005). **Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on DNA of testicular cells and sperm chromatin structure in mice.** *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 23(6):414-417.
21. Hug K., Grize L., Seidler A., et al. (2010). **Parental occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and childhood cancer: a German case-control study.** *Am J Epidemiol* 1:17(1):27-35.
22. IARC. (2002). **Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, Part I: Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields.** Lyon, IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (p. 80).
23. Jauchem J.R., Merritt J.H. (1991). **The epidemiology of exposure to electromagnetic fields: an overview of the recent literature.** *J Clin Epidemiol* 44:895-906.
24. Jin Y.B., Kang G.Y., Lee J.S., et al. (2012). **Effects on micronuclei formation of 60-Hz electromagnetic field exposure with ionizing radiation, hydrogen peroxide, or c-Myc overexpression.** *Int J Radiat Biol* 88(4):374-380.

25. Lorio R., Scrimaglio R., Rantucci E., et al. (2007). **A preliminary study of oscillating electromagnetic field effects on human spermatozoon motility.** *Bioelectromagnetics* 28:72-75.
26. Lundsberg L.S., Bracken M.B., Belanger K. (1995). **Occupationally related magnetic field exposure and male subfertility.** *Fertil Steril* 63:384-391.
27. Macklis R.M. (1993). **Magnetic healing, quackery, and the debate about the health effects of electromagnetic fields.** *Ann Intern Med* 118(5):376-383.
28. Milham S. Jr. (1982). **Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields (letter).** *N Engl J Med* 307(4):249.
29. Miller A.B., Green L.M. (2010). **Electric and magnetic fields at power frequencies.** *Chronic Dis Can* 29(1):69-83.
30. Narra V.R., Howell R.W., Goddu S.M., et al. (1996). **Effects of a 1.5-Tesla static magnetic field on spermatogenesis and embryogenesis in mice.** *Invest Radiol* 31:586-590.
31. Okudan N., Celik I., Salbacak A., et al. (2010). **Effects of long-term 50 Hz magnetic field exposure on the micro-nucleated polychromatic erythrocyte and blood lymphocyte frequency and argyrophilic nucleolar organizer regions in lymphocytes of mice.** *Neuro Endocrinol Lett* 31(2):208-214.
32. Oyeyemi M.O., Ubiogoro O. (2005). **Spermiogram and morphological characteristics in testicular and epididymal spermatozoa of Large White Boar in Nigeria.** *Int J Morphol* 23(3):235-239.
33. Pant N., Srivastava S.P. (2003). **Testicular and spermatotoxic effect of quinaphos in rats.** *J Appl Toxicol* 23:271-274.
34. Pearce M.S., Hammal D.M., Dorak M.T., et al. (2007). **Paternal occupational exposure to electromagnetic fields as a risk factor for cancer in children and young adults: a case-control study from the North of England.** *Pediatr Blood Cancer* 49(3):280-286.
35. Ramadan L.A., Abd-Allah A.R., Aly H.A., et al. (2002). **Testiculat toxocity effects of magnetic field exposure and prophylectic role of coenzyme Q10 and l-carnitine in mice.** *Pharmacol Res* 46: 363-370.
36. Roychoudhury S., Jedlicka J., Parkanyi V., et al. (2009). **Influence of a 50 Hz extra low frequency electromagnetic field on spermatozoa motility and fertilization rates in rabbits.** *J Environ Sci Health A Tox. Hazard Subst Environ Eng* 44(10):1041-1047.
37. Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., et al. (1994). **Lack of chromosomal aberration and micronucleus induction in human lymphocytes exposed to pulsed magnetic fields.** *Mutat Res* 306:129-133.
38. Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., et al. (1999). **Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields.** *Health Physics* 76(3):244-250.

39. Simkó M., Kriehuber R., Weiss D.G., et al. (1998). **Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and non-transformed human cell lines.** *Bioelectromagnetics* 19:85-91.
40. Tablado L., Pérez-Sánchez F., Nuñez J., et al. (1998). **Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm.** *Bioelectromagnetics* 19:377-383.
41. Valberg P.A., Kavet R., Rafferty C.N. (1997). **Can low level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?** *Radiat Res* 148:2-21.
42. Winker R., Ivancsits S., Pilger A., et al. (2005). **Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields.** *Mutat Res* 585(1-2):43-49.
43. Withers H.R., Mason K.A., Davis C.A. (1985). **MR effect on murine spermatogenesis.** *Radiology* 156:741-742.
44. Wyrobeck A.J. (1979). **Changes in mammalian sperm morphology after X-ray and chemical exposures.** *Genetics* 92: S105-S119.



# CAPÍTULO 9

## SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO DERIVADO TIAZACRIDÍNICO LPSF/AA-57

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 26/09/2021

### **Marcel Lucas de Almeida**

Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-Pernambuco  
<https://orcid.org/0000-0002-1603-8391>

### **Valécia de Cassia Mendonça da Costa**

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/8587288704480001>

### **Michelly Cristiny Pereira**

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/2732440502722790>

### **Ivan da Rocha Pitta**

Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/0925726638062356>

### **Marina Galdino da Rocha Pitta**

Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6491144323495041>

**RESUMO:** Os derivados tiazacridínicos têm sido bastante explorados no desenvolvimento de novos fármacos, com objetivo de possuírem funções terapêuticas como atividades anticâncer, antibacteriana e antiviral, devido principalmente, a suas capacidades de intercalação ao DNA e inibição da enzima topoisomerase II. Os derivados acridínicos podem possuir substituintes estruturais diferenciados que lhes conferem atividades citotóxicas singulares. Com isso, este núcleo químico apresenta potencial para a descoberta de novos fármacos mais seletivos e menos tóxicos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo sintetizar de forma eficiente o derivado tiazacridínico LPSF/AA-57, uma junção da acridina com a tiazolidina. A partir de uma reação de Adição de Michael, o composto foi sintetizado, também foi realizado sua caracterização estrutural, avaliação do seu grau de pureza e desvendado o seu perfil de fragmentação utilizando as técnicas de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Espectroscopia de infravermelho (IV) e Espectrometria de massas (EM). Após esta etapa, também foi feito testes biológicos em células cancerígenas, com resultados interessantes em

algumas linhagens celulares tumorais, como as linhagens HI-60, K562, Jurkat.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síntese Orgânica; Tiazacridinas; Anticâncer; Química Medicinal.

## SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE LPSF/AA-57 TIAZACRIDINIC DERIVATIVE

**ABSTRACT:** Thiazacridine derivatives have been widely explored in the development of new drugs, with the objective of having therapeutic functions such as anticancer, antibacterial and antiviral activities, mainly due to their DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II enzyme. Acridine derivatives may have differentiated structural substituents that give them unique cytotoxic activities. Thus, this chemical nucleus has the potential to discover new, more selective and less toxic drugs. Therefore, the present study aimed to efficiently synthesize the thiazacridine derivative LPSF/AA-57, a junction of acridine and thiazolidine. From a Michael Addition reaction, the compound was synthesized, was also carried out its structural characterization, evaluation of its degree of purity and its fragmentation profile was unveiled using the techniques of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Spectroscopy of infrared (IR) and mass spectrometry (MS). After this step, biological tests were also carried out on cancer cells, with interesting results in some tumor cell lines, such as HI-60, K562, Jurkat.

**KEYWORDS:** Organic Synthesis; Thiazacridines; Anticancer; Medicinal Chemistry.

## 1 | INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. De acordo com o Ministério da Saúde, a incidência de câncer vem aumentando consideravelmente. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou cerca de 600 mil casos novos da doença em 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Atualmente, a principal forma de tratamento desta doença é a quimioterapia, podendo ser auxiliada pela radioterapia e/ou cirurgia. No entanto os quimioterápicos disponíveis no mercado trazem aos pacientes inúmeros efeitos colaterais devido à baixa especificidade, diminuindo bastante sua qualidade de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Graças às recentes descobertas de novos alvos biológicos do câncer e pela possibilidade de desenvolver novos agentes anticâncer com mais alta eficácia e seletividade, bem como menor citotoxicidade, a procura de novos agentes inovadores é de extrema importância (RAZA *et al.*, 2012).

Uma das classes de moléculas que tem sido estudada devido a sua baixa toxicidade e alta eficiência são as Tiazacridinas. Esta classe de compostos apresenta em sua estrutura química um núcleo acridínico formado por três anéis aromáticos fundidos com um nitrogênio no anel central e um núcleo tiazolídínico formado por um anel heterocíclico pentagonal contendo um átomo de enxofre na posição 1, um de nitrogênio na posição 3, e uma carbonila nas posições 2 e 4 (GALDINO-PITTA *et al.*, 2013).

Alguns estudos já foram realizados com derivados tiazacridínicos, estes compostos

são agentes intercalantes de DNA e tem demonstrado ter uma vasta gama de atividades biológicas, tais como antidepressiva, anti-inflamatória, e principalmente como anticâncer (VICTORIA *et al*, 2013; GALDINO-PITTA *et al*, 2013; LANG *et al*, 2013).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar de forma rápida e eficiente o derivado tiazacridínico (LPSF/AA-57) e caracterizá-lo estruturalmente através da técnica de Espectrometria de Massa (MS), Infravermelho (IV) e Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) visando esclarecer o seu perfil de fragmentação e avaliar a pureza do produto. Bem como, também teve como objetivo analisar sua atividade biológica em linhagens cancerígenas Jukart, RAJI, HL 60, K562, Du 145 e Molt-4.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do composto LPSF/AA-57 foi realizada através de uma reação de Adição de Michael em que reagiu quantidades equimolares do reagente intermediário AA-1A (3-Acridina-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona), sintetizado previamente, solubilizado em etanol, junto com um outro reagente da série IP (Ésteres de Cope), também previamente sintetizado. Por último é adicionado o catalisador morfolina. A solução foi mantida à 65°C por cerca de 4h sob refluxo e agitação magnética. A reação foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Ao fim da síntese, o produto foi filtrado (CHAGAS *et al.*, 2017).

Para caracterização do LPSF/AA-57 foi utilizada a técnica do Espectrômetro de Massa (ESI-MS<sub>(n)</sub> HCTultra). A análise por MS transcorreu no modo positivo, utilizando-se hélio como gás de arraste e voltagem do capilar de 4500v. A temperatura do gás de secagem foi de 250°C e o scan utilizado foi de 100-500 m/z. O nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador a uma pressão de 10 psi. Na técnica de espectrofotometria de Infravermelho (FTIR) as amostras foram preparadas em forma de pastilha de Brometo de Potássio (KBr) na proporção de 1:100. Para a análise da pureza do composto foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as amostras foram solubilizadas em acetonitrila (ACN) na proporção de 0,2 mg/mL, com os solventes Metanol (MeOH) e ACN servindo de fase móvel.

As culturas celulares utilizadas para os testes com o composto AA-57 foram às seguintes: Células de tumor hematopoiéticas Jukart (leucemia de células T aguda) e MOLT-4; RAJI (células de linfoma Burkitt's); HL60 (leucemia promielocítica aguda); K562 (leucemia mielogênica crônica); DU-145 (câncer da próstata) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico primário). Os quais foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Corporation) suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina, 0,25 mg /ml Fungizon e 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Invitrogen Life Technologies) numa atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

Os testes biológicos foram realizados do seguinte modo: A viabilidade celular foi medida usando o MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

seguinto as instruções do fabricante. Resumidamente, as células ( $1 \times 10^4$ /poços) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com várias concentrações do derivado tiazacridínico ao longo de um tempo de 72 horas. Utilizou-se o quimioterapêutico Amsacrina como controle positivo para a análise de toxicidade. No final da incubação, a absorvância foi lida a 570 nm. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de síntese do composto 3-(Acridin-9-ilmetil)-5-(3(trifluorometoxi)benzilideno)tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-57) é relativamente simples e apresentou rendimento em torno de 61%, podendo ser considerada uma técnica rápida, eficiente e segura. O composto teve seu Ponto de Fusão (PF) e Índice de Retenção (RF) de  $195.8^\circ\text{C}$  e 0,45 (n-Hexano/AcOEt 7:3), respectivamente. Com a utilização da técnica de Espectrometria de Massa foi possível identificar, através do +MS2 (Fig. 1), o padrão de fragmentação do composto LPSF/AA-57. No espectro os seguintes picos  $m/z$  foram identificados: o (M+H)  $m/z = 481$ , relativo a formação do aduto entre o íon molecular 480 e uma molécula de Hidrogênio; o (M+H)  $m/z = 193$ , contendo a porção acridínica e um  $\text{CH}_2$ ; e o (M+H)  $m/z = 235$ , relacionado a porção acridínica e parte do anel tiazolidínico.

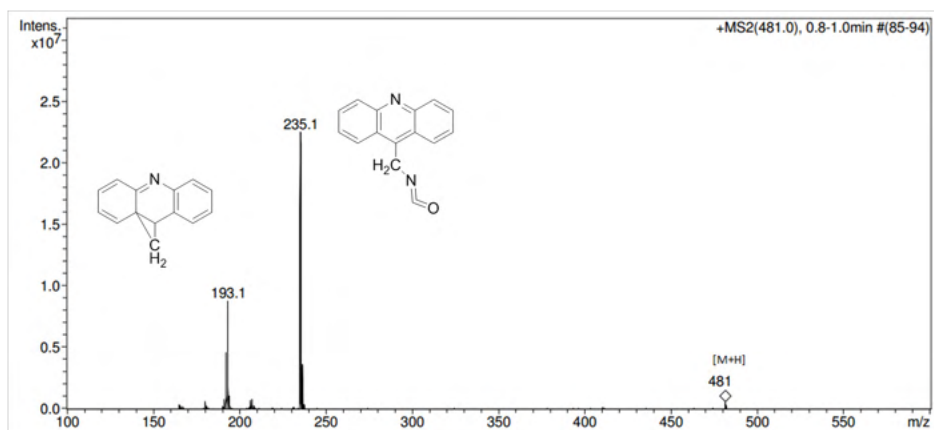
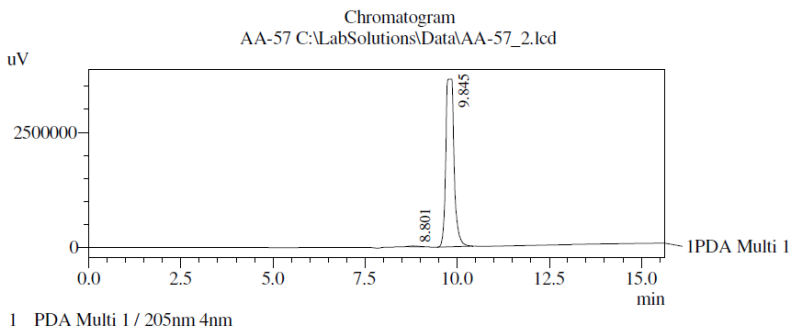


Figura 1- Espectro de Massas (+MS2) por IES do LPSF/AA-57 ( $M = 480$ ). Identificação dos Fragmentos de  $m/z$  180, 193, 235.

Também foi possível comprovar a pureza da amostra através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Fig. 2), podendo ser considerada satisfatória ( $\geq 99\%$ ), em que o composto LPSF/AA-57 teve tempo de retenção ( $T_r$ ) de 9,845 min.



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.801	252240	15285	0.440	0.418
2	9.845	57045684	3644339	99.560	99.582
Total		57297924	3659624	100.000	100.000

Figura 2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a pureza do composto tiazacridínico AA-57

As bandas principais observadas no espectro de Infravermelho do composto LPSF/AA-57 foram as das ligações entre C=C, C-H, C-N e C=O. Estes dados serviram como suporte para a caracterização do composto sintetizado, como pode ser visto na figura 3.

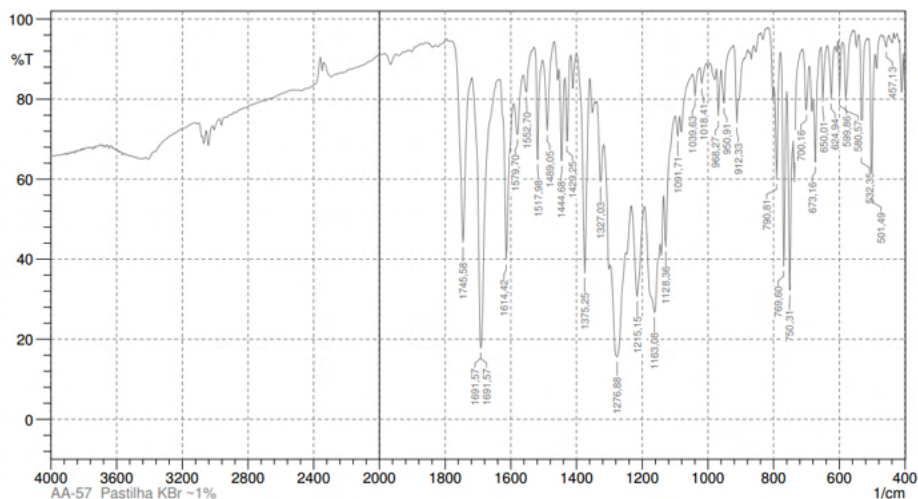


Figura 3- Espectro de IV do LPSF AA- 57. Deformação axial normal de C=O, 1745  $\text{cm}^{-1}$ , 1691  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1614  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação axial de C-N, 1375  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 750  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular de C=C, 673  $\text{cm}^{-1}$

A citotoxicidade do derivado tiazacridínico foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de indivíduos saudáveis e em linhagens de células

tumorais de diferentes histotipos. O composto foi testado em concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. As concentrações de droga que inibiu o crescimento celular em 50% em comparação com células não tratadas ( $\text{IC}_{50}$ ) estão resumidos na Tabela 1. Assim, ela mostrou atividade anticancer em 3 das linhagens testadas (HL 60, K562, Jurkat), em especial o HL 60, e não apresentou citotoxicidade nas células saudáveis (PBMC).

Valores da $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )							
Linhagens celulares							
Composto	HL 60	K562	Molt-4	Du-145	Raji	Jurkat	PBMCs
AA-57	37,77 $\pm$ 18,53	51,82 $\pm$ 7,84	>100	>100	>100	44,07 $\pm$ 22,55	>100

Tabela 1 – Concentrações do composto AA-57 que inibiram o crescimento celular em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) nas linhagens de células cancerígenas e PBMCs em  $\mu\text{M}$ .

## 4 | CONCLUSÕES

A metodologia de síntese empregada obteve um bom rendimento do composto LPSF/AA-57, o qual através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, teve seu grau de pureza considerado satisfatório. Além disso, foi possível comprovar sua estrutura química através do seu padrão de fragmentação no modo +MS2 gerado pela Espectrometria de massa. Além disso, os testes antitumorais mostraram que estes derivados podem ter resultados importantes na busca de compostos mais seletivos e menos tóxicos para o tratamento do câncer. Sendo assim, podemos considerar que a metodologia de síntese aqui descrita é uma excelente forma para se obter derivados tiazacridínicos de forma simples, econômica e segura.

## AGRADECIMENTOS

Ao NUPIT SG, UFPE, INCT-if, FACEPE, CNPq e CAPES pela infraestrutura e pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2014. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa\\_2014.pdf](https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf)>. Acesso em: 24 set. 2021.
2. GALDINO-PITTA, M. R.; SOUZA, E. S.; BARROS, F. W. A.; MORAES FILHO, M. O.; PESSOA, C. O.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. **Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives**. Medicinal Chemistry Research, v.28, p.2421-2429, 2013.

3. CHAGAS, M. B. O.; CORDEIRO, N. C. C.; MARQUES, K. M. R.; PITTA, M. G. R.; RÉGO, M. J. B. M.; LIMA, M. C. A.; PITTA, M. G. R.; PITTA, I. R. **New thiazacridine agents: Synthesis, physical and chemical characterization, and in vitro anticancer evaluation.** Human and Experimental Toxicology, v.36, p. 1059-1070, 2017.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil**, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017. Disponível em: <<https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil/>>. Acesso em: 24 set. 2021.
5. LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. **Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.21, p.4170–4177, 2013.
6. RAZA, A.; JACOBSON, B. A.; BENOIT, A.; PATEL, M. R.; DIXON, J. J.; HIASA, H.; FERGUSON, D. M.; KRATZKE, R. A. **Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis.** Invest New Drugs, v.30, p.1443–1448, 2012.
7. VICTORIA, F.N.; MARTINEZ, D.M.; CASTRO, M.; CASARIL, A.M.; ALVES, D.; LENARDÃO, E.J.; SALLES, H.D.; SCHNEIDER, P.H.; SAVEGNAGO, L. **Antioxidant properties of (R)-Se-aryl thiazolidine-4-carboselenoate.** Chemico-Biological Interactions, v.205, p.100-107, 2013.

# CAPÍTULO 10

## CONCEPÇÃO DE CLÍNICA AMPLIADA E OS DESAFIOS DAS PRÁTICAS EM SAÚDE MENTAL NA ATUALIDADE

*Data de aceite: 10/01/2022*

*Data de submissão: 14/10/2021*

### **Celian Araújo da Nóbrega Souza**

Centro Universitário UNIFIP Patos, Paraíba  
Curso de Bacharelado em Serviço Social  
<http://lattes.cnpq.br/8503395282861196>

### **Carmen Silva Alves**

Centro Universitário UNIFIP Patos, Paraíba  
Curso de Bacharelado em Serviço Social  
<http://lattes.cnpq.br/2344504320743036>

Artigo de pesquisa original apresentado ao Curso de Bacharelado em Serviço Social do Centro Universitário de Patos (UNIFIP), como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Serviço Social.

**RESUMO:** O presente trabalho delineou a percepção da equipe multiprofissional a respeito das práticas desenvolvidas na perspectiva de clínica ampliada no Centro de Atenção Psicossocial - CAPS I – Dr. Fernando Antônio de Araújo, localizado em Santa Luzia/PB. Para a obtenção dos resultados, foi utilizada como metodologia à pesquisa de campo, descritiva, explicativa com análise qualitativa dentre uma abordagem de cunho bibliográfico à luz do método crítico dialético. Os dados dessa pesquisa foram coletados através de um questionário semiestruturado. Os resultados foram analisados sobre a ótica de análise de conteúdo, a partir de contribuições teóricas existentes na literatura.

Constatou-se que a proposta de Reforma Psiquiátrica trouxe uma nova roupagem para tratar o sofrimento psíquico, indicando a adoção de ações interdisciplinares desenvolvidas a partir das equipes multiprofissionais, voltando-se para o estabelecimento de uma ampliação da clínica, superando a hierarquização dos saberes, valorizando a participação do usuário e da família, ao qual se direciona a clínica de saúde mental. A partir da apreciação dos resultados, foi possível observar que na instituição em questão, a clínica ampliada fica restrita ao trabalho multiprofissional. A falta da constância de reuniões e diálogos entre a equipe é um dos fatores que sinaliza ações isoladas no cotidiano do serviço, inclusive na construção e reconstrução do PTS. Assim sendo, o trabalho multidisciplinar se sobressai em relação ao trabalho interdisciplinar e provoca impasses na hora de tecer o cuidado. Observa-se que, apesar de a instituição promover atividades desenvolvidas pelas especialidades que compõe a equipe técnica, são evidenciadas dificuldades em executar ações concernentes com a política de saúde mental, pelo fato dos desafios estarem postos na própria organização multidisciplinar, dentro da própria equipe.

**PALAVRAS-CHAVE:** Clínica ampliada. Interdisciplinaridade. Reforma Psiquiátrica.

### CONCEPT OF EXPANDED CLINIC AND THE CHALLENGES OF MENTAL HEALTH PRACTICE NOWADAYS

**ABSTRACT:** This project outlined the perception of the multidisciplinary team regarding the practices developed in the perspective of



expanded clinic at the Psychosocial Care Center - CAPS I - Dr. Fernando Antônio de Araújo, located in Santa Luzia, PB. To get the results it was used as methodology the descriptive and explanatory field research with qualitative analysis and bibliographic approach based on the dialectical critical method. The data of this research were collected from a semi-structured questionnaire. From the theoretical contributions in the literature it was used the perspective of content analysis to analyse the results. From this perspective it can be noticed that the Psychiatric Reform proposal brought a new view to treat psychological distress, it has showed the adoption of interdisciplinary actions developed from multiprofessional teams; it has aimed at establishing an expansion of the clinic; it has overcome the hierarchy of knowledge and it has valued the participation of the patient and the family who the mental health clinic is aimed. From the assessment of the results it was possible to perceive that the expanded clinic is restricted to multiprofessional work. The lack of a satisfactory number of meetings and dialogues accomplished by the work is one of the factors that point out isolated actions in the daily life of the service and also in the construction and reconstruction of the PTS. Therefore, the multidisciplinary work stands out in comparison to interdisciplinary work and causes impasses about the care work. Although the institution promotes developed activities by the technical team specialties it is noticed that difficulties to carry out actions concerning the mental health policy due to the fact that the challenges are placed in the multidisciplinary organization itself and the team work itself.

**KEYWORDS:** Expanded clinic. Interdisciplinarity. Psychiatric Reform.

## 1 | INTRODUÇÃO

A temática “Concepção de clínica ampliada e os desafios das práticas em saúde mental na atualidade” foi idealizada a partir das vivências no campo de estágio curricular obrigatório I e II do Curso de Bacharelado em Serviço Social, do Centro Universitário (UNIFIP) considerando as observações acerca da clínica ampliada no Centro de Atenção Psicossocial (CAPS I) Dr Fernando Antônio de Araújo, localizado em Santa Luzia, município do Estado da Paraíba.

A pesquisa teve como fio condutor elucidar os desafios acerca do trabalho da clínica ampliada na instituição, identificando as articulações entre a prática e a teoria no que diz respeito à Reforma Psiquiátrica. Nesse sentido, a avaliação do trabalho interdisciplinar na instituição, respalda o entendimento para analisar sobre as práticas profissionais que são desenvolvidas nos serviços ofertados pelo CAPS I, em Santa Luzia/PB.

A pesquisa proporcionou uma reflexão sobre a reabilitação psicossocial em todos os segmentos: físico, psíquico e social, não apenas associado à cura de doenças. Nesse sentido, deu-se a importância de apresentar subsídios que estabeleçam uma reflexão sobre a prática do trabalho multiprofissional, organizado em ações fragmentadas.

Consideramos que esse debate seja necessário, tendo em vista, que o tema proposto apresenta relevância pelo fato de fomentar nas equipes que atuam na política de saúde mental, uma consciência constante para promover a articulação dos saberes, pautada na consolidação da proposta da Reforma Psiquiátrica, com contribuições para

a ruptura tradicional, marcadas por extensas internações nos hospitais psiquiátricos e manicômios, caracterizados por isolamento, violências, abandonos, perda de vínculos familiares, segregação e uso indiscriminado de medicamentos.

Como objetivo geral, este trabalho pretende analisar como a equipe multiprofissional atua na perspectiva da Clínica Ampliada, a partir das práticas desenvolvidas no CAPS I, na cidade de Santa Luzia, Paraíba. Os objetivos secundários verificar como se desenvolve as práticas em saúde mental da equipe do CAPS I, sob as prerrogativas da Reforma Psiquiátrica; conhecer a percepção dos profissionais do CAPS I sobre o desenvolvimento de práticas interdisciplinares, para fins de superação da hierarquização dos saberes multiprofissionais; averiguar como a equipe multidisciplinar do CAPS I, buscam a superação do binômio saúde-doença, a partir da perspectiva da Clínica Ampliada; e elencar as possibilidades e os desafios enfrentados pela equipe multidisciplinar para a efetivação da Clínica Ampliada.

## 2 | METODOLOGIA

O presente estudo inicia-se a partir do levantamento bibliográfico, com intuito de abordar discursões da literatura, que implica no entendimento sobre a temática apresentada. Trata-se de uma pesquisa qualitativa, utilizando-se da pesquisa de campo descritiva e explicativa à luz do método crítico dialético, que com base em Minayo (2009, p. 21) aplica-se com a pesquisa qualitativa, a qual “trabalha com o universo dos significados, dos motivos, das aspirações, das crenças, dos valores e das atitudes”. Nesse sentido, considera a importância de descrever os dados, utilizando a interpretação dos fenômenos de uma forma totalizante, considerando que os fatos sociais não são compreendidos de forma isolada.

A pesquisa foi realizada no Centro de Atenção Psicossocial I - Dr. Fernando Antônio de Araújo, localizado em Santa Luzia-PB. O público alvo foi composto pela equipe técnica contando com 07 profissionais, representando um percentual de 100% do universo. Foi usado para a coleta de dados um questionário, contendo perguntas objetivas e subjetivas, para traçar o perfil profissional, assim como para elencar as integrações e desafios acerca do trabalho da clínica ampliada na instituição. Os dados coletados da pesquisa foram analisados utilizando o método de análise de conteúdo, conforme indicações de Bardin (1979, p.42) que afirma, “[...] indicadores (quantitativos ou não) que permitem a inferência de conhecimentos relativos às condições de produção/recepção (variáveis inferidas) destas mensagens”.

Durante o procedimento da pesquisa, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) revelando a natureza do trabalho e os aspectos éticos, no que diz respeito à contribuição dos participantes. A proposta da pesquisa foi previamente validada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário d- UNIFIP, sendo o parecer favorável para a realização da mesma.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CAPS I é uma instituição pública municipal, que estar em consonância com a Política Nacional de Saúde Mental. Sendo assim, a instituição atende em seu cotidiano demandas, nas quais é possível visualizar impasses e desafios para a materialização do serviço, contemplando o que estar previsto na Reforma Psiquiátrica. Os atendimentos do CAPS I – Dr. Fernando Antônio de Araújo ocorrem em sua área de abrangência, equivalente ao vale do Sabugi, composto pelas cidades de Santa Luzia, São José do Sabugi, São Mamede, Junco do Seridó e Várzea.

Nessa perspectiva, a presente pesquisa tratou de obter elementos que caracterize a ampliação da clínica no CAPS I de Santa Luzia, seguindo os preceitos que materializa a Reforma Psiquiátrica. Com isso, constatar por parte das especialidades que compõe a equipe multiprofissional, se existe o hábito de promover ações interdisciplinares que contribuam com uma assistência integral, capaz de modificar velhas práticas que insistem em permanecer amarradas no cotidiano dos serviços substitutivos..

Conforme os resultados apresentados, a equipe de nível superior é composta por 02 Psicólogos, 02 Assistentes Sociais, 01 Enfermeiro, 01 Educador Físico e o médico psiquiatra, totalizando o quantitativo correspondente a 07 profissionais que atuam no CAPS I. Com isso, a instituição realiza atendimentos, promovendo a diversidade de saberes na assistência aos seus usuários. Desta forma, em consonância com a portaria 224 instituída em 1992 pelo Ministério da Saúde, fica evidenciada uma assistência multiprofissional na instituição em questão (SILVA, OLIVEIRA, KAMIKURA, 2014). A respeito dessa organização é possível sinalizar que:

As equipes técnicas devem organizar-se para acolher os usuários, desenvolver os projetos terapêuticos, trabalhar nas atividades de reabilitação psicossocial, compartilhar do espaço de convivência do serviço e poder equacionar problemas inesperados e outras questões que porventura demandem providências imediatas, durante todo o período de funcionamento da unidade (BRASIL, 2004, p. 27).

Apesar de o serviço estar estruturado com presença de uma equipe multiprofissional, para além dos resultados obtidos com a pesquisa, observou-se que uma grande demanda de atendimento dos usuários ao serviço, ocorre no dia de atendimento médico. Isso mostra a dimensão sociocultural, arraigada à clínica tradicional, a qual centraliza na figura do médico a perspectiva do cuidar, medicar, curar, evidenciando assim, o *status* da profissão em detrimento aos demais saberes presentes no mesmo espaço. Deste modo, a medicalização ou a presença do receituário médico é uma constância neste “novo” espaço psicossocial.

Sob o ponto de vista da nova política de saúde mental, essas práticas descaracterizam os procedimentos voltados a uma reabilitação psicossocial, vinculada a ideia da interdisciplinaridade das ações capsianas, mantendo-se a interpretação que garante um modelo de assistência centrado na figura do médico. Essas questões, longe de ser uma

crítica à pessoa do médico, precisam ser levantadas e refletidas pelas equipes de saúde mental, sob pena de manutenção da clínica fechada, conservadora, tradicionalista, no interior desses espaços de reabilidades, que está para além do que é “doente” e “mal visto” pela sociedade, assim, reafirmamos as palavras de Amarante (2007, p. 16) “saúde mental não é apenas psicopatologia, é uma complexa rede de saberes que se entrecruzam”.

A Reforma Psiquiátrica é um processo evolutivo que traz uma abordagem teórica, capaz de propor na prática, ações, seja por meio dos atores que compõe essas estratégias antimanicomiais (profissionais, usuários, familiares), atrelados a uma rede de assistência em serviços extras-hospitalares. Toda essa articulação possibilita uma Atenção Psicossocial compartilhada, capaz de atender as demandas dos usuários, e contribuir para uma melhor qualidade de vida, respeitando as diferenças através da condição de inclusão dessas pessoas no convívio da sociedade,

Desde então, a reforma psiquiátrica brasileira promoveu importantes mudanças na assistência, entre as quais a valorização da inserção social e cidadania dos usuários, a assunção de instituições extra-hospitalares como os CAPS (Centros de Atenção Psicossocial) à posição de sustentáculos da rede de serviços e a própria defesa da interdisciplinaridade (VASCONCELLOS, 2010, p. 03).

Atentamos para verificar como ocorre o entendimento sobre estas práticas no CAPS I de Santa Luzia, por isso abordamos sobre qual é o significado da Reforma Psiquiátrica para os entrevistados. Ao passo em que respondem:

A Reforma Psiquiátrica significa fazer saúde mental de forma humanizada, numa perspectiva de ressocialização, de inclusão do sujeito com transtorno mental e denunciar as antigas formas, digo, práticas manicomiais. Esse movimento foi um marco na Política de Saúde Mental que, a partir de então, foram pensados pontos objetivos tais como a criação de uma Rede de Atenção Psicossocial composta por várias instituições que vão desde as ESF, passando pelos CAPS, até os leitos em saúde mental nos hospitais gerais como estratégias de substituir as antigas práticas. (Respondente B)

A Reforma Psiquiátrica representa rupturas aos paradigmas sobre a doença mental, propõe novas diretrizes e percepções mais humanas e viabilizando a reinserção social, quebrando preconceitos e estigmas, assim como a segregação. Percebo como significante e imprescindível para o desenvolvimento salutar para a saúde mental. (Respondente F)

De modo geral, os trechos acima evidenciam um bom entendimento sobre a Reforma Psiquiátrica, de acordo com a revisão de literatura. Na ocasião é possível sinalizar a preocupação dos entrevistados em abordar práticas de inclusão social, justificando com clareza o intuito de romper com o modelo manicomial que usa o método de trancar para tratar.

Por outra visão, é válido ressaltar a importância da Reforma Psiquiátrica em termos de mudanças na forma de ressignificar o tratamento do sujeito acometido de transtorno mental. Porém, de acordo com a exposição da fala abaixo, há uma preocupação de não

existir de fato uma rede de cuidados, onde possa se efetivar a assistência ao indivíduo que necessita de um atendimento em situação de crise. Vejamos as considerações abaixo,

Do ponto de vista da atenção ao paciente psiquiátrico, foi importante, pois antes não existia uma estrutura hospitalar para uma melhor conduta e acolhimento do paciente, porém existiu e existe um viés ideológico por traz, que atrapalha. Por exemplo, fechar leitos de psiquiatria indiscriminadamente, isso gerou e gera um caos no sistema, pois existem pacientes que realmente necessitam de uma internação breve, pacientes em surto psicótico, ideação suicida, homicida etc. Não como antes, onde as famílias abandonavam seus parentes com transtorno mental nos “hospitais psiquiátricos” por períodos longos. Tem muita coisa para melhorar, os serviços substitutivos (CAPS, Residências terapêuticas, NASFs) tem ajudado, porém a figura do hospital psiquiátrico ainda é necessário, pois a internação desses pacientes em hospital geral, não existe, principalmente por conta da própria equipe do plantão, que não se sente segura para admitir esse tipo de paciente. (Respondente C)

Tal delineamento propõe um entendimento que traduz uma série de informações que sintetizam uma crítica ao sistema atual de saúde mental. Isso decorrente da dificuldade expressa na fala, sobre realizar atendimentos sem o auxílio necessário dos dispositivos que compõe a RAPS. Realizar o atendimento a nível só de CAPS, traduz uma falha na rede, isso provoca um agudizamento do atendimento, sem ter outras possibilidades de suporte. Por isso, a recorrência de defesa ao hospital psiquiátrico, mesmo que os pense em outros moldes.

Os ideais reformistas representados pelos CAPS coloca em questão um acolhimento humanizado, capaz de ouvir e dar voz aos problemas evidenciados por essas pessoas, porém, em outros espaços as equipes não são capacitadas, desde a sua graduação para lhe dar com situações de pessoas em crise. Na hipótese de necessitar de uma breve internação, o hospital geral, é o mais propício a realizar esse atendimento, pois mantém um cuidado clínico no território. Porém, como enfatizado pelo entrevistado, existe impasses nessas instituições que impossibilitam um cuidado em rede, como aponta Echebarrena,

A baixa implantação de leitos de saúde mental em hospital geral está relacionado com estigmas e preconceitos. O desconhecimento sobre o assunto faz com que gestores de unidades resistam em receber pacientes psiquiátricos em suas instituições, dificultando assim a reversão do modelo assistencial psiquiátrico (ECHEBARRENA, 2018, p. 84).

Ao tratarmos sobre integralidade das ações via CAPS, perguntamos: como você avalia o processo de cuidados em saúde mental, a partir do CAPS I de Santa Luzia, tendo em vista a integralidade da pessoa assistida? Os entrevistados apontaram as seguintes falas. Vejamos,

O CAPS I de Santa Luzia apresenta-se como essencial no cuidado em saúde mental não só desse município, mas das cinco cidades que compõem o Vale do Sabugá, pois tal instituição é referência nos cuidados às pessoas com transtorno mental, dentro do SUS. O CAPS busca trabalhar o sujeito de forma holística, multiprofissional, desde o contexto psicossocial as questões

psiquiátricas e de enfermagem. (Respondente B).

Aqui no CAPS I – Santa Luzia, podemos dizer que os usuários possuem uma assistência psicossocial de qualidade, uma vez que os profissionais das diversas áreas prestam serviços que visam o bem-estar integral e não apenas psíquico. Sendo assim, estamos sempre atentos às necessidades e interesses dos usuários, desenvolvendo atividades como: oficinas terapêuticas, atividade física, feiras, saraus, atendimento psicológico individual e em grupo e assembleias familiares. (Respondente G)

É perceptível ações de cunho multidisciplinar apreciada na composição da primeira citação, isso mostra a tendência na fragmentação do cuidado. O trabalho calcado apenas na multidisciplinaridade mostra a dificuldade da equipe em considerar a base teórica de sua prática. Durante o decurso do estágio supervisionado pudemos observar a falta de organização do próprio serviço, em priorizar uma dinâmica que consiga estabelecer momentos para planejar, discutir e redefinir ações entre a equipe.

Outra questão que visualizamos durante o processo de estágio e que impossibilita a integralidade das ações tem haver com a alta demanda provocada pela deficiência do suporte da RAPS, tendo em vista essa sobrecarga evidenciar o CAPS I como ponto exclusivo para atendimentos em saúde mental. Nesse caso, o aumento excessivo das demandas sobrecarrega o atendimento dos profissionais, ocasionando a falta de tempo durante o serviço para discutir de forma coletiva um melhor direcionamento sobre ações que possibilite de fato práticas interdisciplinares, com intuito de eliminar a hierarquização dos saberes e garantir a integridade da assistência.

A respeito da segunda fala, essas atividades desenvolvidas tem por intuito atender as demandas dos usuários em sua totalidade, garantindo uma assistência que proporcione um acompanhamento em todos os segmentos (físico, psíquico, social).

Nesse sentido, é importante um trabalho multiprofissional que fomente ações interdisciplinares, com propósito de considerar as particularidades expressas por cada sujeito, e assim estabelecer um tratamento que potencialize atividades que lhes propiciem autonomia, bem-estar, fortalecimento de vínculos familiares e comunitários e credibilidade nas suas capacidades de produção e geração de renda..

Diante dessa articulação proposta, que impede intervenções unitárias no campo da saúde mental, os sujeitos da pesquisa foram questionados sobre o desenvolvimento de ações interdisciplinares no CAPS I. A pesquisa obteve respostas positivas em sua maioria, porém evidenciando justificativas confusas sobre a questão abordada. Segue as falas integralmente transcritas,

Sim. O usuário, o seu tratamento, o meio familiar e/ou trabalho dele, é discutido de forma integral com a equipe do CAPS I. (Respondente C)

Sim. Em parte, são desenvolvidas ações interdisciplinares. Ao meu ver essas ações são desenvolvidas pela equipe Psicossocial (Assistente Social e Psicólogos), mas não por toda a equipe. (Respondente B)

Constatamos nas justificativas apreciadas acima, informações contraditórias. Na primeira fala, constam elementos que integram na prática uma assistência unificada. Já no que diz respeito à última fala apresentada, apesar de evidenciar um discurso atrelado a ações interdisciplinares desenvolvidas na instituição em questão, esta declara que não são realizadas entre o quantitativo total que compõe a equipe técnica.

Com isso, podemos observar que a falta de clareza sobre a interdisciplinaridade e suas contribuições na saúde mental, pode contribuir para que os serviços adotem práticas tradicionais, envolvendo a hierarquização de especialidades. Como podemos observar na sequência da fala abaixo,

Sim. A admissão dos usuários é sempre comunicada aos demais profissionais assim como as especificidade e singularidades. O médico sempre q/ necessário pede auxílio a Psicologia ou Serviço Social. (Respondente A)

Na literatura, podemos constatar as diversas especialidades que compõe a equipe multiprofissional dos CAPS, portanto, o acompanhamento durante o convívio no serviço, requer constantemente orientações conjuntas da equipe, a luz de uma organização que não conduza o privilégio de profissionais entre ambas as partes. Não se trata de comunicar sobre as ações realizadas, mas sim de propor momentos de falas entre a equipe, respeitando seus saberes e seus lugares. Nesse contexto, incluir discursões sobre as demandas apresentadas, potencializando um acompanhamento psicossocial, atentando para a singularidade dos sujeitos. Nesse entendimento Vasconcellos expõe que:

Tal empreitada mostra sua relevância dado que a integração interdisciplinar influencia sobremodo o exercício das práticas assistenciais, de forma que conhecer suas possibilidades e obstáculos é um passo importante para propiciar uma assistência adequada aos usuários dos serviços de saúde mental (VASCONCELLOS, 2010, p. 05).

Como se pode notar diante das falas expostas acima, existe uma confusão no entendimento das ações interdisciplinares desenvolvidas por alguns profissionais do CAPS I, apesar da confirmação da existência delas. Por outro lado, apenas uma das pessoas entrevistadas considerou que no trabalho desenvolvido não existe a prática interdisciplinar. Segue a colocação referente à fala,

Não. Considero que conseguimos realizar um trabalho multidisciplinar, porém ainda temos um percurso a seguir até conseguirmos desenvolver um trabalho interdisciplinar. Isso acontece devido às dificuldades em realizar as reuniões que são fundamentais para tanto, uma vez que os baixos salários nos obrigam a fragmentar a carga horária, sobrando menos tempo para atender a demanda, estudar os casos e realizar reuniões. (Respondente G)

Constatamos diante de tal resposta, algumas impossibilidades de realizar ações interdisciplinares no CAPS I, em decorrência dos fatos mencionados, é possível perceber que a jornada dupla de trabalho ocasiona no cotidiano dos serviços impasses na hora de tecer momentos de diálogos entre a equipe. Isso ocorre pela baixa remuneração salarial de

alguns profissionais, o que ocasiona a adesão por outro vínculo empregatício.

Vasconcelos (2002) aponta que essa defasagem salarial tem haver com os ajustes das políticas neoliberais. Sendo assim, para favorecer a mudança de paradigma no que diz respeito ao contexto de saúde pública, como a prática interdisciplinar no interior dos serviços substitutivos é pertinente envolver uma reciprocidade em termos de salários, condições de trabalho digna e uma carga horária que evite o vínculo excessivo laboral.

A proposta de clínica ampliada tem por base a articulação e inclusão de diversos enfoques e disciplinas para a construção do Projeto Terapêutico Singular (PTS), tendo por base a prerrogativa integrativa entre os saberes. Nesse sentido, perguntamos: você reconhece que a equipe atua com a finalidade de construção e reconstrução de PTS's? Os entrevistados responderam da seguinte forma,

Sim. Mesmo diante das dificuldades os casos mais graves são discutidos entre os profissionais haja vista a melhor condução terapêutica e evolução do caso. (Respondente A)

Não. Não há relação significativa entre as ações desenvolvidas. (Respondente B)

Não. Aqui no CAPS I – Santa Luzia os PTS ficam sob à responsabilidade das psicólogas. (Respondente G)

São considerações que provocam críticas relevantes de como a Reforma Psiquiátrica estar sendo internalizada por profissionais que conduzem no interior dos serviços substitutivos ações que despolitiza uma Atenção Psicossocial integral. Deste modo, Leal e Antoni (2013) traz uma análise sobre o PTS,

O CAPS, responsável pela atenção à saúde mental, deve desenvolver um Projeto Terapêutico Singular para cada usuário e realizar um trabalho integrado com a família e a comunidade das pessoas que utilizam seus serviços. Este Projeto Terapêutico Singular está baseado nas estratégias de intervenções planejadas e com objetivos específicos, executados por uma equipe multidisciplinar, voltados para a reabilitação psicossocial do usuário e de forma interdisciplinar (LEAL; ANTONI, 2013, p. 96).

Essa articulação é significativa na concepção de clínica ampliada, traz evidências que supera o modelo tradicional da clínica, na qual desresponsabiliza apenas uma especialidade, com foco na integralidade das ações. Dessa forma, o envolvimento de todos os profissionais, assim como o usuário e a própria família estabelece um comprometimento fidedigno no direcionamento de ações que potencializa uma melhor qualidade de vida para o sujeito acometido de sofrimento psíquico.

O paradigma Psicossocial estabelece rupturas com a clínica tradicional, ampliando o objeto de trabalho, ressignificando o tratamento destinado às pessoas acometidas de sofrimento psíquico. Foi perguntado aos entrevistados sobre as dificuldades expressas para a efetivação da Clínica Ampliada no CAPS I, na ocasião obtivemos as seguintes respostas,



A falta de diálogo e temperamento difícil de alguns profissionais. (Respondente G)

Diálogo, pró-atividade, horários divergentes. (Respondente B)

Falta de delimitação das respectivas atribuições, o que gera certa 'confusão' na aplicabilidade o conceito de clínica ampliada/trabalho multiprofissional. Essa 'confusão' culmina em 'um querendo saber mais que o outro; havendo interferência não solicitadas de determinados profissionais sobre a conduta do colega, no sentido de menosprezá-lo. (Respondente E)

Nos fragmentos das falas a cima, fica claro a falta de interação dos profissionais, deixando transparecer a falta de manejo em escassos momentos integrativos entre a equipe. Esse procedimento prejudica de forma instantânea a ampliação da clínica, tendo em vista o pouco rendimento em favor de uma assistência centrada no sujeito, na sua história e em suas particularidades. A falta de discursões sólidas, em espaços democráticos, onde todos tenham o direito à voz, intensifica a reprodução de práticas tradicionais que se configuram em uma sobreposição de saberes.

A ampliação da clínica requer o envolvimento de atores que contribuam na efetividade da cidadania dos sujeitos, com base em um novo modelo de assistência que atue na defesa pela liberdade, ampliando possibilidades de intervir nos mais diversos complexos que envolve a saúde mental. Sendo assim, vejamos as seguintes considerações:

Dessa forma, pensar no cuidado em saúde mental envolve pensar na integralidade do sujeito, do ambiente e das relações, pois o cuidado é um construto da cumplicidade de diversos atores apoiados em todos os contextos: sociais, econômicos, familiares, biológicos, psicológicos e culturais (PINTO; JORGE *et al*, 2011, p. 501).

A Clínica Ampliada supera práticas tradicionais e possibilita uma reabilitação psicossocial, na qual através da redefinição do objeto de trabalho é possível ressignificar o tratamento do sujeito acometido de sofrimento psíquico. Deste modo, apesar dos desafios postos no cotidiano dos CAPS, é necessário um constante envolvimento dos profissionais para enfatizar uma assistência individual/grupal/familiar que apresente resultados positivos frente a ações terapêuticas compartilhadas.

Para finalizar o processo de apreciações e discursões dos dados, buscou-se examinar quais são as práticas desenvolvidas nos CAPS que deveriam ser modificadas para fins de alcançar a ampliação da clínica. Temos as seguintes colocações,

Agendamentos fixos da Psicologia que disponibiliza pouco espaço na agenda para as urgências subjetivas; e rigidez de dispor destas vagas mesmo quando solicitado pelo Serviço Social. (Respondente A)

O ponto importante seria corresponsabilizar, de fato o usuário e seus familiares perante os cuidados de saúde, que vão bem além da assistência no CAPS. (Respondente E).

Grupos terapêuticos, aumentar a quantidade. (Respondente C).

Nota-se que as falas não se comunicam entre se, a primeira interlocução demonstra a falta de conexão entre ambas as especialidades. Isso mostra lacunas entre a equipe. Em decorrência de ser apontado um atendimento imediato, muitas vezes desencadeado por uma situação de crise, na qual o tempo é uma condição necessária para realizar o acolhimento humanizado, esse procedimento é de extrema importância para o usuário de saúde mental.

Sobre os apontamentos que a segunda fala traz, estes são eminentemente importantes para a ampliação da clínica, uma vez os familiares e usuários desenvolvem um papel fundamental na formulação do PTS. São propostas concretas que traduz na prática os pressupostos da Reforma Psiquiátrica, elencando um novo modelo que partilha de atores sociais para efetivar uma Atenção Psicossocial ampla e integral.

Sobre a última interlocução, o entrevistado evidenciou a importância de aumentar os grupos terapêuticos. As oficinas terapêuticas são desenvolvidas no CAPS, são realizadas as mais variadas atividades em grupo e os participantes escolhe evidenciando seu interesse de acordo com as suas particularidades. São monitoradas por profissionais, e tem por finalidade a integração social dos usuários e familiares, gerar autonomia, bem-estar e credibilidade nas suas capacidades de produção (BRASIL, 2004).

Ainda para fomentar a discussão a respeito das ações que necessitam de modificações nos CAPS para fins de ampliar a clínica, é possível sinalizar nas falas reescritas abaixo,

Realização de reuniões semanais, participação da equipe na construção dos PTS e nos processos de alta. (Respondente G)

A insuficiência dos encontros/reuniões para estudo de caso, discutir o serviço. (Respondente B)

Para construir uma Clínica Ampliada nos CAPS, é preciso considerar a necessidade de realizar constantemente reuniões entre a equipe. Os entrevistados abordam essa informação claramente, evidenciando a dicotomia entre prática e teoria. Com isso, a pesquisa mostra que apesar da Reforma Psiquiátrica ser um movimento político, em constante movimento, que busca mudanças para superar um modelo tradicional e suas práticas, ainda é possível conviver nos CAPS, com uma realidade que apresenta entraves na hora de tecer o cuidado a pessoa com sofrimento psíquico.

O PTS por ser um recurso da Clínica Ampliada, visa o apoio mútuo entre a equipe técnica, ampliando o objeto de trabalho, considerando que a saúde mental estar associada a vários condicionantes. Devido a isto, necessita de um cuidado que ampare toda essa gama de necessidades para uma melhor qualidade de vida, preservando a cidadania dos indivíduos. Desta forma, Lúcia Rosa expõe que “o sujeito acometido pelo transtorno mental é recomposto em sua totalidade relacional com o corpo social. É percebido integralmente, como um ser que tem existência global e complexa [...]” (2008, p. 66).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados evidenciados neste trabalho permitiu afirmar que existe ainda no cotidiano dos CAPS uma dimensão sociocultural que expressa o protagonismo da clínica voltada para o atendimento médico. Ou dito de outra forma, o modelo de clínica tradicional ainda encontra espaço nos serviços substitutivos, apesar da oferta de especialidades, o sofrimento psíquico ainda é arraigado no imaginário das pessoas como algo exclusivo patológico.

Outro elemento que ficou bastante evidente na pesquisa foi à prática do trabalho calcado na multidisciplinaridade. Tal referência, não impossibilita o desenvolvimento de ações voltadas ao público alvo do CAPS. No entanto, a falta de um trabalho de cunho mais interdisciplinar, acaba por sobrecarregar determinadas especialidades que atuam no interior do serviço, em detrimento de ações mais coletivas que valorizem o desenvolvimento e a autonomia dos usuários e familiares. A manutenção de aspectos conservadores e tradicionais que imperam nas práticas dos profissionais da área de saúde, contribui para manter-se cada um em seu espaço de especialidade, sem avançar sob a perspectiva reformista.

Outro fator que desfavorece a ampliação da clínica no CAPS e evidencia possíveis hierarquias estar relacionado com a falta de organização multidisciplinar dentro da própria equipe, isso inibe ações interdisciplinares, e provoca significados que interpretados indicam o distanciamento das relações, associado aos conflitos e comportamentos disruptivos no trabalho.

Nesse sentido, podemos considerar como foi apontado pelos entrevistados, à construção e reconstrução do PST não acontecer sob a ótica de discursões coletivas entre a equipe. Também observamos sobre diferenças salariais, o que impulsiona a equipe o favorecimento a fragmentação da carga horária. Com isso, evidenciamos mais um fator agravante que desfavorece a construção de uma agenda para discutir os casos em sua totalidade.

Podemos contemplar através dos desafios expressos na pesquisa, que apesar da Reforma Psiquiátrica impulsionar mudanças significativas na hora de tecer o cuidado, as práticas em saúde mental ainda sinalizam a necessidade de ajustes para fomentar uma ampliação da clínica a integralidade. Porém, o CAPS I de Santa Luzia apesar dos percalços existentes no cotidiano do serviço, mesmo assim, consegue realizar um atendimento de base comunitária, a luz de ideais que cogitam enaltecer o sujeito e sua singularidade. Deste modo, os usuários tem a oportunidade de traçar novos capítulos de uma história que evidencie uma qualidade de vida, associada a uma assistência que entrelace as mais diversas variáveis dos complexos sociais.

## REFERÊNCIAS

AMARANTE, P. **Saúde Mental e atenção psicossocial**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde mental no SUS: os Centros de Atenção Psicossocial**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <[http://www.ccs.saude.gov.br/saude\\_mental/pdf/sm\\_sus.pdf](http://www.ccs.saude.gov.br/saude_mental/pdf/sm_sus.pdf)>. Acesso em 09 mar. 2020.

BARDIN, Laurence. **Análise de conteúdo**. Lisboa: Edições 70, 1977.

ECHEBARRENA, Rodrigo Cunha. Leitos de saúde mental em hospitais gerais: o caso do Rio de Janeiro. 2018. 95 f. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)** - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28711>>. Acesso em: 08 maio 2020.

LEAL, B. M.; DE ANTONI, Clarissa. Os Centros de Atenção Psicossocial (CAPS): estruturação, interdisciplinaridade e intersetorialidade. **Aletheia**, n.40, p.87-101, jan./abr. 2013. Disponível em: <<http://pepsic.bvsalud.org/pdf/aletheia/n40/n40a08.pdf>>. Acesso em: 06 abr. 2020.

MINAYO, M. C. S. (Org.). **Pesquisa social: teoria, método e criatividade**. 28 ed. Petrópolis: Vozes, 2009.

PINTO, Diego Muniz; JORGE, Maria Salete Bessa et al. Projeto terapêutico singular na produção do cuidado integral: uma construção coletiva. **Texto & Contexto-Enfermagem**, Florianópolis, v. 20, n. 3, p. 493-502, 2011.

ROSA, Lúcia Cristina dos Santos. **Transtorno mental e o cuidado na família**. 2ª ed. – São Paulo, Cortez, 2008.

SILVA, Solimar Pinheiro; OLIVEIRA, Adriana Leonidas; KAMIMURA, Quésia Postigo. Capacitação em saúde mental: entre a realidade e as ofertas do Ministério da Saúde. **Sistemas & Gestão**, v. 9, n. 3, p. 406-416, 2014. Disponível em: <[file:///E:/Meus%20Documentos/Downloads/233-2606-2-PB%20\(2\).pdf](file:///E:/Meus%20Documentos/Downloads/233-2606-2-PB%20(2).pdf)>. Acesso em: 08 maio 2020.

VASCONCELLOS, Vinicius Carvalho de. Trabalho em equipe na saúde mental: o desafio interdisciplinar em um CAPS. SMAD, **Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas** (Edição em Português), v. 6, n. 1, p. 1-16, 2010. Disponível em: <<http://pepsic.bvsalud.org/pdf/smad/v6n1/15.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2020.

VASCONCELOS, Eduardo Mourão. Serviço Social e interdisciplinaridade: o exemplo da saúde mental. In: ROSA, Lúcia Cristina dos Santos; PEREIRA, Ivana Carla Garcia; BIANETO, José Augusto; VASCONCELO Eduardo Mourão (org.). **Saúde mental e serviço social: o desafio da subjetividade e da interdisciplinaridade**. 2ª ed. – São Paulo: Cortez, 2002, p. 35-68.

# CAPÍTULO 11

## MADUREZ SEXUAL Y ESPECTRO TRÓFICO DE *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) EN EL PARQUE NACIONAL SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO, MÉXICO

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 07/10/2021

### Emmanuel Velasco-Villalobos

Universidad Veracruzana, Facultad de Biología  
Xalapa – Veracruz  
<https://www.linkedin.com/in/emmanuel-velasco-villalobos>

### Elizabeth Valero-Pacheco

<http://orcid.org/0000-0002-5619-740X>

### Luis Gerardo Abarca-Arenas

<https://orcid.org/0000-0001-6154-7788>

**RESUMEN:** En este estudio se determinó la madurez sexual de 127 peces león de la especie *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) capturados en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) en México, para esto se tomaron los datos biométricos (longitud total, longitud patrón y peso) y se realizó un análisis histológico de las gónadas de cada ejemplar, para determinar sexo y fase de madurez. Se observaron dos de las fases de madurez, se logró diferenciar entre organismos juveniles y adultos; hembras y machos. Los resultados obtenidos fueron 56 hembras de éstas 33 se encontraron en la fase III y 23 en la fase IV de madurez sexual y 71 machos de éstos 35 se encontraron en la fase III y 36 en la fase IV. Todos los peces capturados ya eran maduros sexualmente con tallas de 10.2 cm a 40.5 cm. Se analizó su dieta en tres intervalos de tallas, esto mostró que los

crustáceos conforman el 20% de su dieta y este porcentaje disminuye con el crecimiento del pez con 14% para 20-29.9cm y 2% para 30-40.5cm, en otras palabras, su dieta cambia a medida que crece pasando de consumir peces y crustáceos a ser enteramente piscívoro. A partir de los índices de importancia relativa y coeficiente de alimentación, se determinó que *Lucania parva* y *Apogon sp.* son las principales presas de las que se alimenta.

**PALABRAS CLAVE:** *Pterois volitans*, Pez león, PNSAV, Madurez sexual.

### SEXUAL MATURITY AND TROPHIC SPECTRUM OF *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) IN THE SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO NATIONAL PARK, MEXICO

**ABSTRACT:** In this study, was determined the sexual maturity of 127 lionfish of the species *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) captured in the Sistema Arrecifal Veracruzano National Park (PNSAV), to this end biometric data were taken (total length, standard length and weight), performing histological analysis of the gonads of each specimen, to determine sex and maturity stage. Two stages of maturity were observed, differentiating between juvenile and adult organisms: males and females. The observations resulted in 56 females, 33 of them at stage III and 23 at stage IV of sexual maturity and 71 males, 35 of them at the stage III and 36 at stage IV. All fish caught were sexually mature with sizes between 10.2 cm and 40.5 cm. The diet was analyzed for three size intervals, showing that crustaceans constitute the 20% of their diet and

this number decreases when the fish grows, 14% to 20-29.9cm and 2% to 30-40.5cm, in other words, their diet changes as it grows, going from eating other fish and crustacean to become a specialized fish-eater. The relative importance and feed coefficient were calculated concluding that *Lucania parva* and *Apogon sp.* are the main prey on which it feeds.

**KEYWORDS:** *Pterois volitans*, Lionfish, PNSAV, Sexual maturity.

## 1 | INTRODUCCIÓN

El establecimiento de *Pterois volitans* en las costas del Golfo de México representa una grave amenaza para las especies de peces, crustáceos, y en general para el equilibrio del ecosistema marino, por sus características biológicas, como su capacidad de desovar hasta cada 2-3 días durante todo el año (Gardner *et al.*, 2015) y una fecundidad anual media de dos millones de huevecillos, un estado larval con duración de veinticinco a cuarenta días, que permanece en el zooplancton y se dispersa por medio de las corrientes marinas (Morris y Whitfield, 2009). Puede encontrarse en lagunas costeras, manglares, arrecifes de coral y cerca del fondo marino hasta los doscientos metros de profundidad (Ruiz-Carus *et al.*, 2006). En su distribución natural la talla máxima reportada es de treinta centímetros, a diferencia del mar Caribe donde ya se reportan tallas de treinta y nueve centímetros (Edwards *et al.*, 2014), además al ser beneficiado por la falta de depredadores naturales que puedan controlar sus poblaciones en el océano Atlántico, este puede alimentarse con total libertad en las costas y arrecifes veracruzanos.

## 2 | DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### Toma de muestras

Los peces fueron capturados con arpón en las partes sur del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) por pescadores artesanales de Antón Lizardo, Veracruz (Fig. 1). Las medidas biométricas que se tomaron en cada pez fueron: Longitud total (LT) en centímetros, Longitud patrón (LP) en centímetros y Peso (W) en gramos, para esto se utilizó un ictiómetro y una balanza digital de 20 g a 4 kg, respectivamente. Al finalizar la toma de datos, los peces fueron disectados longitudinalmente, desde el ano hasta la base de las aletas pectorales para localizar y extraer las gónadas.

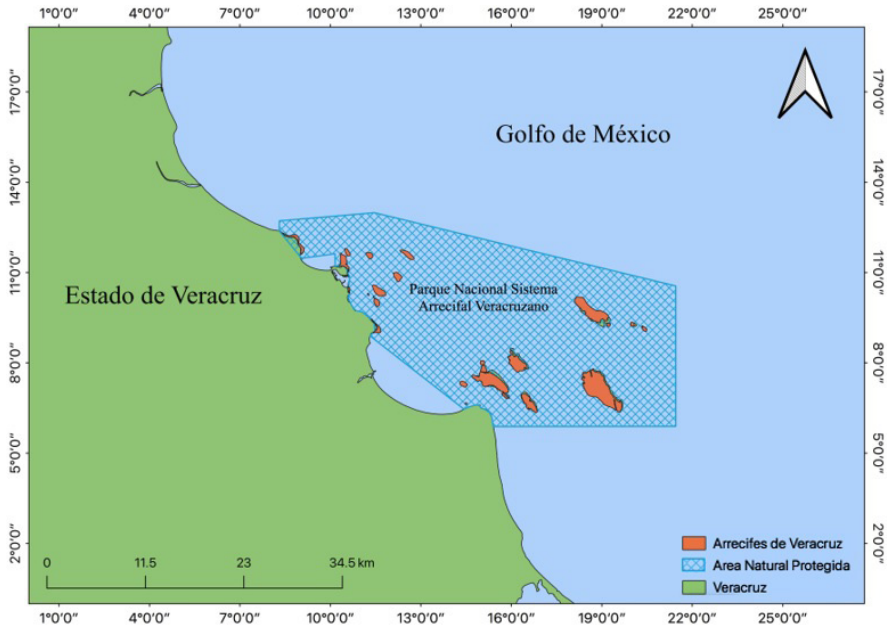


Figura 1. Ubicación del área de estudio y polígono correspondiente al área del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV), México. (mapa realizado por Emmanuel Velasco Villalobos, 2020).

## Determinación de Sexo y Madurez Sexual

Se analizó la gónada por individuo, tomando datos de tamaño, color e histología de las células. Para analizar la histología de las células gonádicas se tomó una pequeña porción de tejido gonádico, colocándolo entre un portaobjetos y cubreobjetos con solución salina, entonces se comprime entre ambos objetos para lograr una extensión y disociación de las células gonadales (ovocitos y espermatozoides) para su observación bajo el microscopio óptico a 10X y 40X con el fin de determinar el estado de desarrollo entre juvenil y adulto (Nikolski, 1963; Holden y Raitt, 1975); entre hembras y machos. Simultáneamente se efectuó un registro fotográfico de cada preparación, para su posterior comparación con las fases propuestas por Holden y Raitt (1975) y poder determinar el estado de madurez gonádica.

## Estructura de la dieta

En la separación y análisis de las estructuras duras de las presas, se empleó un microscopio estereoscópico y para las partes blandas se utilizó el microscopio óptico. Además, todas las presas (organismos completos o estructuras duras) se pesaron en una báscula analítica, contaron, y fotografiaron. Las presas se identificaron morfológicamente, dependiendo del estado de digestión en el que se encontraban estas, el cual fue categorizado con base en lo propuesto por Stillwell y Kohler (1982). Para la identificación de los peces, se observó la morfología externa (piel, espinas, aletas y radios); con ayuda de

guías de identificación de peces óseos del estado de Veracruz de Bedia y Franco (2008). Los crustáceos fueron identificados por medio de sus exoesqueletos utilizando las claves de Lawrence y Won (1986) y Tavares (2002).

## Trabajo de gabinete

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó una matriz de datos con los siguientes datos: fecha, nombre común, nombre científico, longitud total (LT) (cm), longitud patrón (LP) (cm), Peso (W) (g), sexo, peso estómago lleno/vacío, tipo de contenido estomacal. Con la finalidad de analizar la composición cuantitativa de las presas presentes en su dieta se aplicaron los siguientes índices: Frecuencia de Ocurrencia (%FO), Porcentaje Numérico (%N) y Gravimétrico (%P) (Hyslop, 1980), incorporados en el Índice de Importancia Relativa (Pinkas *et al.*, 1971), además del coeficiente de alimentación (Q) para categorizar las presas como principales, secundarias u ocasionales (Hureau, 1970).

El porcentaje de Frecuencia de Ocurrencia (%FO), muestra la frecuencia de cada presa en el número total de estómagos, y se expresa como el porcentaje del total de los estómagos analizados (Hyslop, 1980), mediante la fórmula:  $\%FO = N / NE * 100$ , Donde: N = número de estómagos en el cual apareció un tipo de presa, NE = número total de estómagos.

Con el Porcentaje numérico (%PN), se registra el número de presas de cada especie, expresado como el porcentaje del número total de presas presentes en todos los estómagos (Hyslop, 1980). Las presas que se encontraron en un estado de digestión avanzado se registraron con base a sus restos. Para peces se tomaron en cuenta, el número pareado de ojos y otolitos; para los crustáceos el número pareado de ojos y quelas (Talent, 1976). La fórmula empleada es la siguiente:  $\%N = n / NT * 100$  Donde: n = número total de cada presa, NT = número total de presas de todas las especies.

Se aplicó el Porcentaje Gravimétrico (%P), para conocer la importancia en peso de las presas. El peso total de una presa se expresa como porcentaje del peso total del contenido de todos los estómagos (Hyslop, 1980). La fórmula es la siguiente:  $\%P = P / PT * 100$  Donde: P = peso (en gramos) de cada presa determinada, PT= peso total de todas las especies presas.

El Índice de Importancia Relativa (IIR), conformado por los resultados de los índices anteriores permite describir la importancia de cada una de las presas en la dieta de cada pez león, porque incorpora biomasa, cantidad y aparición de cada presa (Pinkas *et al.*, 1971), se calculará por la siguiente fórmula:  $IIR = (\%N + \%P) * \%FO$  Donde: % N = porcentaje del número, % P = porcentaje del peso o gravimétrico, % FO = porcentaje de frecuencia de ocurrencia.

Coefficiente de alimentación para diferenciar entre presas principales, secundarias y ocasionales:  $Q = \%N * \%W$  Donde: %N = porcentual numérico, %W = porcentual gravimétrico. El resultado se interpreta como: Si  $Q > 200 =$  Presas principales,  $20 < Q <$



200 = Presas secundarias, Si  $Q < 20$  = Presas ocasionales.

### 3 | RESULTADOS

De 127 peces león analizados, se determinó que 56 de ellos fueron hembras y 71 machos (Fig. 2). En cuanto a la madurez sexual de los peces hembra: 33 se encontraron en la fase III y 23 en la fase IV de madurez. La madurez sexual de los peces macho: 35 se encontraron en la fase III y 36 en la fase IV (Tabla 1). No se encontraron peces en las fases I y II (Fig. 3). Se determinó que la totalidad de los peces león capturados ya eran maduros sexualmente.

Las hembras tuvieron una LT mínima de 11.5 cm con un W de 23 g. y una LT máxima de 38.5 cm con un W de 1025 g. Los Machos tuvieron una LT mínima de 10.2 cm con un W de 20 g y una LT máxima de 40.5 cm con un W de 1050 g (Fig. 4).

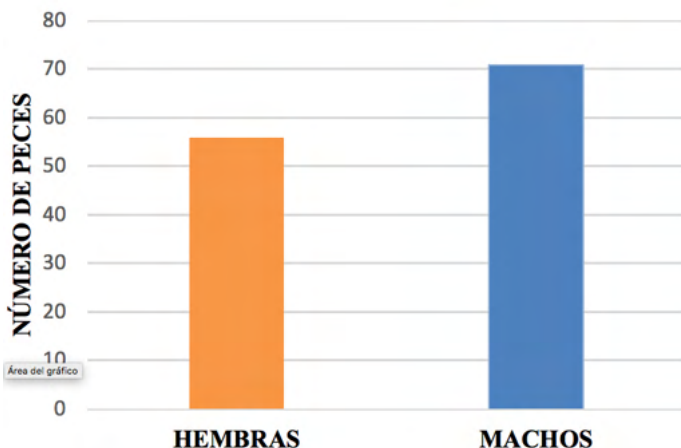


Figura 2. Número de hembras y machos del pez león *P. volitans* analizados procedentes del PNSAV, México.


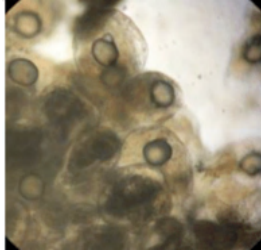


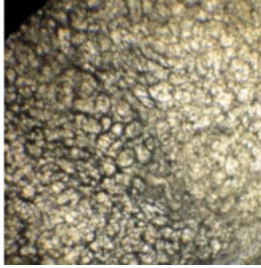
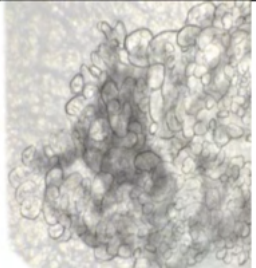

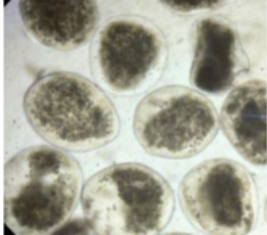
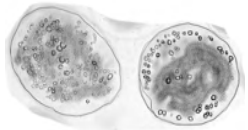

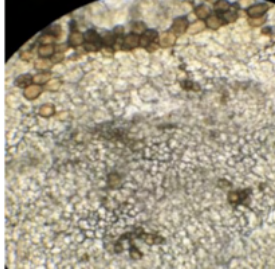
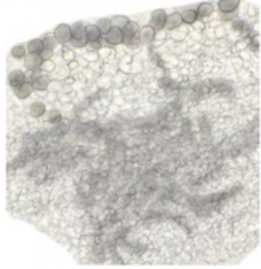
Fase	Sexo	Gónada completa	Estructura celular de gónadas (Fotos).	Estructura celular de gónadas (Esquemas).
III	Hembra			
III	Macho			
IV	Hembra			
IV	Macho			

Tabla 1. Determinación del sexo y fases de madurez gonádico por individuo del pez león *P. volitans* (Nikolski 1963; Holden y Raitt, 1975).

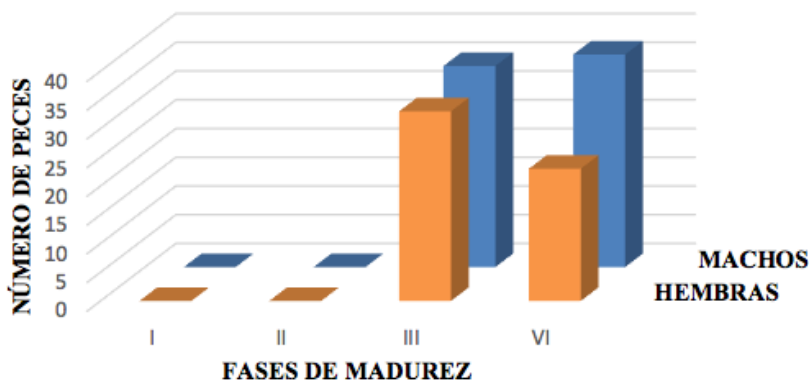


Figura 3. Fases de madurez gonádica del pez león *P. volitans* procedente del PNSAV, México.

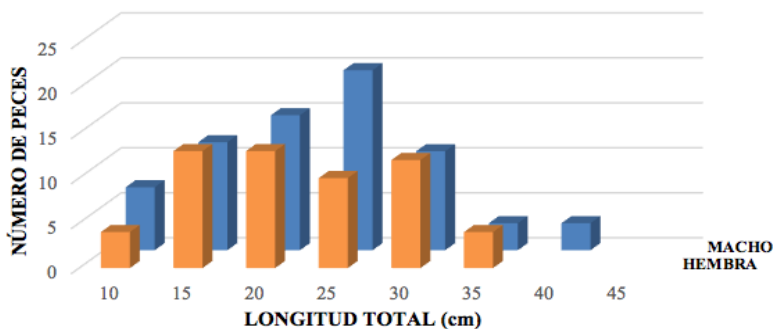


Figura 4. Longitud Total (cm) de hembras y machos del pez león *P. volitans* procedente del PNSAV, México.

Para conocer cual grupo alimenticio predomina en su dieta, las presas que se extrajeron de los estómagos se organizaron con relación al grupo taxonómico al que pertenecen y se calculó el porcentaje de cada uno. En el caso de este estudio solo se encontraron presas pertenecientes a peces y crustáceos. Los estómagos de las hembras de *Pterois volitans* tuvieron a los peces como el 82% del contenido y solo el 18% corresponde a crustáceos (Fig. 5a), de forma similar los machos tienen predominantemente a los peces como parte de su dieta con 92% y a los crustáceos con un porcentaje del 8% (Fig. 5b), lo cual es aún menor que en las hembras. Lo que a grandes rasgos indica una preferencia por parte de esta especie a los peces como principal fuente de alimento.

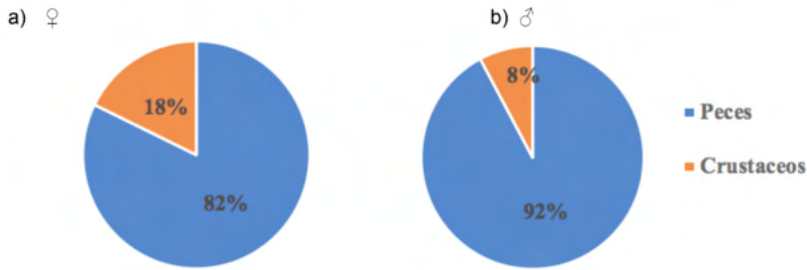


Figura 5. Porcentaje de los grupos de presas, que componen la dieta de a) Hembras y b) Macho de la especie *Pterois volitans* en el PNSAV, México.

El análisis de la dieta por intervalos de tallas para conocer sus preferencias de alimento a medida que crecen los peces, se apreció que el intervalo menor de 10-19.9 cm, los crustáceos conforman el 20% de su dieta, este porcentaje disminuye con el crecimiento del pez con 14% para 20-29.9 cm y 2% para 30-40.5 cm (Fig. 6). Este cambio en la dieta a medida que el pez crece puede indicar un cambio en los nutrimentos que necesita y una diferencia en las zonas de caza entre cada intervalo de tallas.

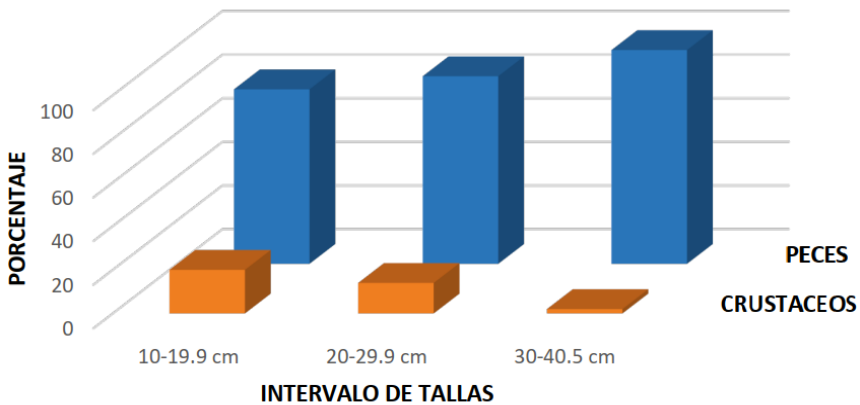


Figura 6. Porcentaje de los grupos de presas que se encontraron en tres intervalos de talla para la especie *Pterois volitans* en el PNSAV, México.

El análisis estomacal de *P. volitans* evidenció la composición del régimen alimenticio, con organismos bentónicos y arrecifales, todos de origen animal. La identificación taxonómica de las presas registró 20 especies pertenecientes a dos Phyla: Arthropoda, Subphylum Crustacea y Chordata. Dentro del Subphylum Crustacea se identificaron tres familias: Portunidae con una especie *Cronius tumidulus*, Palaemonidae con una especie *Palaemon northropi* y Rhynchocinetidae con una especie *Rhynchocinetes rigens*.

Para el Phylum Chordata se identificaron trece familias: Apogonidae con dos especies

*Apogon* sp. y *Phaeoptyx pigmentaria*; Gobiidae con dos especies *Bathygobius soporator* y *Coryphopterus* sp.; Centropomidae con una especie *Centropomus* sp.; Gerreidae con dos especies *Diapterus* sp. y *Eugerres plumieri*; Chaenopsidae con una especie *Emblemariopsis* sp.; Labrisomidae con una especie *Gobioclinus* sp.; Grammatidae con una especie *Grama loreto*; Blenniidae con dos especies *Ophioblennius atlanticus* y *Parablennius marmoratus*; Chlorophthalmidae con una especie *Chlorophthalmus* sp.; Fundulidae con una especie *Lucania parva*; Mugilidae con una especie *Mugil* sp.; Holocentridae con una especie *Myripristis jacobus*; y un miembro de la familia Tetraodontidae cuyo genero no pudo ser identificado.

El IIR indicó que las presas con mayor importancia en la dieta del pez león presente en el PNSAV son los peces *Lucania parva*, *Apogon* sp., *Diapterus* sp. y *Eugerres plumieri* (Fig. 7). Los crustáceos encontrados no resultaron tener un alto índice de importancia, pero de las tres especies registradas *Palaemon northropi* y *Rhynchocinetes rigens* son las de mayor importancia.

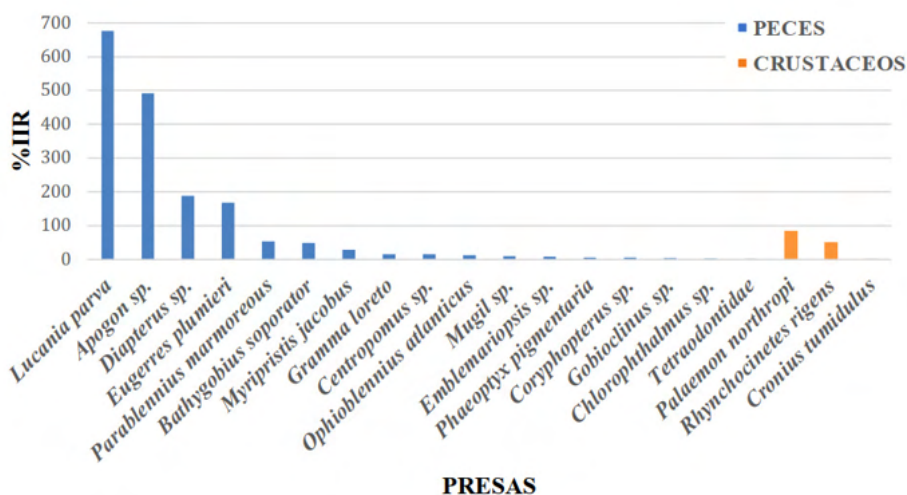


Figura 7. El índice de importancia relativa (IIR) de las presas encontradas en *P.volitans* en el PNSAV, México.

Con la aplicación del coeficiente de alimentación se categorizó las presas del pez león en tres niveles: Principales (Rojo), Secundarias (Amarillo) y Ocasionales (Verde). El resultado es que *Lucania parva* y *Apogon* sp., son presas principales. *Eugerres plumieri* y *Diapterus* sp., son presas secundarias, todas las otras presas encontradas entran en la categoría de ocasionales (Fig. 8).

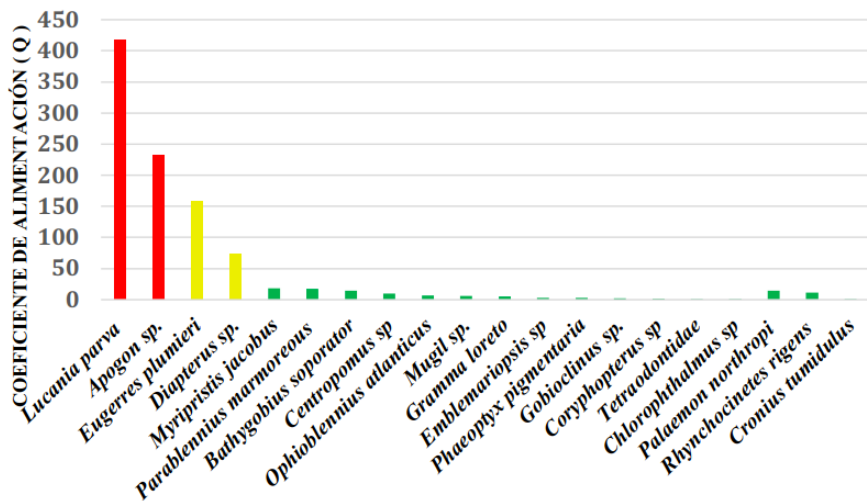


Figura 8. El coeficiente de alimentación (Q) de cada presa registrada muestra que *Lucania parva* y *Apogon sp.* son las principales presas del pez león en el PNSAV, México.

## 4 | CONCLUSIÓN

De los 127 ejemplares de *P. volitans* utilizados en este proyecto, el 100% resultaron maduros sexualmente de acuerdo con el análisis de las gónadas. Se determinaron 56 hembras y 71 machos de pez león con LT desde los 10.2 cm hasta los 40.5 cm. La especie invasora *P. volitans* en el Golfo de México dentro del PNSAV es un pez con características biológicas que le facilitan colonizar sitios ricos en diversidad como lo es este. El análisis gonádico mostró que el pez león sin distinción de sexos alcanza la madurez gonádica a los 10.2 cm en el PNSAV, siendo la talla de madurez menor comparada con otros sitios del Golfo de México (Morris, 2009) y Mar Caribe (Gardner *et al.* 2015; Sabido-Itzá *et al.* 2016). Esto le permite una mayor dispersión en menor tiempo y en el acaparamiento de los recursos que el ecosistema provee como: alimento, refugio y territorio lo que podría traer como consecuencia la perturbación de la red trófica del sistema y desequilibrio del ecosistema. Respecto a su dieta, se registraron 16 familias de las cuales las más representativas que forman parte de la dieta del pez león en el PNSAV son: Apogonidae, Blenniidae, Fundulidae, Gerreidae, Gobiidae. Se identificaron 20 especies que son depredadas por *P. volitans*, lo que las convierte en las más afectadas por esta invasión biológica, estas incluyen los peces: *Apogon sp.*, *Bathygobius soporator*, *Centropomus sp.*, *Chlorophthalmus sp.*, *Coryphopterus sp.*, *Diapterus sp.*, *Emblemariopsis sp.*, *Eugerres plumieri*, *Gobioclinus sp.*, *Gramma loreto*, *Lucania parva*, *Mugil sp.*, *Myripristis jacobus*, *Ophioblennius atlanticus*, *Parablennius marmoreus*, *Phaeoptyx pigmentaria*, Tetraodontidae y crustáceos decápodos: *Palaemon northropi*, *Rhynchocinetes rigens*, *Cronius tumidulus*. Al analizar estos resultados se apreció que, si bien hembras y machos de *P. volitans* consumen principalmente peces y

crustáceos y que el consumo de estos últimos disminuye a medida que crecen, su dieta difiere respecto a las especies capturadas, lo que indica que prefieren usar áreas distintas de caza. También se determinó que el pez león asentado en el PNSAV tiene el tipo de dieta especialista, basada en las especies *Lucania parva* y *Apogon* sp como presas principales.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las autoridades de la CONANP del H Puerto de Veracruz por facilitar los ejemplares que fueron analizados en este trabajo. Este trabajo forma parte del proyecto “Ecología de la Costa Veracruzana” a cargo de la Dra. Elizabeth Valero Pacheco.

## REFERENCIAS

Bedia, S. C. y J. L. Franco. 2008. Peces De Los Sistemas Costeros Del Estado de Veracruz. Universidad Autónoma De México. Facultad De Estudios Superiores Iztacala, México. 508.

Edwards, M. A. T. K. Frazer, y C. A. Jacoby. 2014. Age and growth of invasive lionfish (*Pterois* spp.) in the Caribbean Sea, with implications for management. *Bulletin of Marine Science*, 90(4): 953–966. <https://doi.org/10.5343/bms.2014.1022>

Gardner, Patrick G., T. K. Frazer., C. A. Jacoby., y R. P. E. Yanong. 2015. Reproductive biology of invasive lionfish (*Pterois* spp.). *Frontiers in Marine Science*, 2(7): 1-10.

Holden, M. J. y D. F. S. Raitt, 1975. MANUAL DE CIENCIA PESQUERA Parte 2 – Métodos para Investigar los Recursos y su Aplicación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Depósito de documentos FAO. <http://www.fao.org/docrep/003/F0752S/F0752S00.HTM>

Hureau, J. C. 1970. Biologie compare de quelques poissons antarctiques (Nototheniidae). *Bulletin. Institut Oceanographique*. Mónaco. 68 (1391): 1-244.

Hyslop, E. 1980. Stomach contents analysis: a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*. (17): 411-429.

Lawrence, G. A., K. Won. 1986. An Illustrated Guide to the Marine Decapod Crustaceans of Florida. *Technical Series*. 8 (1): 760.

Morris, J. A. 2009. The Biology and Ecology of the Invasive Indo-Pacific lionfish. Dissertation, North Carolina State University. Raleigh. :16-33.

Morris, J. A Jr., P. E. Whitfield. 2009. Biology, ecology, control and management of the invasive Indo-Pacific lionfish: an updated integrated assessment. *NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS*. 99: 1-57.

Nikolsky, G.V., 1963. The ecology of fishes. Academic Press. New York, EUA. 352p.

Pinkas, L., M.S. Oliphant y I.L.K. Iverson. 1971. Food habits of albacore, bluefin tuna and bonito in California waters. *California Fish Game* 152: 105.

Ruiz-Carus, R., R. E. Matheson Jr, D. E. Robert Jr. y P. E. Whitfield. 2006. The westerns Pacific red lionfish, *Pterois volitans* (Scorpaenidae), in Florida: Evidence for reproduction and parasitism in the first exotic marine fish established in state waters. *Biological Conservation*. 128: 384-390.

Sabido-Itzá, M. M., A. Medina-Quej, A. Jesús-Navarrete, J. M. Gómes-Poot y M. C. García-Rivas. 2016. La estructura de tallas como evidencia del establecimiento de *Pterois volitans* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) en el sur del Caribe mexicano. *Biología Tropical*. 64 (1): 353-362.

Stillwell, C. y N. Kohler. 1982. Food, feeding habits, and estimates of daily ration of the short finmako (*Isurus oxyrinchus*) in the northwest Atlantic. *Environmental Biology of fishes*. Sci. 39: 407-414 p.

Talent, L.G. 1976. Food habits of the leopard shark, *Triakis semifasciata*, in Elknorn Slough, Monterey Bay, California. *California Fish Game*. 62: 286-298.

Tavares, M. 2002. Crustáceos, pp: 245-343. En: The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 1: Introduction, molluscs, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes, and chimaeras. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication. Rome.



## POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE LONGA LATÊNCIA: MONITORAMENTO DE EFICÁCIA DA INTERVENÇÃO FONOAUDIOLÓGICA EM ESCOLARES COM DISLEXIA

*Data de aceite: 10/01/2022*

*Data de submissão: 13/10/2021*

### **Ana Luiza de Faria Luiz**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/8255593946512682>

### **Yara Bagali Alcântara**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/7869185631217646>

### **Brena Elisa Lucas**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/4288401742343204>

### **Carolina Almeida Vieira**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/5386577956923698>

### **Simone Aparecida Capellini**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/9057316530389548>

### **Ana Cláudia Figueiredo Frizzo**

Departamento de Fonoaudiologia. Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Marília-São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/2939620990280199>

**RESUMO:** **Introdução:** A Dislexia é um distúrbio que afeta o aspecto da aprendizagem, principalmente a leitura e a escrita e a discriminação dos sons e que requer tratamento ao longo da infância. O Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência é um dos métodos mais utilizados para a pesquisa clínica de aspectos que incluem o processamento de informações linguísticas. O PEALL fornece uma resposta eletrofisiológica relevantes na avaliação audiológica, por oferecer dados objetivos e quantitativos quanto à funcionalidade das estruturas auditivas centrais úteis no monitoramento de eficácia da intervenção terapêutica. **Objetivo:** comparar as medidas eletrofisiológicas pré e pós-intervenção fonoaudiológica de escolares com diagnóstico de dislexia. **Método:** Participaram do estudo quinze escolares disléxicos com idade inicial de 7 anos e 11 meses. O potencial evocado auditivo de longa latência foi pesquisado em duas varreduras, com estímulo tone burst variando em frequência e duração entre os estímulos frequente e infrequente apresentados aleatoriamente, num paradigma oddball. Procedimento realizado antes e após a intervenção fonoaudiológica. Na intervenção foi realizado treinamento das habilidades fonológicas e metalinguísticas de consciência de palavras, de sílabas, de fonemas, de rima e aliteração durante quatro meses. **Resultados:** Houve diferença estatisticamente significativa para diminuição das latências e amplitudes dos componentes P1, N1, P2 e N2 após a intervenção fonoaudiológica. **Conclusão:** A intervenção fonoaudiológica utilizada no estudo provocou diminuição nas latências e amplitudes do PEALL, que se mostrou um instrumento eficaz

na avaliação pré e pós-intervenção.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dislexia; Intervenção; Eletrofisiologia; Potencial evocado auditivo de Longa Latência.

## LONG LATENCY AUDITORY EVOKED POTENTIAL: MONITORING THE EFFECTIVENESS OF SPEECH THERAPY INTERVENTION IN STUDENTS WITH DYSLEXIA

**ABSTRACT: Introduction:** Dyslexia is a disorder that affects the aspect of learning, especially reading and writing and sound discrimination, and that requires treatment throughout childhood. The Long Latency Auditory Evoked Potential is one of the most used methods for the clinical research of aspects that include the processing of linguistic information. LLAEP provides an electrophysiological response relevant to audiological assessment, as it delivers objective and quantitative data regarding the functionality of central auditory structures useful in monitoring the effectiveness of therapeutic intervention. **Objective:** to compare the electrophysiological measurements before and after speech therapy intervention in students diagnosed with dyslexia. **Method:** Fifteen dyslexic schoolchildren with an initial age of 7 years and 11 months participated in the study. The long latency auditory evoked potential was investigated in two scans, with tone burst stimuli varying in frequency and duration between frequent and infrequent stimuli presented randomly, in an oddball paradigm. Procedure performed before and after speech therapy intervention. In the intervention, training in phonological and metalinguistic skills of awareness of words, syllables, phonemes, rhyme and alliteration was carried out for four months. **Results:** There was a statistically significant difference for decreased latencies and amplitudes of components P1, N1, P2 and N2 after the speech therapy intervention. **Conclusion:** The speech therapy intervention used in the study caused a decrease in LLAEP latencies and amplitudes, which proved to be an effective instrument in the pre- and post-intervention assessment.

**KEYWORDS:** Dyslexia; Intervention; Electrophysiology; Long Latency Auditory Evoked Potential.

## INTRODUÇÃO

O reconhecimento auditivo de estímulos sonoros está diretamente ligado aos processos de percepção e cognição do indivíduo. A percepção e o processamento dos sons exercem papel preditor na aquisição na leitura e da escrita. Para que estes processos ocorram adequadamente é necessário que haja a decodificação e a codificação dos estímulos auditivos, desta forma, escolares que apresentam dificuldade em processar tais estímulos têm grande probabilidade de apresentarem dificuldades de aprendizagem (ASHA, 2005).

Entre os distúrbios que afetam o aspecto da aprendizagem tem-se a dislexia, onde são afetados diferentes aspectos, principalmente, a leitura e a escrita e também, outro aspecto de suma importância, a discriminação dos sons.

Indivíduos com dislexia apresentam um déficit em decorrência de uma carência

no processamento dos sons de fala e por isso têm dificuldades quanto à discriminação, memória e percepção auditiva, aspectos diretamente ligados ao processamento auditivo (DALLY, 2006; KUJALA *et al.*, 2006; OLIVARES-GARCÍA., COLS., 2005).

Dentre os distúrbios de aprendizagem encontram-se os transtornos do neurodesenvolvimento, que segundo a DSM-V são caracterizados por alterações que se exteriorizam na época do desenvolvimento, ou seja, antes da fase escolar, onde apresentam prejuízos nos aspectos social, pessoal, escolar e profissional.

A dislexia está entre estes transtornos, e é considerado um transtorno de aprendizagem, onde o desempenho escolar está abaixo do esperado para a idade cronológica, do indivíduo. A principal dificuldade do disléxico é no componente fonológico, que por sua vez é responsável pelo acionamento das estruturas sonoras das palavras (DSM-V 2014). Além disso, é possível que o déficit fonológico, possa ocorrer devido às modificações do processamento auditivo, visto que a criança apresenta alterações quando necessário a discriminação de sons, ocasionando nas modificações do processamento temporal (ALVARENGA *et al.*, 2013).

Estudos recentes como CARDOSO, CAPELLINI (2009); CAPELLINI *et al.*, (2010) evidenciaram a eficácia de programas de intervenção fonoaudiológica, a fim de favorecer o desenvolvimento da leitura de crianças diagnosticadas com dislexia. Desta forma os programas de intervenção visam elaborar estratégias a fim de potencializar o desenvolvimento da habilidade de leitura, deste modo auxiliando a criança na associação do som com a escrita (ALVARENGA *et al.*, 2013).

Um dos métodos mais utilizados para estudar o sistema auditivo e seu funcionamento, incluindo o aspecto do processamento de informações linguísticas é o Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (PEALL). O PEALL faz o registro de atividades elétricas corticais que ocorrem frente a estímulos acústicos durante esse processamento. Esses potenciais estão diretamente ligados às funções corticais superiores como atenção do cérebro ao som, discriminação auditiva, memória imediata e tomadas de decisão e raciocínio intrínsecos à cognição. Esse tipo de potencial cortical depende da ativação de áreas neurais distintas, tálamo e córtex (KRAUS; MCGEE, 1999; HALL, 2006).

O Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (PEALL) é uma modificação eletrofisiológica que ocorre no sistema auditivo periférico e central (regiões do tálamo e córtex auditivo), decorrente de um estímulo elétrico. Ele tem por objetivo ponderar as mudanças da atividade neurofisiológica do sistema nervoso, verificando assim a integridade da via auditiva. O PEALL apresenta um seguimento de onda positiva-negativa-positiva (P1, N1, P2, N2 e P3) superior e inferior de modo respectivo (REIS; FRIZZO; 2012). Ele é indicado para pacientes com alterações no processamento auditivo, distúrbios de aprendizagem, atenção e memória, assim destaca-se a avaliação eletrofisiológica para o monitoramento das intervenções.

Desta forma o PEALL, de acordo com SOARES *et al.*, (2011) é um importante

instrumento de avaliação do sujeito com dislexia, onde ele auxilia no encaminhamento terapêutico, e ainda disponibiliza um maior detalhamento das alterações neurológicas existentes.

A avaliação pré e pós-intervenção utilizando medidas eletrofisiológicas é de suma importância, pois foi constatado na literatura progresso após a intervenção fonoaudiológica nas crianças com dislexia (Kátia Alvarenga et al, 2013).

Apesar do grande número de estudos na literatura de âmbito nacional e internacional, correlacionando processamento auditivo e dislexia, há poucos estudos no que se refere ao monitoramento terapêutico empregando os PEALL, o que demonstra a importância deste instrumento para a medida da eficácia terapêutica.

## OBJETIVO

Comparar as medidas eletrofisiológicas pré e pós-intervenção fonoaudiológica em indivíduos com dislexia.

## MÉTODO

O presente estudo foi aprovado em 08/10/2015 pelo Comitê de Ética da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade Estadual Paulista FFC/UNESP/Marília – SP, 49583615.4.0000.5406. Todos os responsáveis pelos sujeitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início das avaliações, e todos os sujeitos que participaram da pesquisa assinaram termo de assentimento livre e esclarecido.

Participaram deste estudo, 15 escolares com diagnóstico de dislexia de ambos os gêneros com idade inicial de 7 anos e 11 meses. Todas passaram pelo processo de avaliação e intervenção pela equipe interdisciplinar do Centro de Estudos da Educação e Saúde – CEES/UNESP – Marília.

Os responsáveis dos escolares foram inicialmente submetidos a uma anamnese para a coleta de dados relativos a queixas auditivas, presença de fatores de risco para deficiência auditiva, queixa de otite, entre outras alterações relacionadas à orelha externa e orelha média. Em seguida, foi realizada a inspeção do meato acústico externo, verificando as condições para realização da avaliação audiológica.

Estes escolares estavam regularmente matriculados em escola regular do município de Marília-SP e de Botucatu – SP e foram submetidos à avaliação fonoaudiológica e à avaliação interdisciplinar (neurologista, neuropsicológica, psicopedagoga) e tiveram seu diagnóstico determinado em função de suas habilidades de leitura no Centro de Estudos da Educação e Saúde – CEES/FFC/UNESP-Marília-SP no Laboratório de Investigação dos Desvios da Aprendizagem – LIDA/FFC/UNESP e no Ambulatório de Neurologia Infantil – Desvios da Aprendizagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – FM/

Para a realização do PEALL os sujeitos foram acomodados em sala acusticamente tratada e temperatura controlada em 24°C, posicionados em uma poltrona reclinável e orientados a permanecerem em estado de alerta e identificar o estímulo raro (2000Hz). O equipamento utilizado foi o *Biologic Navigator Pro* e registrado mediante a utilização de cinco eletrodos descartáveis posicionados em Fz e Cz em referência ao lóbulo direito (A2) e esquerdo (A1), utilizando-se os 2 canais de registro do equipamento, o eletrodo terra foi posicionado em Fpz. A impedância foi mantida em um nível inferior a 5 k ohms.

O P300 foi pesquisado em duas varreduras, o estímulo acústico tone burst a 70dB NA, diferindo quanto à frequência (1000Hz- estímulo frequente e 2000Hz- estímulo raro), e diferindo quanto à duração (1000Hz -estímulo frequente e 1000Hz -estímulo raro) apresentados aleatoriamente, num paradigma oddball, numa velocidade de 1.1 estímulos por segundo, com uma probabilidade de ocorrência do estímulo raro de 20% do total de 200 estímulos e de platô 60.00 (ms) no raro e no frequente o platô de 30.00 (ms), com elevação 10.00 (ms). O tempo de análise das ondas foi de 500ms, com filtro de 0,5 a 30 Hz e sensibilidade de 50.000 uV e polaridade alternada. A apresentação dos estímulos foi randomizada em relação à orelha estimulada, alternando-as a fim de evitar viés nos resultados.

A identificação das ondas dos PEA seguiu critérios estabelecidos na literatura (JUNQUEIRA; COLAFÊMINA, 2002, adaptado), que inclui a visualização de picos de ondas com polaridades alternadas (negativa-positiva), considerando a replicação dos traçados. Na pesquisa do PEALL, foram analisadas as latências e amplitudes das ondas P1, N1, P2, N2 e P3 (POLICH; JOHN, 2007).

A intervenção fonoaudiológica foi realizada num período de quatro meses, em sessões de 50 minutos, duas vezes por semana e foram utilizados os seguintes programas: Programa de Remediação Fonológica Associado ao Treino de Leitura, Manipulação Silábica, Treino de Leitura, Programa de Intervenção com as Dificuldades Ortográficas, Mapa mental e Técnica da Janela de acordo com o protocolo de estimulação do pré-determinados pelo Laboratório de Investigação dos Desvios da Aprendizagem – LIDA/FFC/UNESP.

O Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência (P300) foi realizado antes do início da intervenção fonoaudiológica e após o término das sessões.

Para a análise estatística foi realizado a média, desvio padrão e Test T de medidas repetidas para a comparação dos valores de latência e amplitude pré e pós-intervenção. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados foram analisados no software SPSS (versão 24.0).

## RESULTADOS

Foram avaliados 15 escolares com diagnóstico de dislexia, com idades entre sete

e 10 anos.

A Tabela 1 apresenta a distribuição da média e desvio padrão dos valores de latência do complexo de ondas P1-N1-P2-N2-P3 aferidos à direita e esquerda quanto a estímulo de frequência e duração dos escolares com dislexia avaliados antes e após a intervenção fonoaudiológica.

		Latência					
		Pré			Pós		P
		Complexos	Média	DP	Média	DP	
Frequência	OD P1	133,86	23,61	111,35	24,62	0,04*	
	OD N1	166,86	20,66	140,01	24,81	0,02*	
	OD P2	237,75	1,52	222,95	42,17	0,24	
	OD N2	265,12	1,42	250,96	48,91	0,24	
	OD P3	350,91	30,12	341,31	38,89	0,28	
	OE P1	123,97	2,89	100,43	26,03	0,03*	
	OE N1	156,24	1,42	132,39	29,30	0,02*	
	OE P2	267,01	36,85	227,66	65,28	0,06*	
	OE N2	291,13	53,05	260,85	53,44	0,07*	
Duração	OE P3	350,70	1,52	337,78	38,85	0,21	
	OD P1	133,70	24,40	127,66	26,77	0,30	
	OD N1	175,65	21,56	162,12	25,08	0,10	
	OD P2	251,44	33,97	241,86	52,47	0,31	
	OD N2	277,05	34,55	276,86	49,29	0,49	
	OD P3	355,87	36,44	347,00	35,98	0,29	
	OE P1	114,86	28,52	125,06	35,26	0,23	
	OE N1	148,07	27,09	155,06	38,93	0,32	
	OE P2	224,16	41,39	218,12	64,80	0,40	
	OE N2	263,26	32,49	258,72	56,75	0,41	
	OE P3	359,81	29,75	330,13	41,76	0,04	

Legenda: DP = desvio padrão; média; desvio padrão; valor de  $p^* \leq 0,05$ .

Tabela 1. Valores médios de latência pré e pós-intervenção para os estímulos acústicos de frequência e duração.

Foi possível observar diminuição da latência com diferença estatisticamente significativa para os componentes P1 e N1 da orelha direita e para os componentes P1-N1-P2-N2 orelha esquerda com estímulo de frequência. Já para o estímulo de duração não houve diferença estatisticamente significativa.

A Tabela 2 apresenta a distribuição da média e desvio padrão dos valores de amplitude do complexo de ondas P1-N1-P2-N2-P3 aferidos à direita e esquerda quanto a estímulo de frequência e duração dos escolares com dislexia avaliados antes e após a

intervenção fonoaudiológica.

		Amplitude				
		Pré		Pós		P
		Média	DP	Média	DP	
Frequência	Complexos					
	OD P1	1,49	1,61	1,45	1,00	0,47
	OD N1	3,16	2,94	3,42	1,52	0,40
	OD P2	1,53	1,41	0,97	0,49	0,12
	OD N2	2,81	2,82	2,52	1,50	0,38
	OD P3	5,01	1,53	4,80	3,36	0,42
	OE P1	1,33	1,01	1,50	0,94	0,35
	OE N1	4,09	3,08	2,14	1,32	0,04*
	OE P2	1,52	1,29	2,58	2,18	0,10
	OE N2	2,03	1,43	2,90	1,99	0,13
	OE P3	5,05	2,55	5,30	2,45	0,41
Duração	OD P1	1,80	0,98	1,43	1,77	0,28
	OD N1	2,45	1,04	2,10	1,35	0,26
	OD P2	2,76	1,58	1,33	1,30	0,02*
	OD N2	2,57	1,45	2,40	1,95	0,41
	OD P3	3,54	2,43	2,63	1,91	0,18
	OE P1	1,41	1,25	1,76	0,90	0,24
	OE N1	3,14	2,32	2,61	1,81	0,29
	OE P2	1,68	1,43	1,5	1,09	0,37
	OE N2	3,18	2,74	2,02	1,24	0,11
	OE P3	4,41	1,74	3,98	1,61	0,33

Legenda: DP = desvio padrão; média; desvio padrão; valor de  $p^* \leq 0,05$ .

Tabela 2. Valores médios de amplitude pré e pós-intervenção para os estímulos acústicos de frequência e duração.

Foi possível observar diferença estatisticamente significativa para o componente N1 da orelha esquerda para o estímulo de frequência e para os componentes P2 da orelha direita para o estímulo de duração.

## DISCUSSÃO

O potencial evocado auditivo de longa latência (PEALL) é um teste eletrofisiológico que exige à discriminação auditiva consciente do estímulo raro ou infrequente na presença do estímulo frequente e demanda funções cognitivas auditivas (DUARTE et al, 2009; REIS & FRIZZO, 2013). A presença do complexo de ondas P1-N1-P2 está relacionada ao processamento dos aspectos físicos do estímulo e diretamente dependente de

suas características. Já o P3 caracteriza-se por denotar aspectos da função cognitiva, principalmente por pesquisar o nível de atenção empregado para a discriminação auditiva e a discriminação propriamente dita (GUÇÃO, 2014).

Em crianças os valores do complexo N1- P1- N2 variam entre 60 a 300 ms pós-estímulo, e o P3 deve estar entre 240 e 400 ms pós-estímulo (JUNQUEIRA & COLAFÊMINA, 2002). Neste estudo, na avaliação pré-intervenção foi observada latência alongada e a amplitude diminuída das componentes de onda P1-N1-P2. Estudos comparativos realizados em crianças com transtorno de aprendizagem e dislexia mostraram que os complexos são mais longos e deficitários nos disléxicos (REGAÇONE et al, 2014; ROCA et al, 2013; ROMERO et al, 2013; SOARES et al 2011).

A dislexia tem sido descrita como um distúrbio específico de leitura neurobiológico que apresenta alterações no lobo temporal. Tais alterações têm sido descritas na literatura como responsáveis pelas dificuldades sensoriais auditivas e visuais dos disléxicos. Essas alterações podem interferir e alterar o papel central do lobo temporal no processamento auditivo (VIEIRA, 2007; SAUER et al, 2006; BARRETO, 2009) confirmado pelos achados deste estudo.

De acordo com os resultados obtidos após a intervenção foi possível observar também a diminuição tanto das amplitudes como das latências do complexo de ondas do PEALL pós-intervenção, sendo um fator indicativo da eficácia terapêutica (ROCA et al, 2013). Além disso, a diminuição da latência dos componentes de onda das mesmas medidas mostra que o trabalho com as habilidades fonológicas induziu às mudanças no sistema nervoso auditivo central, mudanças estas monitoradas pelas medidas destes potenciais (ALVARENGA et al, 2013).

Assim, O PEALL é um instrumento mostrou-se um instrumento diagnóstico válido para avaliação da evolução dos escolares e fornece informações que auxiliam no direcionamento do processo de intervenção de crianças com Dislexia.

## CONCLUSÃO

A intervenção fonoaudiológica utilizada no estudo provocou diminuição nas latências e amplitudes do PEALL, que mostrou ser um apropriado instrumento de avaliação pré e pós-intervenção no monitoramento da eficácia terapêutica.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, K. F., et al. **Potencial Cognitivo Auditivo-P300 como indicador de evolução terapêutica em escolares com Dislexia do Desenvolvimento**. Codas, Vol. 25, p. 500-505, 2013.

AMERICAN SPEECH-LANGUAGE-HEARING ASSOCIATION- ASHA *et al.* **Central auditory processing disorders**. 2005. Disponível <https://www.asha.org/policy/TR2005-00043/#sec1.2>. Acesso em: 18 fev. 2021.



AQUINO, A. M. C. M. **Processamento auditivo: eletrofisiologia & psicoacústica**. 1. ed. São Paulo: Lovise, 2002. 176.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5. ed. São Paulo: artmed, 2013. 992.

BARRETO, M. A. D. S. C. **Caracterizando e correlacionando dislexia do desenvolvimento e processamento auditivo**. *Revista Psicopedagogia*, vol. 26, n.79, p.88-97, 2009.

CAPELLINI, S. A, ZORZI, J. L. **Dislexia e outros distúrbios da leitura-escrita: letras desafiando a aprendizagem**. 2. ed. São José dos Campos: Pulso, 2009. 319.

CARDOSO, R. K. O. A, CAPELLINI S. A. **Eficácia do programa de intervenção com a consciência fonológica em escolares com risco para a dislexia**. *Revista Psicopedagogia*, Vol. 26, p. 396-407, 2009.

DALLY, K. **The Influence of Phonological Processing and Inattentive Behavior on Reading Acquisition**. *Journal of Educational Psychology*, 98(2), 420-437, 2006.

DUARTE, J. L., et al. **Potencial evocado auditivo de longa latência-P300 em indivíduos normais: valor do registro simultâneo em Fz e Cz**. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, Vol. 75, p. 231-236, 2009.

FISHER, T., AHARON-PERETZ, J., PRATT, H. **Dis-regulation of response inhibition in adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): an ERP study**. *Clinical Neurophysiology*, Vol. 122, p. 2390-2399, 2011.

GUÇÃO, A. C. B. **Efeito da variação de frequência e duração do estímulo no registro do P300 e MMN**. 2014. 89f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Marília.

HALL, J. W. **New Handbook for Auditory Evoked Responses**. Boston: Pearson Education, 2006.

JUNQUEIRA, C. A., COLAFÊMINA, J. F. **Investigação da estabilidade inter e intra-examinador na identificação do P300 auditivo: análise de erros**. *Rev Bras Otorrinolaringol*, Vol. 68, p. 468-78, 2002.

KRAUS, N.; MCGEE, T. **Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência**. In: KATZ, J. (ed.). *Tratado de Audiologia Clínica*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 403-414.

KUJALA, T.; LOVIO, R.; LEPISTÖ, T.; LAASONEN, M.; NÄÄTÄNEN, R. **Evaluation of multi-attribute auditory discrimination in dyslexia with the mismatch negativity**. *Clinical Neurophysiology*, v. 117, n.4, p. 885-893, 2006. Doi: 10.1016/j.clinph.2006.01.002.

MACHADO, C. S. S., CARVALHO, A. C. O., SILVA, P. L. G. **Caracterização da normalidade do P300 em adultos jovens**. *Rev. Soc. Bras. Fonoaudiol*, Vol. 14, p. 83-90, 2009.

OLIVARES-GARCÍA, M.R. et al. **Identificación de la lateralidad auditiva mediante una prueba dicótica nueva con dígitos em español, y de la lateralidad corporal y orientación espacial em niño con dislexia y en controles**. *Revista de Neurologia*, v. 41, n. 4, p. 198-205, 2005. DOI: 10.33588/rn.4104.2004076

OLIVEIRA, J. C., et al. **Processamento auditivo (central) em crianças com dislexia: avaliação comportamental e eletrofisiológica.** *Codas*. Vol. 43, p. 39-44, 2013.

REGAÇONE, S. F., et al. **Potenciais evocados auditivos de longa latência em escolares com transtornos específicos de aprendizagem.** *Audiology-Communication Research*, p. 13-18, 2014.

REIS, A. C. M. B; FRIZZO, A. C. F. **Potencial Evocado Auditivo Cognitivo.** IN: BOÉCHAT, E.M, et al. Ed. 2. Rio de Janeiro: ed. Santos, 2015. Cap. 19, p. 140-149.

ROCA, P., et al. (2013). **Potencial executiva e P300 antes e depois do tratamento na operação transtorno de déficit de atenção / hiperatividade.** *Rev Neurol*, p. S107-S118, 2013.

ROMERO, A. C. L. **Processamento auditivo comportamental e eletrofisiológico em crianças com Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH).** *Repositório UNESP*, 2013.

SAUER, Luciane et al. **Processamento auditivo e SPECT em crianças com dislexia.** *Arq Neuropsiquiatr*, v. 64, n. 1, p. 108-11, 2006.

SILVA, C, CAPELLINI, S. A. **Eficácia do programa de remediação fonológica e leitura no distúrbio de aprendizagem.** *Pró-Fono*, Vol. 22, p. 131-9, 2010.

SOARES, A. J. C., et al. **Potenciais evocados auditivos de longa latência e processamento auditivo central em crianças com alterações de leitura e escrita: dados preliminares.** *Arquivos Int. Otorrinolaringol*, Vol. 15, p. 486-91, 2011.

SOUZA, L. C. A, et al. **Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas.** 3. ed. São Paulo: Novo Conceito, 2008. 372.

TSAI, M. L., HUNG, K. L., LU, H. H. **Auditory event-related potentials in children with attention deficit hyperactivity disorder.** *Pediatrics & Neonatology*, Vol. 53, p. 118-124, 2012.

VIEIRA, P. A. C. **Influência das desordens de processamento auditivo na avaliação neuropsicológica de pessoas com dificuldade de aprendizagem.** 2007. 117f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

YORBIK, O., et al. **Potential effects of zinc on information processing in boys with attention deficit hyperactivity disorder.** *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 32, p. 662-66, 2008.

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 08/10/2021

### **Alana Ramos Nobre**

Universidade Federal de Sergipe,  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
ID LATTES: 1414255929882930

### **Karollyna Menezes Silva**

Universidade Federal de Sergipe,  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7824-3377>

### **Keilla Santos Cerqueira**

Universidade Federal de Sergipe,  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1308-0754>

### **Jacqueline Rego da Silva Rodrigues**

Universidade Federal de Sergipe,  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4033-5254>

### **Roberto Rodrigues de Saouza**

Universidade Federal de Sergipe,  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8919-2675>

**RESUMO:** As microalgas têm sido o foco de muitas pesquisas biotecnológicas devido à sua rica composição, à quantidade de substâncias

que podem ser sintetizadas através desses microrganismos e a imensa biodiversidade, que pode ser aprimorada geneticamente. As principais aplicações estão ligadas à produção de alimentos funcionais, produtos naturais com grande potencial nutricional e farmacêutico, bem como na produção de biocombustíveis, como o biodiesel, por meio dos lipídios contidos na biomassa. Desta forma, o presente estudo busca analisar alguns fatores que influenciam no processo de lise celular e extração, etapas ligadas à recuperação do lipídio, através da microalga pertencente à espécie Chlorophyta, a *Scenedesmus* sp., comparando dois métodos de extração (Bligh & Dyer com ultrassom e Soxhlet), dois sistemas de solventes (CEA – Clorofórmio/etanol/água e CMA – Clorofórmio/metanol/água) e dois tipos de pré-tratamentos (ultrassom e autoclave) para realizar a quebra da célula. Foi observado que para ambos os sistemas de solvente, o pré-tratamento com autoclave foi mais eficiente, promovendo a remoção de quase todo o lipídio contido na biomassa, com porcentagens médias de 19,24% para o metanol e 19,27% para o etanol, frente às porcentagens de 10,78% e 17,31% respectivamente, com o uso da ultrassom. O método de Bligh & Dyer com ultrassom teve melhor desempenho com um menor tempo de operação, além de ser uma extração a frio, que não desencadeia processos oxidativos nos lipídios. Quanto ao sistema de solvente, o melhor resultado médio foi obtido com o etanol, cuja a porcentagem total média foi correspondente a 18,29%, frente a 15,36%, porcentagem média total do metanol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalga; extração; lipídio.

## COMPARISON OF LIPID EXTRACTION METHODS FROM MICROALGA *Scenedesmus* sp.

**ABSTRACT:** Microalgae have been the focus of much biotechnology research because of their rich composition, the amount of substances that can be synthesized through these microorganisms, and the immense biodiversity that can be genetically improved. The main applications are linked to the production of functional foods, natural products with great nutritional and pharmaceutical potential, as well as the production of biofuels, such as biodiesel, through the lipids contained in biomass. Microalgae biofuel is a renewable energy source that assists in mitigating carbon dioxide in the present atmosphere, as well as not competing with food production in the world and replacing petroleum products. In that way, the present study aims to analyze some factors that influence the cell disruption process and extraction, stages linked to lipid recovery, through the microalga belonging to the species Chlorophyta, *Scenedesmus* sp., Comparing two methods of extraction (Bligh & Dyer with ultrasound and Soxhlet), two solvent systems (CEA - Chloroform / ethanol / water and CMA - Chloroform / methanol / water) and two types of pre - treatments (ultrasonic and autoclave) to perform the cell break. It was observed that for both solvent systems, pretreatment with autoclave was more efficient, promoting the removal of almost all the lipid contained in the biomass, with average percentages of 19.24% for methanol and 19.27% for the ethanol, compared to the percentages of 10.78% and 17.31%, respectively, with the use of ultrasound. The Bligh & Dyer ultrasound method had better performance with a shorter operating time, besides being a cold extraction, which does not trigger oxidative processes in the lipids. As for the solvent system, the best average result was obtained with ethanol, whose average total percentage corresponded to 18.29%, compared to 15.36%, mean total percentage of methanol.

**KEYWORDS:** Microalga; extraction; lipid.

### 1 | INTRODUÇÃO

As algas compreendem um grupo variado de organismos fotossintéticos divididos em duas categorias principais com base no tamanho e morfologia das células: microalgas e macroalgas. As macroalgas, como as algas, são feitas de células que formam estruturas semelhantes a raízes, caules e folhas, já as microalgas, em vez disso, são organismos unicelulares e microscópicos (Patel *et al.*, 2019).

Indiretamente as microalgas auxiliam a manter os níveis de oxigênio adequados à vida dos seres vivos na atmosfera. Conforme escrito por Ramirez (2013), esses microrganismos são capazes de fixar entre 1,65 a 1,83 quilogramas do  $CO_2$  presente na atmosfera com apenas 1 quilograma de biomassa seca. O que demonstra o grau de relevância desses microrganismos na sobrevivência do ser humano e do meio ambiente.

As microalgas apresentam grande potencial biotecnológico para a obtenção de produtos de alto valor agregado às indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, como ingredientes alimentícios, rações e aquicultura, antioxidantes e substâncias bioativas, inclusive para sua utilização em processos de tratamento de efluentes,  $CO_2$  captura, produção de biodiesel, entre outros (Rodríguez-Torres *et al.*, 2021).

## 1.1 Microalga *Scenedesmus* sp.

A *Scenedesmus* sp. é uma espécie aquática pertencente ao grupo das algas verdes (*Chlorophyta*), da família *Scenedesmaceae*. São algas de superfície que predominam em rios e lagos de água doce. São capazes de se desenvolverem em efluentes contaminados ou com alto teor de minerais, essa espécie pode conferir à água o odor e sabor de capim (Ramirez, 2013).

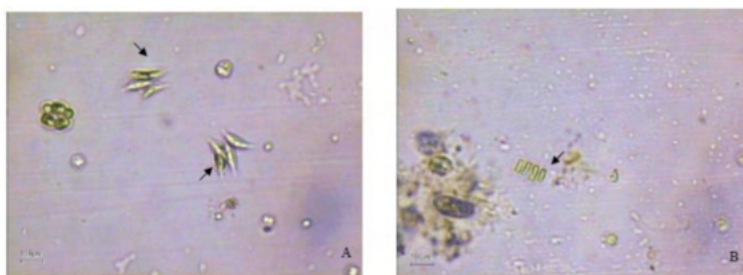


Figura 1 - *Scenedesmus* sp, imagens digitais obtidas em microscópio óptico (aumento: 400x). A. Colônias com células fusiformes. B. Colônias com células ovaladas.

Fonte: Sousa (2007).

De acordo com Andrade (2014) a *Scenedesmus* sp possui um teor de lipídios entre 19,6% e 21,1% em peso de biomassa seca. Pereira *et al.* (2012) afirma que as taxas de ácidos graxo podem chegar até 65% e segundo Ramirez (2013), a espécie *Scenedesmus* sp. possui até 56% de proteínas e 52% de carboidratos.

## 1.2 Composição química das microalgas

A composição química das microalgas varia a depender da sua espécie e das condições de cultivo para cada espécie; além de outros fatores. Basicamente quatro componentes estão presentes majoritariamente na biomassa microalgal, sendo estes as proteínas, os lipídios, os pigmentos e os carboidratos (Andrade *et al.*, 2014).

Vários são os fatores que contribuem para a variação nas composições da parede celular, como a fase de crescimento, as condições de cultivo e a presença de fatores de estresse. A estrutura da parede celular tem um efeito importante na eficiência de rompimento e na liberação de biomoléculas intracelulares. No entanto, as paredes das células microalgais são complexas, por isso, precisam de uma melhor investigação (Phong *et al.*, 2018).

As proteínas, compostos orgânicos de alto peso molecular, representam cerca de 50 a 80% da composição em peso da biomassa seca de microrganismos em geral e, de acordo com Andrade *et al.* (2014), estudos com diversas espécies de microalgas demonstram um percentual de 8 a 71 % de proteínas, o que justifica o seu uso como suplemento proteico.

O teor de lipídios em termo de biomassa seca pode variar de uma espécie para outra, atingindo valores de 5 a 77% e níveis lipídicos entre 20 e 50% são fáceis de se obter controlando a quantidade de nutrientes fornecidos (Zorn *et al.*, 2017).

A clorofila fica localizada nos cloroplastos das células, juntamente com os carotenoides. Os carotenoides são pigmentos que possuem afinidade com substâncias orgânicas e podem assumir cores variadas, como tons de amarelo, vermelho, marrom e laranja. Usualmente cerca de 0,1 a 2,0% da biomassa das microalgas seca é composta de carotenoides, sendo sua estrutura formada por 40 carbonos (Andrade *et al.*, 2014).

Os carboidratos das microalgas são constituintes da parede celular e reserva de polissacarídeo. Conforme mencionado por Andrade *et al.* (2014), aproximadamente 5 a 20% da composição na microalga seca é composta por carboidratos totais. De acordo com Ramirez (2013) espécies *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina* possuem as maiores porcentagens de carboidratos, especialmente amido.

### 1.3 Fatores e condições fundamentais para o crescimento das Microalgas

Para um bom cultivo e produtividade da microalga é necessário entender a composição das células e otimizar os processos através do controle das condições a quais a microalga é exposta. Dessa forma, a limitação de nutrientes, luminosidade, pH, temperatura, composição de nitrogênio, concentração de cloreto de sódio, por exemplo, são fatores diretos para o crescimento da microalga (Dolganyuk *et al.*, 2020).

Segundo De Medeiros Jeronimo, Silva e Bacholsky (2015), para que as microalgas possam se desenvolver, é necessário que haja fatores classificados como físicos e nutritivos importantes ao seu desempenho celular e atividades metabólicas.

O carbono é o macronutriente mais importante no cultivo das microalgas, visto que a sua contribuição para a biomassa é estimada em 50%, distribuído entre as proteínas, vitaminas, carboidratos e lipídios (Andrade, 2014). Além do carbono, os principais macronutrientes são o nitrogênio, fósforo e ferro. Meios de cultura pobres em nitrogênio conduzem a microalga a usar o carbono disponível no cultivo para a produção de carboidratos e lipídios, ou, em algumas espécies, favorece a produção de pigmentos ao invés da produção de proteínas (Andrade, 2014). A Tabela 1 ilustra quais são os macronutrientes, a forma usual na natureza e a forma química em meio de cultura.

Elemento	Forma usual encontrada na natureza	Forma química fornecida em meio de cultura
Carbono (C)	CO <sub>2</sub> , compostos orgânicos	Glicose, malato, acetato, entre outros
Hidrogênio (H)	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos
Oxigênio (O)	H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> , compostos orgânicos	H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> , compostos orgânicos
Nitrogênio (N)	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> , compostos orgânicos nitrogenados	NH <sub>4</sub> Cl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KNO <sub>3</sub> , N <sub>2</sub> , aminoácidos, entre outros.
Fósforo (P)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Enxofre (S)	H <sub>2</sub> S, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> S, entre outros
Potássio (K)	K <sup>+</sup> em solução ou sais de K	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Magnésio (Mg)	Mg <sup>2+</sup> em solução ou sais de Mg	MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>
Sódio (Na)	Na <sup>+</sup> em solução ou sais de Na	NaCl
Cálcio (Ca)	Ca <sup>2+</sup> em solução ou sais de Ca	CaCl <sub>2</sub>
Ferro (Fe)	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> ou sais de Fe	FeCl <sub>3</sub> , FeSO <sub>4</sub> , Fe <sup>3+</sup> EDTA

Tabela 1 - Macronutrientes e suas respectivas fontes na natureza

Fonte: Andrade (2014).

### 1.3.1 Intensidade Luminosa e Tempo de Iluminação

Intensidades luminosas baixas estimulam a formação de uma biomassa rica em clorofila, enquanto altas intensidades favorecem os parâmetros de crescimento. A faixa espectral da radiação absorvida pelas algas fotossintetizantes é de 400 nm a 700 nm e estes organismos não diferenciam a luminosidade natural da artificial, o que facilita o seu cultivo em laboratório. Desta forma, a fonte de luz é definida em termos de fotoperíodos (tempo de iluminação) e em cultivos de laboratório usualmente aplica-se 12 horas de luz, promovidas por lâmpadas fluorescentes e de luz branca (Andrade *et al.*, 2014).

### 1.3.2 Temperatura

A temperatura também é um fator crítico para o cultivo de microalgas. A temperatura afeta diretamente o metabolismo, a absorção de nutrientes, a biofixação de CO<sub>2</sub>, a fotossíntese e a taxa de crescimento (Daneshvar *et al.*, 2021). Conforme Andrade *et al.* (2014), a temperatura de cultura das microalgas afeta a taxa metabólica e a sua composição também pode variar de acordo com cada espécie e o seu valor ótimo para o cultivo depende do local onde a espécie foi coletada. Dessa forma, como exemplo, microalgas provenientes de ambientes temperados possuem temperatura ótima de cultivo na faixa de 10°C a 25°C, já as oriundas de ambientes polares a temperatura ideal de cultivo é abaixo de 10°C.

### 1.3.3 pH

O potencial de hidrogênio (pH) é de grande importância no cultivo de microalgas, pois é possível determinar a solubilidade dos minerais e do dióxido de carbono no meio, além do efeito direto nas próprias microalgas (Dolganyuk *et al.*, 2020).

### 1.3.4 Agitação

A agitação é um fator importante pois, segundo Andrade (2014), ela evita a sedimentação das microalgas, proporcionando desta forma uma exposição das células à luz de forma mais homogênea. Além disso, a agitação mantém os nutrientes em suspensão, aumentando a sua disponibilidade no meio. Baseado em estudos de Silva Cardoso, Vieira e Marques (2011), afirma-se que os principais sistemas de cultivo de microalgas consistem em fotobiorreatores fechados, lagoas ou tanques abertos aerados.

Sistemas fechados é um método de cultivo por foto biorreactores (PBRs). A principal vantagem dos PBRs é o controle do crescimento das algas, o que leva a uma alta produtividade da biomassa algal. Além disso, por meio da otimização e controle das condições do ambiente de cultivo, a contaminação com outras espécies de algas pode ser evitada (Jankowska, Sahu e Oleskowicz-Popiel, 2017). Segundo Franco *et al.* (2013), boa parte do cultivo de microalgas em larga escala tem sido realizado em cultivo aberto, em lagoas ou tanques que utilizam a luz solar e o CO<sub>2</sub> atmosférico.

## 1.4 Aplicação de microalgas na indústria

As microalgas fornecem inúmeras vantagens para a produção de biocombustíveis: alto crescimento e produtividade, potencial para altos teores de lipídios ou carboidratos, capacidade de crescer em águas residuais, salinas ou água do mar. (Branco-Vieira *et al.*, 2020). Devido ao aumento do custo do petróleo, passou-se a investir em processos termoquímicos e bioquímicos para converter a biomassa microalgal em biocombustíveis (Almeida Lopes *et al.*, 2015). Outro fator motivador é o teor de lipídios contidos na biomassa, que pode variar de 1 a 77% da massa seca (Zorn *et al.*, 2017).

Segundo Bertoldi, Sant'anna e Oliveira (2008), o custo com substrato no cultivo de microrganismos, visando a obtenção de bioprodutos, corresponde a uma porcentagem de 40% a 60% do custo total de produção. Desta forma, utilizam-se meios de cultura alternativos como esgotos domésticos, dejetos industriais, lodo digerido e vinhaça de cana-de-açúcar.

Dentre os produtos e processamentos mais importantes a serem realizados através de microalgas estão: a produção de ácidos graxos (aplicado à produção de biodiesel), tratamento de águas residuárias, produção de suplementos alimentares e biofertilizantes. Pesquisas mais recentes começaram a ser desenvolvidas para direcionar o cultivo de microalgas para a obtenção de combustíveis de aeronaves, como exemplo, a produção de hidrogênio. Tal utilização é aplicada à grandes escalas de produção (Ramirez, 2013).

## 1.5 Processos para extração de lipídeos nas microalgas

Após o cultivo das microalgas é necessário realizar pré-etapas de separação sólido-líquido dos cultivos. Essa etapa é conhecida como colheita de biomassa e serve para concentrar e recuperar a biomassa a ser processada. Usualmente a etapa de colheita pode ser feita através da coagulação, filtração ou centrifugação, esta que se destaca por deixar



uma menor quantidade de água na biomassa (Andrade *et al.*, 2014).

De acordo com Pereira *et al.* (2012), o processo de extração requer várias etapas com o objetivo de obter maior eficiência e rendimento. Para isso, pode-se utilizar recursos como enzimas, solventes químicos ou fluido supercrítico, onde o dióxido de carbono sob pressão e aquecimento funciona como um solvente. Zorn *et al.* (2017) realizaram estudos acerca do método de extração por solvente proposto por Bligh e Dyer (1959), o qual utiliza uma constante mistura de clorofórmio, metanol e água. Nesse estudo realizou-se uma análise das principais variáveis que influenciam no processo de extração, sendo elas a umidade da biomassa, a proporção de solventes, o volume total de solventes e o tempo de ultrassom utilizado.

Outro método muito estudado é de Soxhlet, no qual há uma constante renovação do solvente em contato com a matriz graxa e suas principais vantagens consistem na alta temperatura que o sistema pode atingir por conta da evaporação e não necessita de filtração. Nesse método deve-se evitar o refluxo por muitas horas devido a possíveis reações de peroxidação e hidrólise dos lipídios (Brum e Arruda, 2009).

Ramluckan, Moodley e Bux (2014) fizeram um estudo aprofundado do método de Soxhlet utilizando solventes puros e misturas, variando os tempos totais de refluxo. Para uma melhor análise das amostras realizou-se a cromatografia, visto que a extração por solvente possui a desvantagem de extrair outros compostos da biomassa, especialmente alguns pigmentos. Através desse estudo pôde-se concluir que a porcentagem de lipídios extraídos é maior utilizando misturas de solventes, o tempo ideal de extração é 3 horas e o sistema clorofórmio e etanol (1:1) apresentou melhores resultados e uma remoção de clorofila correspondente a menos de 0,5%.

De uma forma geral, dentre os principais fatores que influenciam na extração de lipídios estão a eficiência da lise celular, o volume total de solvente contido no sistema, a proporção de solventes polares e apolares e o tipo de contato entre o fluido e a biomassa. Desta maneira, o estudo a seguir tem como objetivo estabelecer a melhor técnica de extração de lipídios utilizando a biomassa da espécie *Scenedesmus* sp. fazendo o pré-tratamento da biomassa seca utilizando os métodos de ultrassom e autoclave; comparando dois sistemas de solvente através do método de extração Bligh e Dyer (1959) adaptado e comparando a eficiência da extração pelo método de Soxhlet com a eficiência do método Bligh e Dyer (1959) utilizando o melhor sistema de solvente.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos estudados nesse trabalho foram: o método proposto por Bligh e Dyer (1959), que originalmente emprega a homogeneização da biomassa com os solventes de extração e o método proposto por Ramluckan, Moodley e Bux (2014), que sugere o uso de uma mistura de dois solventes para a extração no soxhlet. O sistema de solventes

escolhidos tem como fundamento os estudos de Bligh e Dyer (1959), que utiliza metanol e clorofórmio e Ramluckan, Moodley e Bux (2014), que dentre os sistemas testados obteve melhores resultados com o clorofórmio e etanol. A homogeneização proposta pelo primeiro método foi otimizada por (Zorn *et al.*, 2017), através do emprego do ultrassom e essa adaptação foi inserida nos experimentos a seguir. A biomassa utilizada foi centrifugada, colocada em vidros relógio e seca em estufa conforme a Figura 2. Em seguida, a biomassa seca foi macerada e armazenada no freezer.



Figura 2 - Biomassa seca da microalga *Scenedesmus* sp. em vidro relógio.

## 2.1 Pré-Tratamento

Para promover a quebra da estrutura da célula, conhecida como lise celular, dois tipos de pré-tratamento foram utilizados: ultrassom - a amostra devidamente hidratada foi colocada no banho à temperatura ambiente com ultrassom durante 30 minutos, baseado na metodologia utilizada por Zorn *et al.* (2017); autoclave - o erlenmeyer contendo a amostra hidratada foi colocado na autoclave sobre pressão de 1 atm e temperatura de 121°C (Ramluckan, Moodley e Bux, 2014) durante um tempo de 15 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata, desta forma, a Tabela 2 demonstra o planejamento de experimentos.

Ensaio nº	Sistema de solvente	Volume total	Pré-tratamento
1	CMA- clorofórmio/metanol/água	20 mL	30 min ultrassom
2			15 min autoclave
3			
4			
5	CEA- clorofórmio/etanol/água		
6			15 min autoclave
7			
8			
9	CEA- clorofórmio/etanol/água	100 mL	
10			

Tabela 2- Planejamento de experimentos.

## 2.2 Processo de Extração

### 2.2.1 *Bligh & Dyer Adaptado.*

Foram acrescentados à amostra hidratada, o clorofórmio e o metanol (ou etanol) nas proporções e volumes totais pré-estabelecidas, com a ressalva de que apenas metade do clorofórmio foi adicionada. Após a primeira adição de solventes agitou-se o sistema manualmente por 2 minutos e em seguida colocou-se sob agitação em banho de ultrassom à temperatura ambiente por 25 minutos. O Erlenmeyer foi retirado do ultrassom e repetiu-se o procedimento I, adicionando somente a outra metade do clorofórmio ao sistema. Retirou-se a mistura do banho e a água destilada foi adicionada conforme a quantidade estipulada pelo experimento. Em seguida, agitou-se manualmente o sistema durante 2 minutos e com papel filtro de diâmetro médio de 12,5 cm realizou-se a filtração do conteúdo do Erlenmeyer. O filtrado foi coletado e transferido para um funil de separação de vidro de 125 mL. No funil o sistema foi colocado em repouso até que houvesse a completa separação de fases (Figura 2).

Após separação, a fase inferior do funil foi removida e pesada em uma balança devidamente tarada. A fase inferior, correspondente ao solvente, foi evaporada em estufa a uma temperatura de 55 - 60°C durante 24 h. O conteúdo restante do recipiente foi dessecado durante 15 minutos em um dessecador a vácuo e resfriado até a temperatura ambiente. Após a etapa do dessecador o conteúdo foi pesado novamente.

### 2.2.2 *Soxhlet*

O procedimento de controle de quantidade e hidratação da amostra para o método

Soxhlet foi o mesmo do método Bligh & Dyer adaptado. Após essa etapa adicionou-se ao balão de 100 mL o sistema de solvente na proporção 2:2:1 previamente estabelecida. A mistura de solventes foi colocado no sistema Soxhlet e o tempo de extração correspondeu a 3h, conforme estudos de Ramluckan, Moodley e Bux (2014). O conteúdo do balão foi resfriado e colocado em repouso até que houvesse a completa separação de fases (Figura 3). Após separação, a fase inferior do funil foi removida e pesada em uma balança devidamente tarada. O conteúdo removido passou por evaporação, dessecamento, resfriamento e pesagem de forma análoga ao método Bligh e Dyer (1959) adaptado.



Figura 3 - Funil de separação contendo o sistema de solventes em duas fases.

### 2.2.3 Cálculo da porcentagem de lipídios

Para calcular a porcentagem de lipídios em 1g de biomassa seca utiliza-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{(m_2 - m_1)}{\text{biomassa pesada (g)}} \times 100$$

Sendo  $m_2$  a massa do frasco contendo os lipídios e  $m_1$  a massa do frasco vazio.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento experimental foi realizado em duplicata e as biomassas utilizadas nos experimentos foram de um mesmo cultivo. Os dados da primeira etapa, correspondente à extração baseada no método Bligh e Dyer (1959) com o uso do ultrassom, estão apresentados na Tabela 3.

n°	Sistema de solvente	Lise celular Pré-tratamento	% de lipídio na microalga	Média (duplicata)
1	CMA* (2:2:1)	Ultrassom (30 min)	10,89	10,78±0,16
2			10,66	
3		Autoclave (15 min)	19,73	
4			20,15	
5	CEA* (2:2:1)	Ultrassom (30 min)	16,73	17,31±0,82
6			17,89	
7		Autoclave (15 min)	18,86	
8			19,69	

CMA\* - Clorofórmio/Metanol/Água CEA\* - Clorofórmio/Etanol/Água

Tabela 3 - Dados experimentais da etapa de extração baseada no método Bligh e Dyer (1959) com uso do ultrassom.

Considerando os dados obtidos por Andrade (2014), acerca da porcentagem total de lipídio da *Scenedesmus* sp. correspondente a uma faixa de 19,6% a 21,1% em peso de biomassa seca, pode-se afirmar que os resultados obtidos estão coerentes com a literatura, destacando os experimentos 3,4,7 e 8 por uma retirada satisfatória e quase total da massa de lipídio contido na microalga utilizada.

Fazendo-se a média e o desvio padrão das amostras 3, 4, 7 e 8, correspondentes às amostras com o pré-tratamento em autoclave, tem-se o valor de 19,61±0,47, o que permite afirmar que os resultados para os dois sistemas de solvente distintos com a autoclave são estatisticamente iguais e o valor obtido pode ser considerado a porcentagem máxima da biomassa usada no presente experimento.

Nota-se que para ambos os sistemas de solvente os melhores resultados deram-se com a lise celular realizada com a autoclave. Esse resultado contraria os resultados obtidos por Lee *et al.* (2010) em que as porcentagens de lipídios obtidas foram de aproximadamente 5%, em biomassa seca, com a autoclave e dentre os dois tipos de pré-tratamento comparados no presente experimento, constata o ultrassom como o melhor para promover o rompimento da célula. A justificativa para essa divergência de resultados encontra-se no tempo de autoclave utilizado, visto que a metodologia por Lee *et al.* (2010) utiliza apenas 5 minutos e nesse experimento adotou-se 15 minutos.

Conforme Lee *et al.* (2010), o efeito do ultrassom no pré-tratamento causa o rompimento da membrana celular devido a um efeito de cavitação, que perturba as células microbianas rompendo-as. No caso da autoclave, a alta pressão promovida por um maior espaço de tempo garante uma desestabilização da membrana citoplasmática da célula, permitindo a liberação de mais lipídios para serem extraídos por solvente. Além disso, esse método coagula proteínas, reduzindo a sua solubilização no sistema de solventes, o que sugere um lipídio extraído mais puro, quando se utiliza uma microfiltração.

O clorofórmio é um solvente que, por apresentar caráter polar-apolar, é capaz de extrair os lipídios apolares, conhecidos como triacilgliceróis associados pelas forças de Wan Der Walls, como também os ácidos graxos que possuem polaridades variadas. Quanto ao etanol e ao metanol, ambos são solventes polares, capazes de extrair os fosfolipídios e glicolipídios através do enfraquecimento das ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas que atuam sobre esses lipídios polares, ambos aliam-se tanto à água quando ao clorofórmio, sendo que o lipídio está predominantemente contido na fase formada por clorofórmio/metanol ou clorofórmio/etanol, garantindo uma maior recuperação dos mesmos (lipídios polares e apolares).

O melhor percentual de lipídio extraído da microalga *Scenedesmus* sp. foi obtido com o sistema composto por CEA. A justificativa para o melhor desempenho da extração utilizando o etanol deve-se à menor polaridade do etanol comparado à polaridade do metanol, fato observado através da menor constante dielétrica do etanol. Os lipídios costumam ser fracamente polares com constantes dielétricas na faixa de 2 a 4, portanto, solventes menos polares rendem maiores taxas de solubilização dos lipídios (Galvão *et al.*, 2013).

A segunda etapa do experimento, correspondente à comparação do método Bligh e Dyer (1959) com o método Soxhlet utilizado por Ramluckan, Moodley e Bux (2014), calculou-se a média geral das porcentagens obtidas para ambos os sistemas de solvente como uma forma de avaliar a eficiência de uma forma geral e aplicar o melhor sistema no método Soxhlet. Os valores estão dispostos na Tabela 4.

n°	Sistema de solvente	% de lipídio na microalga	Porcentagem média geral
1		10,89	
2	CMA (2:2:1)	10,66	15,36±4,58
3		19,73	
4		20,15	
5		16,73	
6	CEA (2:2:1)	17,89	18,29±1,10
7		18,86	

Nota-se que, de uma forma geral a melhor média de resultados foi obtida com o sistema CEA (clorofórmio, etanol e água), o que já era esperado visto que em estudos propostos por Ramluckan, Moodley e Bux (2014), ele realiza extrações com diversos solventes e constata melhores resultados com o etanol.

Tabela 4 - Média geral para ambos os sistemas de solvente.

O etanol teve resultados superiores ao metanol, com a vantagem de remover uma menor quantidade de clorofila, pigmento que também é extraído em pequenas quantidades na extração de lipídios, além de, segundo Galvão *et al.* (2013), ter uma toxicidade menor que o metanol, facilitando, portanto, a sua implementação industrial.

A combinação do clorofórmio e etanol em proporções iguais, assim como utilizado no planejamento experimental anteriormente descrito corresponde à melhor eficiência de remoção (Figura 7).

As melhores condições da primeira etapa do experimento foram reproduzidas utilizando o método Soxhlet e os resultados obtidos estão disposta na Tabela 4.

n°	Sistema de solvente	Pré- tratamento	% de lipídio na microalga	Média
9	CEA	Autoclave (15 min)	15,04	15,71±0,67
10			16,38	

Tabela 5 - Dados da extração de lipídios pelo método soxhlet.

Com isso pode-se concluir o método Soxhlet não teve melhor eficiência na remoção do lipídio da microalga com o tempo ótimo de operação definido por Ramluckan, Moodley e Bux (2014), correspondente a 3 horas. Um melhor resultado pode ser obtido com um maior tempo de refluxo do sistema soxhlet, porém não é interessante para a indústria um longo tempo de operação, pois embora a extração a quente seja vantajosa, pode causar a oxidação lipídica e resultar num alto custo com energia térmica.

## 4 | CONCLUSÃO

Os experimentos mostraram que, para ambos os sistemas de solvente utilizados, o pré- tratamento com autoclave aumentou o rendimento da extração, sendo esse aumento mais significativo para o sistema CMA, com um resultado superior em 8% frente a 2% a mais no sistema CEA, que já apresentava resultados próximos do percentual ótimo com o pré- tratamento em ultrassom.

Os dados obtidos permitem constatar que o melhor método de extração quanto ao rendimento, tempo de operação e custo com energia térmica foi o método Bligh & Dyer adaptado com o uso de ultrassom. Tendo como desvantagem apenas a toxicidade dos

solventes envolvidos.

Conclui-se por meio dos dados experimentais e em conformidade com estudos propostos por Ramluckan, Moodley e Bux (2014), que o uso do etanol para substituir o metanol é vantajoso, visto que para o sistema CEA removeu-se em média  $18,29 \pm 1,10\%$  e o sistema CMA  $15,36 \pm 4,58\%$ . A justificativa para o maior rendimento lipídico com o uso do etanol deve-se à menor polaridade desse composto que se solubiliza mais facilmente em lipídios. Além disso, o etanol é uma substância de baixa toxicidade, reduzindo os riscos e gastos com segurança operacional no caso de aplicações industriais.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA LOPES, T. S.; SILVA, A. L. A.; SILVA, A. F.; DANTAS, G. D.; FERREIRA, W. B. Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella* sp. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 33, 2015.
- ANDRADE, D.; COLOZZI-FILHO, A.; GUEDES, C.; LIMA, F.; MACHINESKI, G.; MATOS, M. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. **Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo**, IAPAR, Londrina, p. 265-343, 2014.
- ANDRADE, L. M. D. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas**. 2014. Universidade de São Paulo
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BRANCO-VIEIRA, M.; MATA, T.; MARTINS, A.; FREITAS, M.; CAETANO, N. Economic analysis of microalgae biodiesel production in a small-scale facility. **Energy Reports**, v. 6, p. 325-332, 2020.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. D. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- DANESHVAR, E.; OK, Y. S.; TAVAKOLI, S.; SARKAR, B.; SHAHEEN, S. M.; HONG, H.; LUO, Y.; RINKLEBE, J.; SONG, H.; BHATNAGAR, A. Insights into upstream processing of microalgae: A review. **Bioresource Technology**, p. 124870, 2021.
- DE MEDEIROS JERONIMO, C. E.; SILVA, R. M. D.; BACHOLSKY, R. G. PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR ALGAS: INTEGRAÇÃO COM PROCESSOS DE CARCINICULTURA. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 713-724, 2015.
- DOLGANYUK, V.; BELOVA, D.; BABICH, O.; PROSEKOV, A.; IVANOVA, S.; KATSEROV, D.; PATYUKOV, N.; SUKHIKH, S. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1153, 2020.



FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. D.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A. D.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, p. 437-448, 2013.

GALVÃO, A. C.; COPETTI, M.; DAL MAGRO, C.; ILTCHENCO, S.; ROBAZZA, W. S. Extração do óleo da polpa do abacate com Metanol e Etanol a diferentes temperaturas. **Ciência e Natura**, v. 35, n. 2, p. 304-310, 2013.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 692-709, 2017.

LEE, J.-Y.; YOO, C.; JUN, S.-Y.; AHN, C.-Y.; OH, H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. S75-S77, 2010.

PATEL, A.; MATSAKAS, L.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. **Bioresource technology**, v. 278, p. 424-434, 2019.

PEREIRA, C. M.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F.; JACOB-LOPES, E.; COLEPICOLO NETO, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, p. 2013-2018, 2012.

PHONG, W. N.; SHOW, P. L.; LE, C. F.; TAO, Y.; CHANG, J.-S.; LING, T. C. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 83-90, 2018.

RAMIREZ, N. N. V. Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça. 2013.

RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v. 116, p. 103-108, 2014.

RODRÍGUEZ-TORRES, M. J.; MORILLAS-ESPAÑA, A.; GUZMÁN, J. L.; ACIÉN, F. G. Modelling and pH Control in Raceway and Thin-Layer Photobioreactors for Wastewater Treatment. **Energies**, v. 14, n. 4, p. 1099, 2021.

SILVA CARDOSO, A.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542, 2011.

SOUSA, M. P. D. Organismos planctônicos de sistemas de lagoas de tratamento de esgotos sanitários como alimento natural na criação de tilápia do Nilo. 2007.

ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G. A.; AMARAL, M. S.; LOURES, C. C. A.; SILVA, M. B. Avaliação Dos Fatores Envolvidos Na Extração De Lipídios Da Biomassa Da Microalga *Chlorella minutissima* Via Solventes. **Holos**, v. 2, p. 66-78, 2017.

## EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON *Fusarium verticillioides* GROWTH AND FUMONISIN B<sub>1</sub> DETOXIFICATION

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 06/10/2021

**Elisabete Yurie Sataque Ono**

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/9080149399359784>

**Melissa Tiemi Hirozawa**

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/9371346593025432>

**Mario Augusto Ono**

State University of Londrina, Department of  
Pathological Sciences

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/2409390685316192>

**Sandra Garcia**

State University of Londrina, Department of  
Food Science and Technology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/6040080684084312>

**Jaqueline Gozzi Bordini**

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/5793406523469122>

**Andressa Jacqueline de Oliveira**

State University of Londrina, Department of  
Biochemistry and Biotechnology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/5816751074597566>

**Elisa Yoko Hirooka**

State University of Londrina, Department of  
Food Science and Technology

Londrina – Paraná

<http://lattes.cnpq.br/8703225783188622>

**ABSTRACT:** *Fusarium verticillioides* is a primary corn pathogen with global importance because it causes economic losses and risks to human and animal health due to fumonisin production. This study aimed to evaluate the effect of lactic acid bacteria (LAB) strains on *F. verticillioides* growth and fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) detoxification. The antifungal activity of seven LAB strains was evaluated against five *F. verticillioides* strains. *Lactobacillus plantarum* BG112 and *Lactobacillus reuteri* LR-92 showed the highest antifungal activity against *F. verticillioides* 97L strain. *L. reuteri* LR-92 cells caused morphological alterations such as pore formation. Moreover, cell-free supernatant (CFS) from both LAB was effective in reducing conidial germination and mycelial growth in addition to inducing morphological changes in conidia. The supernatant possibly had a fungicidal effect since there was no mycelial development. Furthermore, all strains showed FB<sub>1</sub> removal ability, and the greatest reductions were shown by nonviable cells of *L. reuteri* LR-92 (88.0%) and viable cells of *L. fermentum* ATCC 9339 (78.0%). LAB strains showed antifungal activity and *in vitro* FB<sub>1</sub> detoxification ability. These bacteria are promising for developing new biological control formulations to minimize fumonisin contamination, thus contributing to improved food safety.

**KEYWORDS:** Antifungal activity; *Lactobacillus reuteri*; *Lactobacillus plantarum*; Mycotoxin adsorption.

## EFEITO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NO CRESCIMENTO DE *Fusarium verticillioides* E NA DETOXIFICAÇÃO DE FUMONINA B<sub>1</sub>

**RESUMO:** *Fusarium verticillioides* é um patógeno primário de milho de importância mundial, pois causa prejuízos econômicos e riscos à saúde de seres humanos e animais devido à produção de fumonisinas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de cepas de bactérias lácticas (BAL) no crescimento de *F. verticillioides* e na detoxificação da fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>). A atividade antifúngica de sete cepas de BAL foi avaliada contra cinco cepas de *F. verticillioides*. *Lactobacillus plantarum* BG112 e *Lactobacillus reuteri* LR-92 apresentaram a maior atividade antifúngica contra a cepa *F. verticillioides* 97L. A cepa *L. reuteri* LR-92 causou alterações morfológicas, como a formação de poros. Além disso, o sobrenadante livre de células (SLC) de ambas as BAL foi eficaz na redução da germinação de conídios e do crescimento micelial, além de induzir alterações morfológicas nos conídios. O SLC possivelmente teve efeito fungicida, uma vez que não houve desenvolvimento micelial. Além disso, todas as cepas apresentaram capacidade de remoção de FB<sub>1</sub>, sendo que a maior redução da concentração de FB<sub>1</sub> foi apresentada por células não viáveis de *L. reuteri* LR-92 (88,0%) e células viáveis de *L. fermentum* ATCC 9339 (78,0%). As cepas de BAL apresentaram atividade antifúngica e capacidade de detoxificação de FB<sub>1</sub> *in vitro*. Essas bactérias são promissoras para o desenvolvimento de novas formulações de controle biológico para minimizar a contaminação por fumonisinas, contribuindo para a melhoria da segurança de alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade antifúngica; *Lactobacillus reuteri*; *Lactobacillus plantarum*; adsorção de micotoxinas.

## 1 | INTRODUCTION

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most produced cereal grains worldwide. In 2018/2019, the total worldwide production was 1 billion tons (USDA, 2019), and Brazil is the third largest producer, with 102 million tons for the 2019/2020 harvest season (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2020). Corn is the staple food in several countries and is the main ingredient of animal feed (GARCÍA-LARA; SERNA-SALDIVAR, 2019). However, the nutritional characteristics of this cereal grain make it susceptible to contamination by *Fusarium verticillioides*, which is considered the main corn phytopathogen (ARIAS *et al.*, 2016; COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). Corn infection by this filamentous fungus results in great economic losses due to decreased production in the field and grain contamination by mycotoxins such as fumonisins (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Ingestion of fumonisin-contaminated grains is related to the increased incidence of esophageal (KHAN; PHULUKDAREE; CHUTURGOON, 2018) and liver cancer (ARUMUGAM *et al.*, 2019) and neural tube defects in humans (MARASAS *et al.*, 2004). In animals,

fumonisin are associated with several mycotoxicoses, such as leukoencephalomalacia in equines (VENDRUSCOLO *et al.*, 2016), pulmonary edema in pigs (PÓSA *et al.*, 2016) and decreased body weight gain, alterations in immune function and liver pathology in poultry (TESSARI *et al.*, 2006). Among the fumonisins, fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) is the most prevalent and most toxic analog (COPPOCK; DZIWENKA, 2014). FB<sub>1</sub> has been classified in group 2B, meaning that it is possibly carcinogenic to humans (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

Conventional fungicides have been widely used to control *F. verticillioides* contamination in corn; however, consumer concern about this practice is increasing because of the negative effects on the environment (RATHORE; NOLLET, 2012) and human health (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). Biological control methods are an attractive alternative to chemical agents, as they do not cause adverse effects on soil and are not harmful to human health.

Lactic acid bacteria (LAB) are promising biocontrol agents due to their antifungal activity against some fungal species (KHARAZIAN *et al.*, 2017; SIEDLER *et al.*, 2019) and their ability to detoxify mycotoxins (JUODEIKIENE *et al.*, 2018; CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2019).

The antifungal mechanism of LAB has been associated with the production of several bioactive metabolites, including organic acids (acetic, lactic, propionic, succinic, formic and butyric acid), phenyllactic acid, fatty acids, and peptides (cyclic dipeptides and bacteriocins) (BLACK *et al.*, 2013; KWAK; LIU; KANG, 2018; LUZ *et al.*, 2017; SIEDLER *et al.*, 2019).

Another important feature of LAB is the ability to reduce mycotoxin levels. Some studies have shown that the probable mechanism of *in vitro* FB<sub>1</sub> detoxification is mycotoxin binding to the bacterial cell wall (NIDERKORN *et al.*, 2009; PIZZOLITTO; SALVANO; DALCERO, 2012). Other studies have shown that some microorganisms can produce enzymes that degrade mycotoxins to less toxic intermediate compounds (HEINL *et al.*, 2010; TUPPIA *et al.*, 2016).

Considering the potential of LAB for mycotoxin detoxification and the few published studies relating LAB to antifungal activity against *F. verticillioides* and FB<sub>1</sub> detoxification, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of LAB on *F. verticillioides* growth and FB<sub>1</sub> detoxification.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Microorganisms and culture conditions

Seven LAB strains were used for the antifungal activity screening and FB<sub>1</sub> removal experiments: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *L. plantarum* ATCC 94917, and *L. fermentum* ATCC 9339 (American Type Culture Collection); *L. paracasei* and *L. gasseri*, belonging to the Culture Collection of the Department of Food Science and Technology—

State University of Londrina; and *L. reuteri* Lyofast LR-92 (Sacco) and *L. plantarum* Lyofast BG112 (Sacco) (commercial cultures). The LAB strains were cultured in the De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) broth at 37 °C for 24 h and subcultured at least three times. The strains were maintained as frozen stock cultures at –20 °C in MRS supplemented with 25% (v/v) glycerol.

*F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G) were provided by the Mycological Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, State University of Londrina. The fungal strains were grown on PDA (potato dextrose agar) at 25 °C for 7 days and stored at 4 °C.

All of the *F. verticillioides* strains produced fumonisins (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>), as follows: 97K (4051 µg g<sup>-1</sup>), 97L (3230 µg g<sup>-1</sup>), 103F (5120 µg g<sup>-1</sup>), 113F (724 µg g<sup>-1</sup>) and 103G (225 µg g<sup>-1</sup>).

## 2.2 Screening of antifungal activity

Antifungal activity was evaluated by an agar diffusion assay according to Motomura *et al.* (1996). Sterile Petri dishes were inoculated with a suspension of *F. verticillioides* strains (10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) and 20 mL of PDA.

After agar solidification, an aliquot (100 µL) of MRS broth with LAB cell concentrations adjusted to 3.0 x 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup> was inoculated in 5-mm-diameter holes in the center of the plate (AMMOR *et al.*, 2006). Then, plates were incubated at 25 °C for 7 days, and the inhibition zone was measured. The inhibition zone was defined as the diameter of the circle without fungal growth surrounding the hole. All tests were performed in triplicate.

## 2.3 Effect of pH, acetic acid and lactic acid concentration on antifungal activity

The agar diffusion assay was performed according to De Muyneck *et al.* (2004) with some modifications. Antifungal activity was evaluated using sterile MRS broth with different concentrations of acetic acid and lactic acid (10%, 20%, 30%, 40% and 50% (w/v)). In addition, MRS broth with the pH adjusted to 1, 2, 3, 4, 5 and 6 using hydrochloric acid (5 mmol L<sup>-1</sup>) was evaluated. An aliquot (100 mL) of MRS broth was added to 5-mm holes in the center of the PDA agar previously inoculated with 10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup> *F. verticillioides*. All assays were performed in triplicate.

## 2.4 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid and acetic acid for fungal growth

The minimum inhibitory concentrations of lactic and acetic acid were determined for the five *F. verticillioides* strains according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline (CLSI, 2010) with some modifications. The MIC was defined as the lowest acid concentration that causes a specified reduction in visible fungal growth. Lactic and acetic acid were used at 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0% (w/v) and 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 and 0.9% (w/v), respectively. An aliquot (100 mL) of MRS broth was added to the holes (5 mm) in the center of the PDA previously inoculated with 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> *F.*

*verticillioides*. All assays were performed in triplicate.

## 2.5 Effect of cell-free supernatant on *F. verticillioides* mycelial growth and morphology

The two species (*L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92) that showed the best results in the screening of antifungal activity, were selected to investigate the mechanisms involved in the antifungal effect of the *F. verticillioides* 97L strain. LAB strains were cultured in MRS broth at 37 °C for 24 h. The bacterial culture was centrifuged at 6500 **g** for 10 min, and the cell-free supernatant (CFS) was filter sterilized (0.22-mm pore size membranes; Millipore). The experiment was performed in PD broth previously inoculated with *F. verticillioides* 97L conidial suspensions ( $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>) mixed with the cell-free supernatants in a 1:1 ratio and incubated at 25 °C and 180 rpm for 24 h for microscopic analysis of conidial germination percentage and for seven days for biomass estimation and assessment of mycelial morphology alteration. In addition, a coinoculation assay was performed with *F. verticillioides* 97L and *L. plantarum* BG112 or *L. reuteri* LR-92 cultures ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) to evaluate morphological changes. A control without cell-free supernatant was performed using saline solution (0.85% NaCl). The experiments were performed in triplicate.

## 2.6 Conidial germination inhibition assay

Conidial germination was determined by counting at least 100 conidia per replicate (germinated and nongerminated) using a light microscope at 400X (CHEN *et al.*, 1999). A conidium was considered germinated when the germ tube was longer than the conidial diameter (DE CAL; MELGAREJO, 1999). The results were expressed as the percentage of conidial germination inhibition, calculated according to the following formula:

$$\% \text{ conidial germination inhibition} = \frac{(cc - ct)}{cc} \times 100$$

Where:

cc: number of germinated conidia in the control sample

ct: number of germinated conidia in the treatment sample

## 2.7 Biomass estimation

Estimation of fungal biomass was performed by the gravimetric method. The culture from the assay described in section 2.5 was filtered through a preweighed No. 1 Whatman filter and dried in an oven at 70 °C to a constant weight. The weight of the treatment sample was compared with that of the control sample, and the percentage of mycelial growth inhibition was calculated as follows:

$$\% \text{ mycelial growth inhibition} = \frac{(\text{control weight} - \text{treatment weight})}{\text{control weight}} \times 100$$

## 2.8 Scanning electron microscopy assay (SEM)

*F. verticillioides* coinoculated with *L. plantarum* BG112 or *L. reuteri* LR-92 cells and *F. verticillioides* conidia treated with CFS (as described in section 2.5) were fixed with 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 90 min. After the fixation period, they were treated with 2% osmium tetroxide in 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer, subjected to dehydration in a graded ethanol series (20, 30, 50, 70, 80, 90% and 100%) and additionally dehydrated at the critical point, mounted on a metallic support and metallized with gold film. Following processing, samples were analyzed in a scanning electron microscope, model FEI Quanta 200.

## 2.9 Fumonisin B<sub>1</sub> detoxification assay

FB<sub>1</sub> detoxification assay was performed according to Hernandez-Mendoza *et al.* (2009), Niderkorn, Boudra, Morgavi (2006), and Pizzolitto, Salvano and Dalcero (2012). We propose that the mechanism involved in the removal of FB<sub>1</sub> is a physical adsorption (physisorption), with some modifications. The final concentration of LAB cells was standardized at 3.0 x 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup> after centrifugation (5000 g, 10 min, 4 °C), followed by washes with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and ultrapure water. In order to evaluate the effect of cell viability on detoxification, heat-inactivated LAB cells (121 °C for 15 min) were also used. The preparation procedure was the same as that for viable cells (without heat treatment). The resulting pellet was suspended in FB<sub>1</sub> standard (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) diluted in PBS (pH 7.2) to a final concentration of 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. The experiment was carried out in 50-mL Falcon tubes at 37 ± 1 °C. Positive controls were prepared in 50-mL Falcon tubes containing 2 mL of FB<sub>1</sub> solution (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) and processed in the same way as the samples. After incubation, FB<sub>1</sub> determination in the supernatant was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The percentage of FB<sub>1</sub> removed was calculated according to the following formula:

$$\text{FB}_1 \text{ removed (\%)} = 100 \times 1 - \frac{(\text{Peak area of FB}_1 \text{ in the supernatant})}{(\text{Peak area of positive control})}$$

## 2.10 Quantification of fumonisin B<sub>1</sub> by HPLC

An aliquot of 1 mL of test supernatant was mixed with 1 mL of methanol: water (3: 1, v/v), and 1 mL of the mixture was cleaned up using an anion exchange cartridge (Sep-Pak Accell Plus QMA, Waters).

Fumonisin B<sub>1</sub> was quantified according to Shephard *et al.* (1990) as modified by Ueno *et al.* (1993). A 200 mL aliquot was dissolved in acetonitrile: water (1: 1, v/v) and

derivatized with o-phthaldialdehyde (OPA; 40 mg of OPA in 1 mL of methanol, 5 mL of 0.1 mmol L<sup>-1</sup> sodium tetraborate and 50 mL of 2-mercaptoethanol).

Analysis was performed with a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector) using a Nucleosil 100-5 C18 column (4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). The excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The mobile phase consisted of CH<sub>3</sub>OH: 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80: 20, v/v) with the pH adjusted to 3.3 (with orthophosphoric acid). The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> at 25 °C. The detection limit for FB<sub>1</sub> was 27.5 ng mL<sup>-1</sup>.

The average recovery rate of FB<sub>1</sub> from the positive control sample with 2.5 mg mL<sup>-1</sup> was 88.3%.

## 2.11 Statistical Analysis

Differences in the mean FB<sub>1</sub> removal (%) among different LAB strains and viable and nonviable (heat-inactivated) cells were evaluated statistically using the Student's t test for two groups and ANOVA followed by the Tukey's test (p<0.05) for multiple comparisons. Statistical analysis was performed by Statistica software, version 7 (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2007).

## 3 | RESULTS

### 3.1 Evaluation of antifungal activity

The antifungal activity was based on the inhibition zone diameter and was classified according to Rouse et al. (2008) as follows: (-) no inhibition, very weak inhibition (diameters from 1 to 15 mm), moderate inhibition (diameters from 16 to 30 mm), medium inhibition (diameters from 31 to 45 mm) and strong inhibition (diameters greater than 45 mm) (Table 1).

Microorganism	<i>Fusarium verticillioides</i> strains				
	97L	97K	103F	113F	103G
	Inhibition zone diameter (mm)*				
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	6.0	5.0	5.7	6.0	-
<i>L. plantarum</i> ATCC 94917	5.0	5.7	5.3	6.0	-
<i>L. fermentum</i> ATCC 9339	3.8	4.0	3.3	4.0	-
<i>L. paracasei</i>	10.7	6.3	7.3	7.0	-
<i>L. gasserii</i>	11.3	5.7	5.7	5.3	-
<i>L. reuteri</i> LR-92	30.0	-	-	-	4.0
<i>L. plantarum</i> BG112	23.7	-	-	7.7	6.3

\* Inhibition zone diameter correspond to the means of triplicate analysis

(-) no inhibition, very weak inhibition (diameters from 1 to 15 mm), moderate inhibition (diameters from 16 to 30 mm), medium inhibition (diameters from 31 to 45 mm) and strong inhibition (diameters greater than 45 mm)

Table 1. Antifungal activity of lactic acid bacteria against five *F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G).



The LAB strains showed different degrees of inhibition against the five *F. verticillioides* strains. *L. reuteri* LR-92 and *L. plantarum* BG112 showed the highest antifungal activity against *F. verticillioides* 97L, with inhibition diameters of 30.0 mm and 23.7 mm, respectively (moderate inhibition).

### 3.2 Effect of pH, acetic acid and lactic acid concentration on antifungal activity

The antifungal activity of LAB against *F. verticillioides* strains was characterized by evaluating the effect of pH, different concentrations of lactic and acetic acid (Table 2) on mycelial growth. Medium at pH 1 inhibited the growth of the 97L, 103F, 113F and 103G strains.

The five *F. verticillioides* strains were susceptible to different concentrations of acetic acid and lactic acid.

Parameters	<i>Fusarium verticillioides</i> strains					
	97L	97K	103F	113F	103G	
	Inhibition zone diameter (mm) *					
Acetic Acid Concentration (%)	10	26	18	15	20	15
	20	39	23	38	24	25
	30	55	26	28	31	34
	40	55	38	40	41	37
	50	55	47	49	43	37
Lactic Acid Concentration (%)	10	10	5	7	4	5
	20	13	6	5	7	5
	30	15	9	5	8	8
	40	17	9	10	10	12
	50	17	11	13	12	13
pH of culture medium	1	6	0	3	2	2
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0

\* Inhibition zone diameter correspond to the means of triplicate analysis

Table 2. Effect of different concentrations of acetic acid, lactic acid and pH on antifungal activity.

### 3.3 Minimal inhibitory concentrations (MIC) of acetic acid and lactic acid for *F. verticillioides* strains

The MIC values of these acids against *F. verticillioides* (Table 3) indicate that the 97L strain was the most susceptible.

Strains	MIC % (m/v)	
	Lactic acid	Acetic acid
97L	0.4	0.2
97K	1.0	0.4
103F	2.0	1.0
113F	2.0	0.5
103G	2.0	0.4

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of lactic and acetic acid against *F. verticillioides* strains (97L, 97K, 103F, 113F and 103G).

### 3.4 Effect of cell-free supernatant on *F. verticillioides* mycelial growth and morphology

The antifungal effect of cell-free supernatants (CFSs) from *L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 against *F. verticillioides* 97L (Table 4) was evaluated by conidial germination and mycelial growth assays and conidial morphology alteration. The CFSs from the LAB showed a fungicidal effect against *F. verticillioides* 97L, as evidenced by the inhibition of conidial germination and mycelial growth. In addition, the mycelial morphology of *F. verticillioides* 97L after treatment with CFS was investigated by SEM (Fig. 1). SEM micrographs of the control (without treatment) demonstrated normal hyphae (Fig. 1A) with homogeneous, intact structures with long monophialides and showed extracellular material resembling a biofilm around the hyphae. However, fungus treated with CFS from *L. plantarum* BG112 (Fig. 1C) and *L. reuteri* LR-92 (Fig. 1D) for seven days showed structural modifications of fungal conidia, and fungal mycelia were not visible. The CFS caused irreversible damage to conidia, resulting in cell mortality and inhibition of hyphal growth. Conidia showed deformation with wrinkled surfaces and were collapsed, most likely because of the lack of cytoplasm (Fig. 1C and D). In contrast, morphological alterations, including distorted and wrinkled hyphae with pores on the surface, were observed only in cells treated with *L. reuteri* LR-92 (Fig. 1B).

<i>F. verticillioides</i> (conidia/mL)	Percentage of conidial germination inhibition (%)			Percentage of mycelial growth inhibition (%)		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
Treatment						
CFS <i>L. plantarum</i> BG112	96%	98%	98%	100%	100%	100%
CFS <i>L. reuteri</i> LR-92	97%	99%	97%	100%	100%	100%

Table 4. Effect of cell-free supernatant of *L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 on the conidial germination and mycelial growth of *F. verticillioides* 97L.

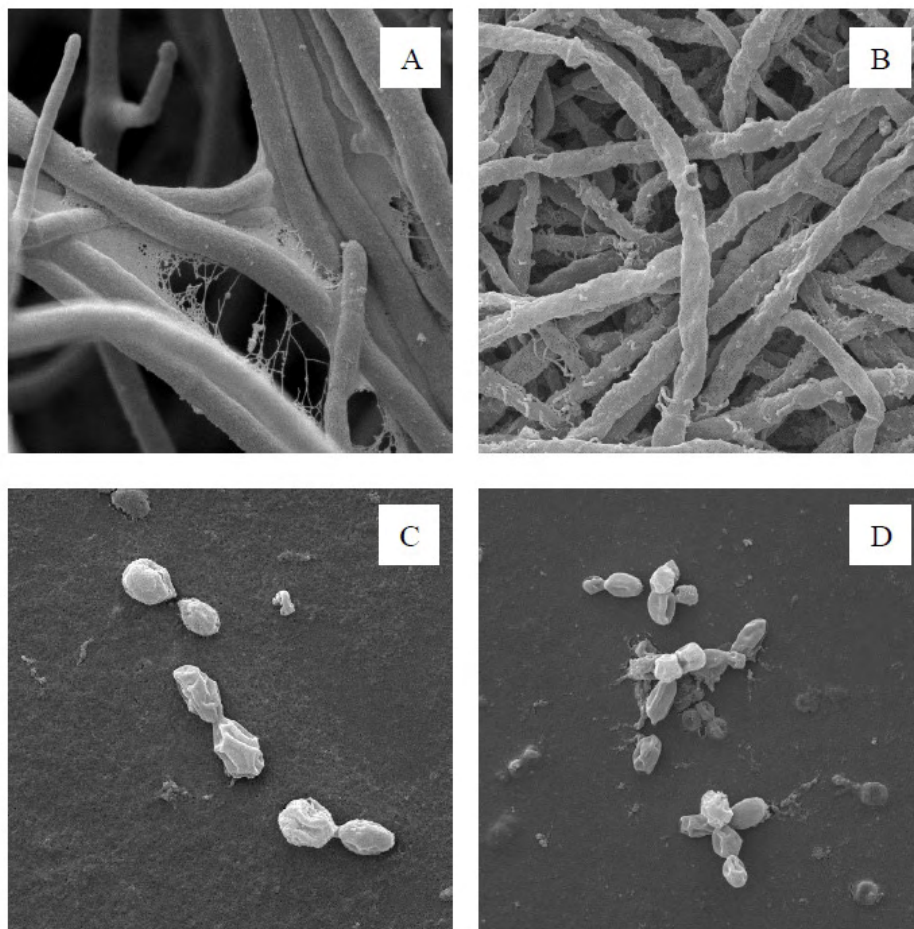


Fig. 1. Scanning electron micrographs of *F. verticillioides* 97L after seven days of culture at 25°C. Untreated (fungal control), 8000x (A); mycelia treated with (10<sup>8</sup> CFU/mL) *L. reuteri* LR-92 cells (B); conidia treated with cell-free supernatant (CFS) from *L. plantarum* BG112, 8000X (C); and conidia treated with CFS from *L. reuteri* LR-92, 8000x (D).

### 3.5 Effect of LAB strains on fumonisin B<sub>1</sub> detoxification

The ability of LAB strains to remove FB<sub>1</sub> from PBS solution is shown in Table 5. The percentage of FB<sub>1</sub> removed by the viable cells ranged from 30.1% (*L. gasseri*) to 78.0% (*L. fermentum* ATCC 9339). *L. fermentum* ATCC 9339 showed the highest FB<sub>1</sub> removal ability (78.0%), but there was no significant difference ( $p>0.05$ ) from that of *L. reuteri* LR-92 (71.9%). Heat-inactivated (nonviable) cells showed FB<sub>1</sub> removal percentages ranging from 49.5% (*L. plantarum* BG112, *L. plantarum* ATCC 94917) to 88.0% (*L. reuteri* LR-92). *L. reuteri* LR-92 (88.0%), *L. paracasei* (80.7%), *L. fermentum* ATCC 9339 (80.7%) and *L. gasseri* (72.9%) strains showed the highest FB<sub>1</sub> removal ability, differing significantly ( $p<0.05$ ) from that of other LAB strains.

Microorganism	% FB <sub>1</sub> removal*	
	Viable cells†	Nonviable cells by heat treatment†
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	35.6 ± 5.8 <sup>deB</sup>	50.9 ± 1.6 <sup>bB</sup>
<i>L. plantarum</i> ATCC 94917	46.2 ± 5.8 <sup>cdB</sup>	49.5 ± 4.9 <sup>bB</sup>
<i>L. fermentum</i> ATCC 9339	78.0 ± 1.9 <sup>aA</sup>	80.7 ± 0.8 <sup>aA</sup>
<i>L. paracasei</i>	57.2 ± 0.9 <sup>bcB</sup>	80.7 ± 1.9 <sup>aA</sup>
<i>L. gasseri</i>	30.1 ± 4.2 <sup>eB</sup>	72.9 ± 4.7 <sup>aA</sup>
<i>L. reuteri</i> LR-92	71.9 ± 3.1 <sup>abB</sup>	88.0 ± 0.1 <sup>aA</sup>
<i>L. plantarum</i> BG112	41.7 ± 5.2 <sup>deB</sup>	49.5 ± 3.4 <sup>bB</sup>

\*Results correspond to the means and SD (standard deviation) from triplicate analysis

†Means followed by the different lowercase letters (a-e) in the same column or by the different uppercase letters (A-B) in the same line differ significantly ( $p<0.05$ ) by the Tukey test and the t-Test, respectively.

Table 5. Fumonisin B<sub>1</sub> removal (%) by viable and nonviable cells of LAB strains at 2.5 mg mL<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub> concentration.

In the comparison of FB<sub>1</sub> removal ability (%) by the same strain, heat-inactivated cells of the *L. reuteri* LR-92, *L. paracasei*, and *L. gasseri* strains showed the highest removal ability ( $p<0.05$ ). The other strains showed no significant difference ( $p>0.05$ ) in the mean FB<sub>1</sub> removal (%) between the viable and heat-inactivated cells.

## 4 | DISCUSSION

Interest in biological control as an alternative method to conventional fungicides has been growing in recent years. LAB are considered promising biological control agents

because they are generally regarded as safe (GRAS) and several studies on natural fungal antagonists of lactic acid bacteria (LAB) have been reported (JUODEIKIENE *et al.*, 2018; TAROUB *et al.*, 2019). In the present study the antifungal activity of LAB strains was evaluated against *F. verticillioides* strains. Among seven LAB strains, *L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 showed the highest antifungal activity (Table 1). These results are in line with those of Laitila *et al.* (2002), Lavermicocca *et al.* (2000), Oliveira *et al.* (2015) and Schmidt *et al.* (2018), who demonstrated the inhibitory activity of these LAB strains against some *Fusarium* species. Laitila *et al.* (2002) demonstrated the efficiency of *L. plantarum* E76 against *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* and *F. graminearum*. Lavermicocca *et al.* (2000) evaluated the antifungal activity of *L. plantarum* 21B and reported inhibition against *Penicillium expansum* IDM/FS2, *Aspergillus flavus* FTDC3226, and *Fusarium graminearum* IDM623. Oliveira *et al.* (2015) and Schmidt *et al.* (2018) showed the strong inhibitory capacity of *L. reuteri* R29 against *F. culmorum*.

Antifungal activity of LAB (Tables 2 and 3) is probably associated with the production of lactic acid and acetic acid. These results are in accordance with those of Plocková *et al.* (2001), who reported that the antifungal activity of *L. reuteri* CCM3625 was associated with the production of a mixture of lactic acid (0.9% w/w), acetic acid (0.2% w/w) and succinic acid (0.2% w/w). In the same study, Plocková *et al.* (2001) evaluated the ability of *L. rhamnosus* VT1 and *L. reuteri* CCM3625 to control mold growth (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.). The most sensitive was *Fusarium* sp., whose growth was completely inhibited by both bacteria. Moreover, *L. reuteri* LR-92, which was used in this study, has been previously characterized as a lactic acid-, acetic acid-, succinic acid- and reuterin-producing strain (MAURO; GARCIA, 2019).

CFSs from *L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 inhibited growth (Table 4) and caused morphological alteration of *F. verticillioides* 97L conidia (Fig. 1C and 1D), indicating that antifungal activity is related to the production of bioactive compounds. Deepthi *et al.*, (2016) also reported conidial and mycelial growth inhibition and alterations in the conidial morphology of *Fusarium proliferatum* after treatment with CFS from *Lactobacillus plantarum* MYS6. Similarly, CFS from *L. plantarum* MYS44 suppressed conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus parasiticus*, in addition to inducing morphological changes and disruptions in the hyphal wall (POORNACHANDRA RAO *et al.*, 2019). Growth inhibition and hyphal deformation of *Penicillium chrysogenum* was also observed in an experiment with *Lactobacillus casei* AST18 (Li *et al.*, 2014). The results presented in this study (Fig. 1) demonstrate that the antifungal compounds produced by the selected lactic acid bacteria can alter *F. verticillioides* conidial and hyphal morphology. Conidial germination is a critical phase in phytopathogen development; therefore, the action of antifungal compounds at this stage can reduce fungal pathogenicity, because conidia are essential for asexual reproduction and fungal development (BORAH *et al.*, 2016). Previous studies have shown that lactic acid bacteria can produce several antifungal compounds, including organic

acids such as lactic acid, acetic acid, phenyllactic acid and propionic acid (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013; LE LAY *et al.*, 2016), peptides (GUPTA; SRIVASTAVA, 2014), reuterin (SCHMIDT *et al.*, 2018), fatty acids and hydroxy fatty acids (BLACK *et al.*, 2013). The antifungal activity of LAB is a complex phenomenon because these bacteria are capable of producing different antifungal compounds that often act in synergy (LAITILA *et al.*, 2004).

Several researchers have reported the ability of LAB to detoxify mycotoxins, including fumonisins (TUPPIA *et al.*, 2016), aflatoxins (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2019), deoxynivalenol (DON) (FRANCO *et al.*, 2011), ochratoxin A (LUZ *et al.*, 2018), and patulin (HATAB; YUE; MOHAMAD, 2012).

The FB<sub>1</sub> removal percentages (Table 5) were higher than those reported by Pizzolitto, Salvano and Dalcero (2012), probably because these authors used lower cell concentrations ( $6.5 \times 10^8$  cell mL<sup>-1</sup>) and different LAB species. Pizzolitto, Salvano and Dalcero (2012) evaluated the ability of *Lactobacillus acidophilus* 24 to remove FB<sub>1</sub> from PBS solution.

Niderkorn, Boudra, Morgavi (2006) evaluated the removal of DON and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from MRS broth (pH 4.0) by twenty-nine LAB and propionic acid bacteria (PAB). Mycotoxin removal differed among the strains, and the highest values were obtained for DON (55%), FB<sub>1</sub> (82%) and FB<sub>2</sub> (100%). Binding was the probable mode of action because no toxin derivatives were detected, and the removal ability was not impaired in nonviable bacteria.

Niderkorn *et al.* (2009) investigated the cell wall components of lactic acid bacteria (LAB) and the functional groups of fumonisin (FB) involved in the LAB-FB interaction. The authors suggested that the peptidoglycan (PG) and tricarboxylic acid in LAB and FB, respectively, were the main components involved in the interaction. Other similar studies also indicated mycotoxin binding to the bacterial cell wall as the main mechanism involved, and the highest removal percentage was obtained using nonviable cells (HASKARD *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2011).

Heating of viable cells can cause protein denaturation or the formation of Maillard reaction products. Furthermore, heat treatment may decrease the peptidoglycan thickness and/or increase pore sizes. These changes would be responsible for mycotoxin binding to structures that were not available in the intact cell, therefore improving the detoxification process (EL-NEZAMI *et al.*, 2002; NIDERKORN, BOUDRA, MORGAVI, 2006).

The variability in the detoxification ability can be explained by differences in the molecular structure of peptidoglycans, which vary among bacterial species (NIDERKORN *et al.*, 2009). In this study, the FB<sub>1</sub> removal percentages (Table 5) were statistically different ( $p < 0.05$ ) among bacterial species, but strains of the same species (*L. plantarum*) showed similar results ( $p > 0.05$ ). Binding of mycotoxin by the bacterial cell wall is a possible mechanism involved in FB<sub>1</sub> removal.

## 51 CONCLUSION

*L. plantarum* BG112 and *L. reuteri* LR-92 strains showed antifungal activity against toxigenic *F. verticillioides*. CFS from both bacteria inhibited conidial germination and mycelial growth and caused morphological changes, indicating that these strains are promising as biocontrol agents, since many commercial synthetic antifungals have similar effects. In addition, some LAB strains reduced the FB<sub>1</sub> concentration *in vitro*. These results demonstrate the potential of LAB for biological control of *F. verticillioides* to minimize fumonisin contamination, thus contributing to improved food safety.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CNPq (The Brazilian Government Organization for Grant Aid and Fellowship to Brazilian Researchers) - grant number 405452/2016-0, the Araucária Foundation (Project announcement 09/2016, Research project agreement 001/2017), and CAPES (Co-ordination for Formation of High-Level Professionals) for the financial support. The CNPq research productivity fellowship is greatly appreciated by E.Y.S. Ono (grant number 311116/2020-5) and M.A. Ono (grant number 311922/2018-0) as well as the CAPES/Dr scholarship by M.T. Hirozawa, J.G. Bordini and A.J. Oliveira. The authors are also grateful to Laboratory of Electron Microscopy and Microanalysis (LMEM) – State University of Londrina.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. **Food Control**, v. 17, p. 454–461, 2006.
- ARIAS, S.L.; MARY, V.S.; OTAIZA, S.N.; WUNDERLIN, D.A.; RUBINSTEIN, H.R.; THEUMER, M.G. Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B<sub>1</sub>-watered maize seedlings. **Phytochemistry**, v. 125, p. 54–64, 2016.
- ARUMUGAM, T.; PILLAY, Y.; GHAZI, T.; NAGIAH, S.; ABDUL, N.S.; CHUTURGOON, A.A. Fumonisin B<sub>1</sub> induced oxidative stress triggers Nrf2-mediated antioxidant response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. **Mycotoxin Research**, v. 35, p. 99–109, 2019.
- BLACK, B.A.; ZANNINI, E.; CURTIS, J.M.; GÄNZLE, M.G. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 1866–1873, 2013.

BORAH, S.N.; GOSWAMI, D.; SARMA, H.K.; CAMEOTRA, S.S.; DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1505, 2016.

DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. **Plant Disease**, v. 83, p. 62–65, 1999.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; LAX, A.R.; CLEVELAND, T.E.; RUSSIN, J.S. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1320–1324, 1999.

CHLEBICZ, A.; ŚLIŹEWSKA, K. *In vitro* detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub>, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from Genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Probiotics Antimicrobial Proteins**, v. 11, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *M51-A* Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; Approved guideline. Wayne, PA USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Terceiro levantamento (2020) safra 2020/21**, 2020.

COPPOCK, R.; DZIWENKA, M. Mycotoxins. In GUPTA, R.C. **Biomarkers in Toxicology**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 549–562.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems**. Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, p. 93–109, 2013.

DEEPTHI, B. V.; RAO, K.P.; CHENNAPA, G.; NAIK, M.K.; CHANDRASHEKARA, K.T.; SREENIVASA, M.Y. Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. **Plos One**, v. 11, 2016.

EL-NEZAMI, H.S.; CHREVATIDIS, A.; AURIOLA, S.; SALMINEN, S.; MYKKÄNEN, H. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, p. 680–686, 2002.

FRANCO, T.S.; GARCIA, S.; HIROOKA, E.Y.; ONO, Y.S.; DOS SANTOS, J.S. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 739–748, 2011.

GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Corn History and Culture. In SERNA-SALDIVAR, S.O. **Corn**. 3° ed. AACC International Press, 2019. p 1–18.



GUPTA, R.; SRIVASTAVA, S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. **Food Microbiology**, v. 42, p. 1–7, 2014.

HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPÄÄ, P.E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T. Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3086–3091, 2001.

HATAB, S.; YUE, T.; MOHAMAD, O. Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 238–241, 2012.

HEINL, S.; HARTINGER, D.; THAMHESL, M.; VEKIRU, E.; KRŠKA, R.; SCHATZMAYR, G.; MOLL, W.-D.; GRABHERR, R. Degradation of fumonisin B<sub>1</sub> by the consecutive action of two bacterial enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 145, p. 120–129, 2010.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H.S.; STEELE, J.L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1064–1068, 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans**. France: International Agency for Research on Cancer Press, 2002.

JUODEIKIENE, G.; BARTKIENE, E.; CERNAUSKAS, D.; CIZEIKIENE, D.; ZADEIKE, D.; LELE, V.; BARTKEVICIUS, V. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. **LWT - Food and Science Technology**, v. 89, p. 307–314, 2018.

KHAN, R.B.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A.A. Fumonisin B<sub>1</sub> induces oxidative stress in oesophageal (SNO) cancer cells. **Toxicol**, v. 141, p. 104–111, 2018.

KHARAZIAN, Z.A.; SALEHI JOUZANI, G.; AGHDASI, M.; KHORVASH, M.; ZAMANI, M.; MOHAMMADZADEH, H. Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. **Biological Control**, v. 110, p. 33–43, 2017.

KWAK, M.K.; LIU, R.; KANG, S.O. Antimicrobial activity of cyclic dipeptides produced by *Lactobacillus plantarum* LBP-K10 against multidrug-resistant bacteria, pathogenic fungi, and influenza A virus. **Food Control**, v. 85, p. 223–234, 2018.

LAITILA, A.; ALAKOMI, H.-L.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 566–76, 2002.

LAITILA, A.; SAARELA, M.; KIRK, L.; SIIKA-AHO, M.; HAIKARA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VIRKAJÄRVI, I. Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 336–340, 2004.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4084–4090, 2000.

LE LAY, C.; COTON, E.; LE BLAY, G.; CHOBERT, J.M.; HAERTLÉ, T.; CHOISSET, Y.; VAN LONG, N.N.; MESLET-CLADIÈRE, L.; MOUNIER, J. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 79–85, 2016.

LI, H.; ZHANG, S.; LU, J.; LIU, L.; ULUKO, H.; PANG, X.; SUN, Y.; XUE, H.; ZHAO, L.; KONG, F.; LV, J. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. **Food Control**, v. 43, p. 57–64, 2014.

LUZ, C.; FERRER, J.; MAÑES, J.; MECA, G. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 60–66, 2018.

LUZ, C.; SALADINO, F.; LUCIANO, F.B.; MAÑES, J.; MECA, G. *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 128–135, 2017.

MARASAS, W.F.O.; RILEY, R.T.; HENDRICKS, K.A.; STEVENS, V.L.; SADLER, T.W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S.A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLUM, W.C.A.; ALLEGOOD, J.; MARTÍNEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J.D.; STARR, L.; SULLARDS, M.C.; ROMAN, A.V.; VOSS, K.A.; WANG, E.; MERRILL, A.H. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 711–6, 2004.

MAURO, C.S.I.; GARCIA, S. Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 854–864, 2019.

MOTOMURA, M.; LOURENÇO, C.E.; VENTURINI, D.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Screening and isolation of anti-*Fusarium moniliforme* compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 213–217, 1996.

DE MUYNCK, C.; LEROY, A.I.J.; DE MAESENEIRE, S.; ARNAUT, F.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v. 159, p. 339–346, 2004.

NIDERKORN, V.; BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 849–856, 2006.

NIDERKORN, V.; MORGAVI, D.P.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 977–985, 2009.

OLIVEIRA, P.M.; BROSNAN, B.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. **Food Control**, v. 51, p. 433–443, 2015.

PIZZOLITTO, R.P.; SALVANO, M.A.; DALCERO, A.M. Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B<sub>1</sub> and the nature of the binding process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 214–221, 2012.

- PLOCKOVÁ, M.; STILES, J.; CHUMCHALOVÁ, J.; HALFAROVÁ, R. Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. **Czech Journal of Food Science**, v. 19, p. 46–50, 2001.
- POORNACHANDRA RAO, K.; DEEPTHI, B. V.; RAKESH, S.; GANESH, T.; ACHAR, P.; SREENIVASA, M.Y. Antiaflatoxigenic potential of cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* MYS44 against *Aspergillus parasiticus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 55–64, 2019.
- PÓSA, R., STOEV, S., KOVÁCS, M., DONKÓ, T., REPA, I. AND MAGYAR, T. A comparative pathological finding in pigs exposed to fumonisin B<sub>1</sub> and/or *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Toxicological and Industrial Health**, v. 32, p. 998–1012, 2016.
- RATHORE, H.S.; NOLLET, L.M.L. Pesticides evaluation of environmental pollution. 1° ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 2012.
- ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; SINDEREN, D. VAN. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 915–923, 2008.
- SCHMIDT, M.; LYNCH, K.M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. **Food Control**, v. 88, p. 139–148, 2018.
- SHEPARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077–2087, 1990.
- SIEDLER, S.; BALTI, R.; NEVES, A.R. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 138–146, 2019.
- TAROUB, B.; SALMA, L.; MANEL, Z.; OUZARI, H.-I.; HAMDI, Z.; MOKTAR, H. Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and *in vitro* detoxification of ochratoxin A. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 17–27, 2019.
- TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 47, p. 357–364, 2006.
- TUPPIA, C.M.; ATANASOVA-PENICHON, V.; CHÉREAU, S.; FERRER, N.; MARCHEGAY, G.; SAVOIE, J.-M.; RICHARD-FORGET, F. Yeast and bacteria from ensiled high moisture maize grains as potential mitigation agents of fumonisin B<sub>1</sub>. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 97, p. 2443–2452, 2016.
- UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D.; LEE, U.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. A limited surveys of fumonisins in corn and corn-based products in Asian Countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27–34, 1993.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (USDA). **World Agricultural Production**. Circular Series WAP 11-19, 2019.

VENDRUSCOLO, C.P.; FRIAS, N.C.; DE CARVALHO, C.B.; DE SÁ, L.R.M.; BELLI, C.B.; BACCARIN, R.Y.A. Leukoencephalomalacia outbreak in horses due to consumption of contaminated hay. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 1879–1881, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Public Health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva, Switzerland, 1990.

# CAPÍTULO 15

## PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE *Drosophila* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 20/10/2021

### **Lorena Tayrini de Oliveira da Silva**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Programa de Pós-graduação em  
Biologia Evolutiva, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<http://lattes.cnpq.br/7091486201211918>

### **Silvana Aparecida Beira**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Programa de Pós-graduação em  
Biologia Evolutiva, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<http://lattes.cnpq.br/0232743142891514>

### **Camila Heloíse dos Santos**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Programa de Pós-graduação em  
Biologia Evolutiva, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<http://lattes.cnpq.br/2530803995320807>

### **Janaina Cosmedamiana Metinoski Bueno**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<http://lattes.cnpq.br/6847242771720540>

### **Natana Maria Metinoski Bueno**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<http://lattes.cnpq.br/4573281078486654>

### **Rogério Pincela Mateus**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Programa de Pós-graduação em  
Biologia Evolutiva, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<https://orcid.org/0000-0001-7874-1149>

### **Luciana Paes de Barros Machado**

Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Programa de Pós-graduação em  
Biologia Evolutiva, Departamento de Ciências  
Biológicas  
Guarapuava – PR  
<https://orcid.org/0000-0002-3197-0187>

**RESUMO:** Ajustes distintos da coevolução antagônica entre sexos podem resultar em diferenciação interpoblacional e especiação. Existe uma lacuna muito grande de dados reprodutivos sobre espécies de *Drosophila* que ocorrem nas matas brasileiras, onde, na maioria das vezes, barreiras geográficas não se distinguem. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise de características reprodutivas de duas espécies de *Drosophila*, *D. maculifrons* e *D. mediostrata*, provenientes de duas populações simpátricas (PMA e SSF) de fragmentos de mata da região Neotropical, as quais não foram estudadas quanto a aspectos da biologia

reprodutiva até o momento. Foram analisados o tamanho do testículo (TT), duração da cópula (DC), número de espermatozoides armazenados pelas fêmeas por cópula (EA), de progênie produzida pelas fêmeas por cópula (P/F), e a produtividade de cruzamentos intra e interpopulacionais (P/C). TT e EA em *D. maculifrons* foram significativamente maiores que em *D. mediotriata*. Também houve diferença interpopulacional significativa para EA, sendo maior em SSF para ambas espécies, e para DC, também maior em SSF para *D. maculifrons* e em PMA para *D. mediotriata*. No entanto, diferenças em EA e DC entre populações das duas espécies não resultou em diferenças na produtividade dos cruzamentos interpopulacionais em relação aos intrapopulacionais. Não houve diferença interespecífica significativa para P/C. Estes resultados indicam uma relação mais evidente entre maior testículo com maior número de espermatozoides armazenados em *D. maculifrons* do que em *D. mediotriata*. No entanto, esta superioridade em *D. maculifrons* não refletiu em maior número de progênie/cópula que em *D. mediotriata*, e o ajuste populacional diferencial no armazenamento de espermatozoides e duração da cópula não resultaram em cruzamentos improdutivos, sugerindo que o nível das diferenças interpopulacionais nos mecanismos pré-zigóticos analisados não tiveram consequências nos parâmetros pós-zigóticos, apesar de algumas diferenças interpopulacionais significativas na produtividade de *D. mediotriata*, que são destacadas neste trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE:** Conflito sexual, espermatozoide, produtividade, testículo.

## REPRODUCTIVE PARAMETERS IN NEOTROPICAL SPECIES OF *Drosophila* (DIPTERA; DROSOPHILIDAE)

**ABSTRACT:** Different adjustments of antagonistic coevolution between sexes can result in interpopulation differentiation and speciation. There is a very large lack of reproductive data on *Drosophila* species that occur in Brazilian forests, where, in most cases, geographic barriers are not distinguishable. The aim of this work was to analyze reproductive characteristics of two *Drosophila* species, *D. maculifrons* and *D. mediotriata*, from two sympatric populations (PMA and SSF) from forest fragments in the Neotropical region, which were studied about aspects of reproductive biology to date. Testis size (TT), duration of copulation (DC), number of sperm stored by females per copulation (EA), progeny produced by females per copulation (P/F), and productivity of intra- and interpopulation crosses were analyzed. (P/C). TT and EA in *D. maculifrons* were significantly higher than in *D. mediotriata*. There was also a significant interpopulation difference for EA, being higher in SSF for both species, and for DC, also higher in SSF for *D. maculifrons* and in PMA for *D. mediotriata*. However, differences in EA and DC between the populations of both species did not result in differences in the productivity of interpopulation crosses compared to intrapopulation crosses. There was no significant interspecific difference for P/C. These results indicate a more evident relationship between larger testis and larger number of sperm stored in *D. maculifrons* than in *D. mediotriata*. However, this superiority in *D. maculifrons* did not reflect a greater number of progeny/copulation than in *D. mediotriata*, and the differential population adjustment in sperm storage and copulation duration did not result in unproductive crosses, suggesting that the level of interpopulation differences in the prezygotic mechanisms analyzed had no consequences on postzygotic parameters, despite some significant interpopulation differences in productivity for *D. mediotriata*, which are pointed out in this work.

**KEYWORDS:** Sexual conflict, sperm, productivity, testis.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os espécimes de *Drosophila* da família Drosophilidae (Diptera; Insecta) são organismos saprófitas relevantes nas cadeias alimentares, alimentando-se, geralmente, de leveduras, que se desenvolvem em tecidos vegetais em decomposição. A utilização eficiente dos alimentos e a exploração de novos ambientes, inclusive os alterados por ação antrópica (RAFAEL; VELA, 2003), explicam o sucesso do gênero e a sua ampla distribuição (THROCKMORTON, 1975). As moscas deste gênero apresentam sensibilidade a alterações ambientais, como temperatura e umidade, podendo modificar caracteres que influenciam a taxa de aumento e sobrevivência da população como fertilidade, viabilidade, tempo de desenvolvimento, e resistência dessecação (SENE et al., 1980; TIDON-SKLORZ; SENE, 1992; BALANYA et al., 2006; TORRES; MADI-RAVAZZI, 2006; MATEUS et al., 2019).

As espécies representantes dos grupos irmãos *guaramunu* (ROBE; LORETO; VALENTE, 2010; ROBE; VALENTE; LORETO, 2010) e *tripunctata* (THROCKMORTON, 1975), *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata*, respectivamente, são objeto deste trabalho. Estas espécies são generalistas e endêmicas da região Neotropical, abundantes especialmente nas áreas de mata do sul do Brasil (DOBZHANSKY; PAVAN, 1950; SALZANO, 1955; KLACZKO, 2006; TIDON, 2006; SCHMITZ; HOFMANN; VALENTE, 2010; CAVASINI et al., 2014; OLIVEIRA et al. 2016), nunca foram estudadas quanto as características reprodutivas que podem estar sob ação de seleção sexualmente antagonica, cujo “ajuste” às condições ambientais de uma população pode resultar, ao longo do tempo evolutivo, na gênese de novas espécies (MARKOW, 1996; KNOWLES; MARKOW, 2001), processo chamado de especiação.

A coevolução antagonica entre os sexos pode ser definida como a manipulação de características reprodutivas da fêmea pelo macho para aumentar seu sucesso reprodutivo, que é seguida pela evolução da resistência da fêmea a essa coerção (MOORE; PIZZARI, 2005). Este conflito sexual pode desempenhar um papel chave na evolução dos sistemas de acasalamento e de muitas características reprodutivas (ARNQVIST; NILSSON, 2000), desta maneira a análise integrada de diferentes caracteres reprodutivos, assim como a história evolutiva da espécie, é essencial para a compreensão da evolução dos sistemas reprodutivos. Os machos e as fêmeas são agentes atuantes na evolução dos caracteres reprodutivos, e a dinâmica e consequências dessas atividades apenas começaram a ser compreendidas em insetos: os machos apresentam diferentes características do esperma que asseguram a paternidade, e as fêmeas influenciam a competição de esperma e dirigem a evolução destes caracteres (SNOOK; BACIGALUPE; MOORE, 2005).

Algumas características da morfologia do aparelho reprodutivo do macho podem desempenhar um papel na seleção sexual pós-cópula (SNOOK; BACIGALUPE; MOORE,

2005). A morfologia dos órgãos reprodutores e de armazenamento de espermatozoides, e o processo de transferência e armazenamento de espermatozoides mostram uma extensa variação no gênero *Drosophila*. O aparelho reprodutivo da fêmea também pode atuar na competição pela fertilização: receptáculos seminais mais longos favorecem espermas mais longos, os quais podem deslocar os gametas anteriores e aumentar a velocidade de reacasamento (MILLER; PITNICK, 2002; LÜPOLD et al., 2016).

O tamanho do testículo também apresenta grande variação entre os machos de espécies de *Drosophila* (MARKOW, 1996; PITNICK; MARKOW, 1994a; PITNICK, 1996) e, em algumas espécies, parece estar positivamente relacionado com o tamanho do espermatozoide, ao invés do número de espermatozoides produzidos (PITNICK, 1996), o que pode levar a um maior período para a maturação sexual do macho, devido ao investimento relativamente maior na formação do tecido testicular (PITNICK; MARKOW, 1994a), e a grande variação no número de espermatozoides transferidos, quanto maior o espermatozoide menor a quantidade transferida, para os órgãos de armazenamento da fêmea (de 25.000 em *D. obscura* a 44 em *D. pachea*) (MARKOW, 1996). Em espécies de *Drosophila* com maior tamanho corporal os machos investem proporcionalmente mais energia nos testículos do que os machos de espécies menores, e a variação interespecífica na produção de gametas também é muito maior no macho do que nas fêmeas.

O padrão mencionado anteriormente em *Drosophila* de quanto maior o tamanho menor o número de espermatozoides transferidos para as fêmeas, também tem relação com menor a progênie, em comparação com espécies que produzem espermatozoides menores (GILBERT, 1981; MARKOW, 1985; PITNICK, 1991; BRESSAC; FLEURY; LACHAISE, 1994; PITNICK; MARKOW, 1994a,b; SNOOK; MARKOW; KARR, 1994; PITNICK, 1996). Esta relação poderia trazer a falsa constatação de que os espermatozoides menores seriam mais eficientes na produção de zigotos. No entanto, a taxa de eficiência do espermatozoide transferido por zigoto em *D. melanogaster*, espécie que produz e transfere milhares de espermatozoides, é de cerca de 2 espermatozoides por zigoto (GILBERT, 1981), praticamente a mesma taxa de *D. hydei*, de 2,2 (PITNICK; MARKOW, 1994b), espécie de espermatozoides “gigantes” e que produz e transfere um número de espermatozoides bem inferior a *D. melanogaster*. Assim, o tamanho dos espermatozoides pode ter relação com a quantidade transferida para as fêmeas, mas não com a sua qualidade na produção de zigotos.

Outro importante caráter reprodutivo também sujeito à coevolução antagônica entre os sexos é o tempo de duração da cópula (MOORE; PIZZARI, 2005), pois para as fêmeas, cópulas mais curtas resultariam em mais oportunidades de acasalamento e escolha críptica dos espermatozoides no seu trato reprodutivo (MARKOW; HOCUTT, 1998; KNOWLES; MARKOW, 2001); enquanto para os machos, cópulas mais longas seriam vantajosas por impedir que a fêmea se reacasale, e assegurar a paternidade da prole (MAZZI et al., 2009). Os espermatozoides de dois machos armazenados em uma fêmea competem para



fertilizar os óvulos, esta competição, pode resultar no desenvolvimento de mecanismos que asseguram a paternidade, sendo o aumento da duração da cópula um deles (PITINICK; MARKOW; SPICER, 1995; MARKOW, 1996).

Em *Drosophila melanogaster* foi demonstrado que o tempo de cópula que excede o período necessário para a transferência do esperma tem função de retardar o reacasamento da fêmea, ao invés de aumentar a prole descendente deste macho (GILCHRIST; PARTRIDGE, 2000). Ainda, fatores diferentes da seleção sexual também podem interferir no sucesso da cópula em *Drosophila*, por exemplo, a qualidade da dieta na fase juvenil pode afetar mais fortemente a frequência de cópulas nas fêmeas do que nos machos (GRANGETEAU et al., 2018).

Pode haver correlação entre o aparato reprodutivo de machos e fêmeas e a qualidade do espermatozoide, por exemplo, em *Drosophila melanogaster* o tamanho do espermatozoide, dos testículos e do receptáculo seminal das fêmeas é o mesmo, todos medem cerca de 2 mm. Nesta espécie, apenas após 20 minutos da cópula os órgãos de armazenamento de espermatozoides nas fêmeas (receptáculo seminal e espermatecas) estão repletos de espermatozoides, os espermatozoides que permanecem no útero são eliminados com a postura dos ovos (LEFEVRE; JONSSON, 1962). Assim, é esperado que os machos saturem a capacidade dos órgãos de armazenamento de espermatozoides das fêmeas, ou, no mínimo, transfiram uma quantidade superior à requerida pelas fêmeas para fertilizar seus ovos, e reabastecer rapidamente seu suprimento de espermatozoides após a cópula (PARKER, 1970; TRIVERS, 1972; KNOWLTON; GREENWELL, 1984).

Em resumo, os modelos propostos para explicar a evolução das estratégias reprodutivas específicas dos sexos consideram um arranjo complexo de coevolução das características, que podem afetar a reprodução, como investimento na produção de gametas e prole (PITINICK; MARKOW, 1994a; LÜPOLD; PITINICK, 2018). Apesar da fertilização competitiva raramente ser independente de influência das fêmeas, é sugerido que a quantidade e qualidade do espermatozoide podem operar independentemente (PARKER et al., 2010), não existindo uma dicotomia entre a competição de esperma e a escolha críptica da fêmea (EBERHARD, 1996; LÜPOLD et al., 2016), e qualquer característica do espermatozoide determinada pela seleção pós-cópula é tanto intra (competição com espermatozoides de outros machos) como intersexual (escolha da fêmea). Assim, a duração da cópula, a fertilização interna e o armazenamento de espermatozoide que ocorrem em drosófilas as tornaram um importante modelo para o estudo de mecanismos de isolamento reprodutivo pré e pós-zigóticos.

Muitas das pesquisas sobre a biologia reprodutiva citadas acima foram realizadas com espécies de *Drosophila* oriundas de áreas antropizadas, ou xerofíticas, ou ainda de áreas florestais do Neártico, Paleártico e América Central. Não existem pesquisas sobre a biologia reprodutiva de espécies de *Drosophila* que ocorrem em áreas de mata do Brasil. O objetivo deste trabalho foi analisar alguns caracteres reprodutivos, tamanho do testículo,

duração da cópula, número de espermatozoides armazenados na espermateca, número de progênie por cópula, e a produtividade de cruzamentos intra e interpopulacionais de espécies pertencentes a grupos irmãos e endêmicas de florestas, coletadas em simpatria no sul do Brasil, *Drosophila maculifrons* (grupo *guaramunu*) e *D. mediostriata* (grupo *tripunctata*). Dessa forma, pretende-se contribuir com informações sobre a força e os alvos da seleção sexual em espécies do Neotrópico, região com altas taxas de especiação.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### • Locais de coleta

Para as análises de tamanho do testículo, duração da cópula, número de espermatozoides armazenados na espermateca, e produtividade de cruzamentos massais, foram utilizadas duas populações de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata*, coletadas em unidades de conservação pertencentes ao município de Guarapuava-PR, distantes 46 km um do outro: Parque Natural Municipal das Araucárias (PMA - 51°27'19" O, 25°23'36" S) e Parque Municipal Salto São Francisco da Esperança (SSF - 51°17'53" O, 25°03'49,1"S). Para as análises de produção de descendentes por cópula, foram utilizados indivíduos de *D. maculifrons* e *D. mediostriata* apenas da população SSF.

### • Caracteres morfológicos dos testículos e espermatozoides

Foram removidos os testículos direito e esquerdo de cinco machos de cada uma das duas populações de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata*, PMA e SSF. Para as medidas dos testículos, machos virgens com nove dias de idade foram eterizados e dissecados em solução fisiológica 0,9%, os testículos estirados foram montados em lâmina, fotografados em estereomicroscópio Zeiss® (STEMI 2000C), e as medidas do comprimento dos testículos foram realizadas utilizando o Programa ImageJ 1.52a (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004).

A análise dos espermatozoides dos testículos foi realizada em machos virgens com sete dias de idade. Os testículos foram removidos e esmagados entre lâmina e lamínula. As lâminas foram, então, congeladas em nitrogênio líquido para a posterior remoção da lamínula, e fixadas em etanol/ácido acético (3:1) durante três minutos. Em seguida, as lâminas passaram por limpeza em álcool 70% e água destilada, para serem coradas com 4,6-diamino-2-phenyndole (DAPI), e fotografadas em microscópio composto (Olympus BX60): com óptica DIC, fluorescência e câmera colorida Optronics.

### • Duração da cópula

A observação da cópula de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata* na natureza não é possível, devido à ocorrência de espécies crípticas nas populações PMA e SSF (dos SANTOS; MACHADO; MATEUS, 2010; CAVASINI et al., 2014), onde os espécimes foram coletados. Desta maneira, foi realizada tentativa de replicar em laboratório (com moscas

recém-coletadas) importantes condições naturais para a ocorrência de cópula, como a densidade de moscas e período do dia para esta atividade. As análises para estimativa do número de espermatozoides armazenados por cópula e da progênie produzida pelas fêmeas por cópula (descritas a seguir) revelaram baixa frequência de cópula quando uma fêmea virgem com sete dias a nove dias de idade foi colocada com três machos virgens com as mesmas idades. Desta maneira, considerando o número médio de moscas capturadas por armadilha (dos SANTOS; MACHADO; MATEUS, 2010), e que a atividade de cópula segue, geralmente, o ritmo de atividade locomotora em espécies Neotropicais de *Drosophila* (PAVAN; DOBZHANSKY; BURLA, 1950; FUJII; KRISHNAN, 2007; dos SANTOS; MACHADO; MATEUS, 2010), a observação da cópula foi realizada em cruzamentos massais com 15 casais entre sete e nove dias de idade, em período de três horas entre as 8h e 11h.

- **Estimativas do número de espermatozoides armazenados nas espermatecas das fêmeas por cópula**

Foram realizadas cinco réplicas de cruzamentos com uma fêmea e três machos virgens com sete a nove dias de idade. Após alguns minutos do término da cópula, as espermatecas das fêmeas foram removidas e esmagadas entre lâmina e lamínula. As lâminas para a contagem dos espermatozoides armazenados nas espermatecas foram realizadas e analisadas como descrito para a observação dos espermatozoides no testículo.

O número de espermatozoides armazenados foi estimado pela contagem dos flagelos com o auxílio do Programa ImageJ 1.52a (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004), para individualizar cada espermatozoide e impedir que um mesmo gameta fosse considerado mais de uma vez. A motilidade dos espermatozoides armazenados também foi avaliada. Após cópula, foram preparadas lâminas das espermatecas esmagadas entre lâmina e lamínula, em solução fisiológica, e observação direta em microscopia de luz.

- **Análise do número de descendentes produzidos por cópula**

Em câmaras de oviposição, foram realizadas cinco réplicas de cruzamentos de indivíduos de SSF para cada espécie, contendo uma fêmea e três machos virgens com sete a nove dias de idade, após o término da cópula, os machos foram removidos da câmara. Placas para oviposição, contendo ágar 0,5% (1,5% de ágar; 10% de sacarose; e 0,4% de Nipagim), foram observadas e substituídas diariamente, até que as fêmeas deixassem de postar ovos por ao menos dois dias consecutivos. De cada placa foi registrado o número de ovos produzidos, as larvas de segundo estadio foram transferidas para tubos com meio de cultura padrão (banana/ágar), e os adultos emergidos foram sexados e contados. A realização deste experimento também possibilitou estimar a viabilidade dos ovos postos pelas fêmeas (porcentagem de ovos que resultaram em larvas, de larvas em adultos, e de ovos a adultos) de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostrata*. Para averiguar se as fêmeas destas espécies postam ovos não fertilizados, o mesmo experimento descrito anteriormente

foi realizado com cinco réplicas de fêmeas virgens recém eclodidas a idade em que a ausência de ovos atingisse dois dias consecutivos.

• **Produtividade de cruzamentos intra e interpopulacionais**

Para *Drosophila maculifrons*, foram realizados cruzamentos massais em todas as combinações possíveis entre duas isolinhagens de PMA (PMA142 e PMA164) e duas de SSF (SSF008 e SSF033), totalizando 16 cruzamentos: quatro intracruzamentos (machos e fêmeas da mesma linhagem); quatro cruzamentos interlinhagem e intrapopulacional; e oito cruzamentos interlinhagem e interpopulacional. Para *D. mediotriata*, foram realizados cruzamentos com apenas uma linhagem de cada população, totalizando quatro cruzamentos: dois intra e dois interpopulacionais (Tabela 1). Os cruzamentos foram mantidas a 20°C±1°C e fotoperíodo natural.

Cada cruzamento foi realizado em garrafas de 1/4 de L com meio de cultura padrão e em triplicatas contendo em cada uma 15 fêmeas e 15 machos virgens com sete dias de idade. Foram realizados três (para *D. maculifrons*) e quatro (para *D. mediotriata*) repiques, um por semana, e após uma semana do terceiro/quarto repique, as moscas parentais foram descartadas. A cada repique foi avaliado o número de indivíduos mortos para a estimativa do número de descendentes por fêmeas vivas. Assim, foram estabelecidos quatro grupos de idades para *D. maculifrons*: 1º grupo, moscas com 7 a 13 dias; 2º grupo, moscas com 14 a 20 dias; 3º grupo, moscas com 21 a 27 dias; e 4º grupo, moscas com 28 a 34 dias; e cinco grupos para *D. mediotriata*: os mesmos quatro de *D. maculifrons*, mais 5º grupo, moscas com 35 a 41 dias.

<i>Drosophila maculifrons</i>				
	♀PMA142	♀PMA164	♀SSF008	♀SSF033
♂PMA142	♀ <b>PMA142x♂PMA142</b>	♀PMA164x♂PMA142	♀SSF008x♂PMA142	♀SSF033x♂PMA142
♂PMA164	♀PMA142x♂PMA164	♀ <b>PMA164x♂PMA164</b>	♀SSF008x♂PMA164	♀SSF033x♂PMA164
♂SSF008	♀PMA142x♂SSF008	♀PMA164x♂SSF008	♀ <b>SSF008x♂SSF008</b>	♀ <b>SSF033x♂SSF008</b>
♂SSF033	♀PMA142x♂SSF033	♀PMA164x♂SSF033	♀ <b>SSF008x♂SSF033</b>	♀ <b>SSF033x♂SSF033</b>
<i>Drosophila mediotriata</i>				
	♀PMA		♀SSF	
♂PMA	♀ <b>PMAx♂PMA</b>		♀SSFx♂PMA	
♂SSF	♀PMAx♂SSF		♀ <b>SSFx♂SSF</b>	

Tabela 1 - Cruzamentos realizados entre linhagens de duas populações de *Drosophila maculifrons* e *D. mediotriata*. PMA = Parque Natural Municipal das Araucárias, SSF = Parque Municipal Salto São Francisco da Esperança. Em negrito cruzamentos intralinhagem; sublinhados os cruzamentos interlinhagens; os demais são cruzamentos interpupulacionais.

A produtividade dos cruzamentos foi definida como o número da progênie dos intra e intercruzamentos. Esta análise foi realizada por meio da contagem de machos e fêmeas

F1 dos cruzamentos em cada um dos quatro e cinco grupos de idade. As contagens foram realizadas a cada dois dias, após o início da emergência dos primeiros adultos, totalizando quatro contagens em uma semana, para certificar que todos os descendentes do período tenham sido registrados. A comparação da produtividade entre os cruzamentos foi realizada por meio do número total de indivíduos produzidos e também considerando o número de fêmeas vivas em cada grupo de idade para produção por fêmea.

#### • **Análises Estatísticas**

Foram estimadas as médias e desvios padrões do tamanho dos testículos, duração da cópula, número de espermatozoides armazenados nas espermatecas, número de ovos, larvas e adultos produzidos por cópula, da viabilidade, do período de desenvolvimento, e da produtividade no programa Past 3.16. (HAMMER; HARPER; RYAN, 2017). A homocedasticidade dos dados foi averiguada por meio do teste de Shapiro-Wilks nos dados brutos, logaritimizadas e extraída a raiz quadrada, e, assim, foram aplicados os testes de significância mais adequados para as comparações interpopulacionais e interespecíficas. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi aplicada a análise de variância – One Way ANOVA, e o teste de Kruskal-Wallis nos dados não paramétricos. No programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.) foram gerados gráficos do número de ovos postos ao longo do período de observação, e do número de ovos, larvas e adultos produzidos por cópula.

### **3 | RESULTADOS**

#### • **Caracteres morfológicos dos testículos e espermatozoides**

O aparelho reprodutor dos machos das espécies *D. maculifrons* e *D. mediotriata* é constituído por glândulas acessórias translúcidas, um par de vesículas seminal e de testículos, com coloração esbranquiçada. O testículo destas espécies é um tubo fino e longo, com regiões esbranquiçadas homogêneas. De sua porção apical até a vesícula seminal, o testículo apresenta forma espiral com três ou mais giros. A vesícula seminal encontra-se no final do testículo. Dessa forma, a vesícula é caracterizada por estar afastada por uma região que se afunila na parte posterior do testículo, alargando-se novamente já como vesícula seminal.

As medidas dos testículos apresentaram distribuição normal após os dados serem logaritimizadas. Não houve diferenças estatísticas no tamanho entre os testículos esquerdos e direito em *Drosophila maculifrons* ( $F = 0,1109$ ,  $p = 0,9525$ , Tukey para comparações par-a-par,  $p > 0,05$ ), e em *D. mediotriata* ( $F = 0,8991$ ,  $p = 0,5992$ , Tukey para comparações par-a-par,  $p > 0,05$ ). Também não foram encontradas diferenças significativas interpopulacionais no tamanho dos testículos nas duas espécies, no entanto os testículos dos machos de *D. maculifrons* foram significativamente maiores que os de *D. mediotriata* ( $F = 5,072$ ,  $p = 0,0317$ ) (Tabela 2).

Tamanho Testículo	<i>Drosophila mediostriata</i>		<i>Drosophila maculifrons</i>	
	PMA	SSF	PMA	SSF
Direito	8,370± 0,637	8,242± 0,548	8,728± 1,080	9,023± 0,814
Esquerdo	8,378± 0,673	8,272± 0,487	8,809± 0,773	8,837± 0,782
Média da espécie	8,315 ± 0,585		8,849 ± 0,807	

Tabela 2 - Tamanho médio dos testículos (mm) direitos e esquerdos de populações (PMA e SSF) de *Drosophila mediostriata* e *D. maculifrons*. PMA = Parque Natural Municipal das Araucárias, SSF = Parque Municipal Salto São Francisco da Esperança.

Os espermatozoides encontrados nos testículos de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata* são longos, delgados e filiformes, organizados em feixes quando imaturos, e livres quando maduros (Figura 1).

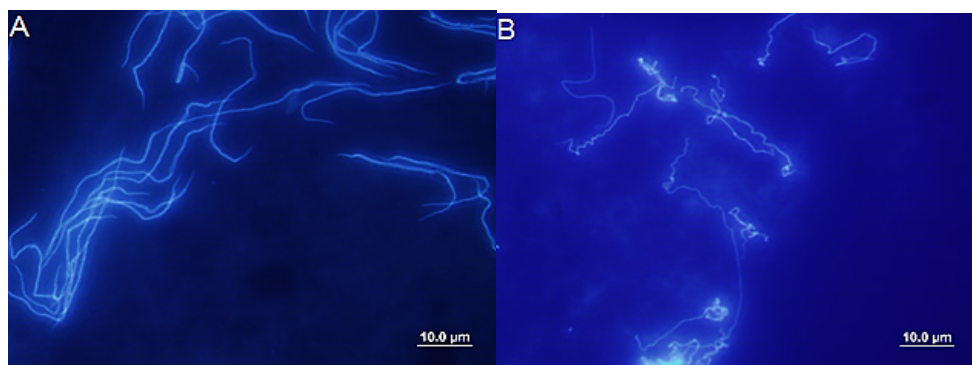


Figura 1 - Espermatozoides corados (DAPI) dos testículos de *Drosophila mediostriata* (A) e *D. maculifrons* (B).

Fonte: foto tirada por da Silva, L. T. O.

#### • Duração da cópula

A duração da cópula foi estatisticamente significativa entre as populações para ambas as espécies: DC em PMA foi mais curta ( $24,45 \pm 8,7$  min) do que em SSF ( $40,69 \pm 16,18$  min) para *D. maculifrons* ( $F = 11,71$ ,  $p < 0,01$ ), e mais longa para *D. mediostriata* (PMA =  $33,84 \pm 2,83$  min, SS =  $20,84 \pm 8,02$ ;  $F = 7,68$ ,  $p < 0,05$ ).

#### • Estimativas do número de espermatozoides armazenados nas espermatecas das fêmeas por cópula

Os espermatozoides encontrados nas espermatecas das fêmeas de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata* apresentaram motilidade, e foram encontrados espacialmente aglomerados (Figura 2). Houve diferença interpopulacional significativa no número médio de espermatozoides armazenados tanto para *D. maculifrons* (PMA: =  $93 \pm 10,1$ ; SSF: =  $150,8 \pm 30,43$ ,  $F = 16,25$ ,  $p = 0,004$ ), como para *D. mediostriata* (PMA: =  $63 \pm 8,31$ ; SSF: =  $78,4$

$\pm 6,5$ ,  $F = 10,65$ ,  $p = 0,0115$ ), com maior armazenamento nas espermatecas das fêmeas provenientes de SSF. As fêmeas das duas populações de *D. maculifrons* armazenaram significativamente mais espermatozoides nas espermatecas do que *D. mediostriata* (PMA:  $F = 26,32$ ,  $p = 0,0009$ ; SSF:  $F = 27,08$ ,  $p = 0,0008$ ).

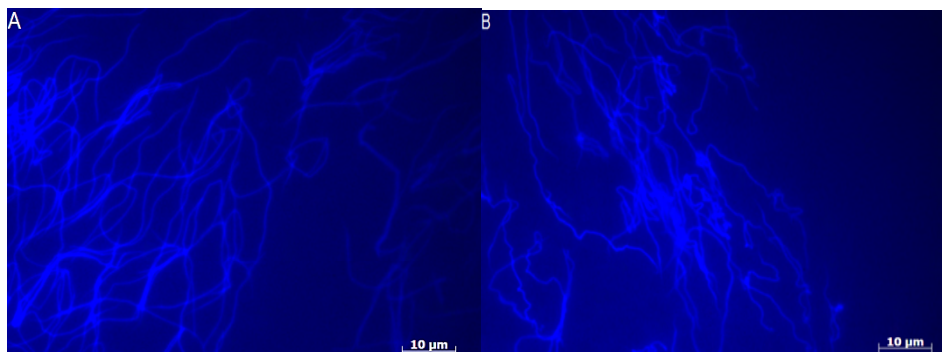


Figura 2 - Espermatozoides corados (DAPI) nas espermatecas de *Drosophila maculifrons* (A) e *D. mediostriata* (B).

Fonte: foto tirada por da Silva, L. T. O.

#### • **Análise do número de descendentes produzidos por cópula**

Apenas as fêmeas virgens de *Drosophila maculifrons* põem ovos não fertilizados a partir do 5° até o 17° dia de vida, que não se desenvolvem. As fêmeas inseminadas por um único macho de *D. maculifrons* e *D. mediostriata* começaram a oviposição no primeiro dia pós-cópula e terminaram cerca de 21 dias depois. Ao longo deste período, o número de ovos postos foi bastante irregular para as duas espécies (Figura 3). Apesar de uma maior produção de ovos, larvas e adultos pelas fêmeas de *D. maculifrons*, não houve diferença significativa entre a progênie das duas espécies, mesmo após a logaritmização dos dados, devido ao alto desvio padrão (Ovos:  $F = 2,376$ ,  $p = 0,1618$ ; Larvas:  $F = 1,439$ ,  $p = 0,2646$ ; Adultos:  $F = 1,668$ ,  $p = 0,2326$ ). Ainda, se considerado que cerca de 21% dos ovos postos pelas fêmeas inseminadas de *D. maculifrons* ( $\bar{X} = 330,6 \pm 255,79$ ) pode representar ovos não fertilizados ( $\bar{X} = 69,4 \pm 43,37$ ), a ausência de diferença estatística entre o número de progênie das duas espécies pode ser confirmada.

A viabilidade de ovos-larvas de *Drosophila maculifrons* foi estimada em  $\bar{X} = 34,08\% \pm 17,69$  e  $\bar{X} = 38,79\% \pm 18,6$  para *D. mediostriata*, para larva-adulto de *D. maculifrons*  $\bar{X} = 57,43\% \pm 10,95$ , e  $\bar{X} = 47,88\% \pm 21,06$  para *D. mediostriata*, como consequência a viabilidade média ovo-adulto foi de  $\bar{X} = 20,41\% \pm 12,5$  para *D. maculifrons*, e de  $\bar{X} = 19,4\% \pm 10,99$  para *D. mediostriata*. Também não foram encontradas diferenças significativas interespecíficas nas viabilidades médias ovo-larva, larva-adulto e ovo-adulto ( $F = 0,1679$ ,  $F = 0,8091$ ,  $F = 0,0181$ , respectivamente, com  $p > 0,3$ ). Aqui também deve ser destacado que a viabilidade ovo-adulto de *D. maculifrons* deve ser ainda inferior aos cerca de 20%

estimados, pois as fêmeas desta espécie postam ovos não fecundados.

- **Produtividade de cruzamentos intra e interpopulacionais**

A comparação dos intracruzamentos com os cruzamentos interlinhagem intrapopulacional de *Drosophila maculifrons* não resultou em valores significativos de produtividade de machos e fêmeas, e na produtividade total. Assim, as análises estatísticas foram realizadas agrupando os sexos e os cruzamentos nos mesmos dois tipos de *D. mediotriata*, intrapopulacional (♀PMAx♂PMA e ♀SSFx♂SSF) e interpopulacional (♀PMAx♂SSF e ♀SSFx♂PMA).

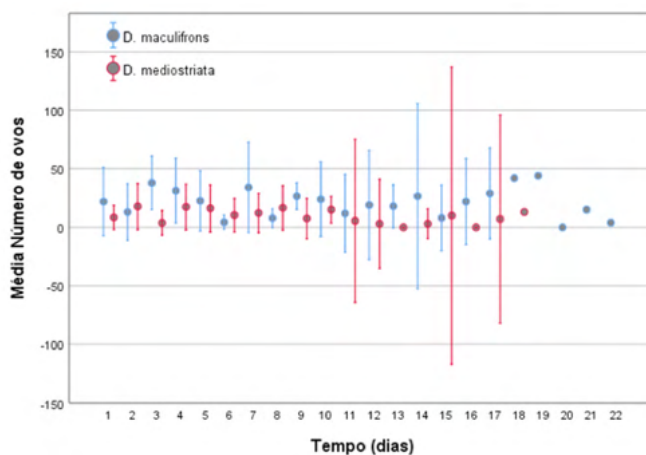


Figura 3 - Número médio de ovos (e intervalo de confiança a 95%) produzidos por inseminação ao longo do tempo pós-cópula para fêmeas de *Drosophila maculifrons* (azul) e *D. mediotriata* (vermelho).

Houve diferença significativa na mortalidade das fêmeas parentais ao longo das idades entre os cruzamentos de *D. maculifrons*. Desta maneira, a comparação da produtividade nos quatro grupos de idade foi realizada considerando o número médio de descendentes produzidos por fêmea viva em cada período. A produtividade foi uniforme ao longo dos quatro grupos de idades avaliados, apenas em ♀SSFx♂PMA a produtividade no 3º grupo de idade foi superior aos demais ( $F = 11,35$ ;  $p = 0,0030$ ). Não houve diferença significativa na produtividade total entre os cruzamentos realizados ( $F = 2,433$ ;  $p = 0,0776$ ), demonstrando não haver isolamento pós-zigótico entre as populações analisadas, apesar das diferenças na duração da cópula entre os cruzamentos intra e interpopulacionais.

Para *Drosophila mediotriata*, também não foram observadas diferenças significativas na proporção de descendentes fêmeas e machos em todos os cruzamentos realizados. Já as comparações da produtividade total e por fêmea apresentaram o mesmo quadro geral, desta forma, foram destacadas as análises da produtividade total dos cruzamentos. Quando agrupando os cruzamentos como intra e interpopulacionais, não foi observada diferença significativa na produtividade total de descendentes. No entanto, quando os cruzamentos



foram agrupados em ♀PMAx♂PMA com ♀PMAx♂SSF, e ♀SSFx♂SSF com ♀SSFx♂PMA, ou seja intra com fêmea do cruzamento interpopulacional a mesma do intrapopulacional, foi observado diferença significativa, mas no agrupamento recíproco, quando a fêmea do cruzamento interpopulacional foi de população diferente do cruzamento intrapopulacional, não foi obtido o mesmo resultado (Tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa na produtividade de descendentes ao longo dos cinco grupos de idades dos cruzamentos realizados, apesar de poder ser destacada uma queda na produtividade dos 4º e 5º grupos de idade nos cruzamentos que envolveram fêmeas de PMA.

	SQ	GL	MQ	F	P
<b>1</b>					
Entre os grupos	448,532	1	448,532	0,3012	0,5952
Dentro dos grupos	14890,9	10	1489,09		
Total	15339,4	11			
<b>2</b>					
Entre os grupos	78,1789	1	78,1789	40,18	0,0000
Dentro dos grupos	19,4589	10	1,94589		
Total	97,6378	11			

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados

Tabela 3 - Análise de variância do total de descendentes produzidos nos cruzamentos intra e interpopulacionais de *Drosophila mediopunctata* do município de Guarapuava-PR: (1) intra (♀PMAx♂PMA e ♀SSFx♂SSF) e interpopulacionais (♀PMAx♂SSF e ♀SSFx♂PMA); (2) agrupamento dos cruzamentos ♀PMAx♂PMA com ♀PMAx♂SSF e ♀SSFx♂SSF com ♀SSFx♂PMA. PMA = Parque Natural Municipal das Araucárias, SSF = Parque Municipal Salto São Francisco da Esperança.

Os cruzamentos ♀SSFx♂SSF e ♀SSFx♂PMA apresentaram produtividade semelhante e foram cerca de seis vezes mais produtivos que os cruzamentos ♀PMAx♂PMA e ♀PMAx♂SSF, os quais, por sua vez, também apresentaram produtividade semelhante. Desta forma, pode ser destacado que a produtividade foi determinada pela fêmea envolvida no cruzamento (Figura 4).

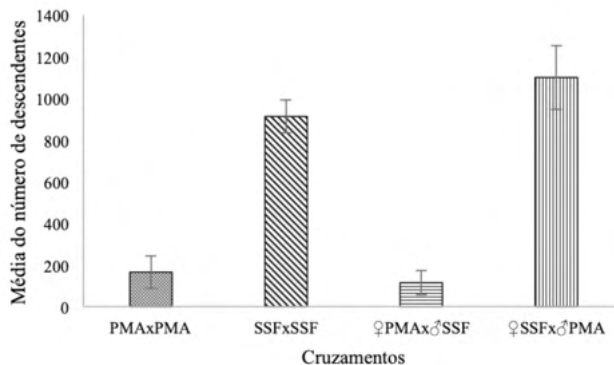


Figura 4 - Número médio de descendentes total ( $\pm$  desvios padrão) produzidos em cruzamentos intra e interpopulacionais de *Drosophila mediopunctata* do município de Guarapuava-PR. PMA = Parque Natural Municipal das Araucárias, SSF = Parque Municipal Salto São Francisco da Esperança.

## 4 | DISCUSSÃO

Embora existam evidências de que a seleção intra e intersexual desempenham papel central na evolução dos caracteres reprodutivos e nos sistemas de acasalamentos de *Drosophila*, sua importância em espécies de mata da região Neotropical não está clara. Neste trabalho foram utilizadas espécies de grupos irmãos e provenientes de mesmas populações, ou seja, ocorrendo em simpatria em áreas da Mata Atlântica brasileira, com o objetivo de minimizar os efeitos das relações filogenéticas e do ambiente nas diferenças que possivelmente pudessem ser encontradas entre *D. maculifrons* e *D. mediotriata* com relação aos caracteres reprodutivos analisados.

Em espécies de *Drosophila* existe muita variação interespecífica no tamanho dos testículos, com uma relação positiva entre o tamanho do testículo e do espermatozoide, e negativa entre o tamanho e o número de espermatozoides transferidos para as fêmeas (MARKOW, 1996), o que pode ocasionar um período maior para a maturação sexual do macho, devido ao investimento relativamente elevado na formação do tecido testicular (PITNICK; MARKOW, 1994a).

De acordo com a revisão de Pitnick (1996), nós propomos a distinção de quatro classes de tamanho de testículo em *Drosophila*: 1) entre 1 e 7 mm; 2) maior que 7 e menor que 20 mm; 3) maior que 20 e menor que 30 mm; e 4) maior que 30 mm. Dentre as espécies analisadas até o momento, apenas *D. bifurca* apresenta tamanho de testículo compatível com a classe 4 (PITNICK; MARKOW; SPICER, 1995). O tamanho médio do testículo de *D. maculifrons* e *D. mediotriata* enquadra-se na segunda classe, de espécies com tamanho intermediário de testículo, nem diminutos, como da primeira classe, nem grandes, como as espécies que podem produzir espermas “gigantes” (terceira e quarta classes) (PITNICK; MARKOW, 1994b; PITNICK; MARKOW; SPICER, 1995).

Neste trabalho foi observado que *Drosophila maculifrons* apresentou maior

tamanho de testículo e maior número de espermatozoides armazenados pelas fêmeas que *D. mediostriata*. Ainda, o número de espermatozoides armazenados pelas fêmeas nas espermatecas foi maior na população SSF, a qual também apresentou a maior duração da cópula nesta espécie. A competição de esperma está amplamente associada com esse aumento no tamanho dos testículos e no número de espermatozoides em diferentes táxons, insetos (GAGE, 1994), peixes (STOCKLEY et al., 1997), pássaros (MØLLER, 1988), mamíferos (MØLLER, 1989), inclusive humanos (SIMMONS et al., 2004). No entanto, o maior tempo de cópula e armazenamento de espermatozoides não resultaram em maior número de progênie, sugerindo que essa espécie possa apresentar um limiar energético para a produção de descendentes, o qual é independente do número de espermatozoides disponíveis.

A receptividade da fêmea para se reacasalar depende da queda no número de espermatozoides armazenados da cópula anterior, o retorno da receptividade da fêmea pode ocorrer após a produção de 90% dos descendentes que seriam esperados de uma única cópula (GROMKO; NEWPORT; KORTIER, 1984). Por isso, estimar o número de progênie por cópula é importante no entendimento dos sistemas de acasalamento em *Drosophila*. A maioria das espécies de *Drosophila* apresenta dois órgãos para armazenamento de espermatozoides, o receptáculo seminal (órgão primário de armazenamento) e a espermateca (PITNICK; MARKOW; SPICER, 1999). Neste trabalho foi estimado o número de espermatozoides nas espermatecas das fêmeas de *D. maculifrons* e *D. mediostriata* para determinar por quanto tempo esta reserva extra, após o uso dos espermatozoides do receptáculo seminal serem utilizados, permitiria a produção de zigotos.

O período de oviposição após a cópula foi amplo (cerca de 20 dias), porém bastante irregular, indicando que o espermatozoide armazenado pode ser utilizado por vários dias. Pode ser constatado que o número médio de espermatozoides na espermateca foi inferior ao número de ovos postos. Este resultado confirma que os espermatozoides do receptáculo seminal são utilizados primeiro, e que este baixo número extra de espermatozoides favorece o reacasalamento para a reposição do estoque, reforçando a competição de esperma e seleção intersexual, com a escolha críptica da fêmea (LÜPOLD; PITNICK, 2018).

A viabilidade dos zigotos de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata* foi baixa, sendo mais afetada na transição ovo-larva do que larva-adulto. Este é um fato que reforça a importância da escolha críptica da fêmea na seleção dos espermatozoides armazenados para a formação de zigotos viáveis. O número médio de progênie por cópula produzido para estas espécies está entre os menores para as espécies em que este caráter foi avaliado, sendo equivalente ao número estimado para *D. hydei*, espécie que produz espermatozoides “gigantes”, que são transferidos em baixo número (cerca de 100/cópula) para as fêmeas (PITNICK; MARKOW, 1994a; MARKOW, 1996; PITNICK, 1996). Desta maneira, pode existir relação do tamanho do testículo e/ou da duração da cópula com o número de espermatozoides armazenados pelas fêmeas, porém não com a qualidade da

progênie gerada.

A maior duração da cópula e maior número de espermatozoides que podem ser armazenados pelas fêmeas podem ser uma resposta à competição de esperma com outros machos (seleção intrasexual). Em algumas espécies de *Drosophila* a duração da cópula é determinada pela fêmea (MAZZI et al., 2009), enquanto em outras pode estar sujeita ao controle do macho (BACIGALUPE et al., 2007). Além disso, a duração da cópula poderia ser o resultado da interação de ambos os sexos (MARKOW 1981; HIRAI; SASAKI; KIMURA, 1999). A duração da cópula de *Drosophila maculifrons* e *D. mediostriata*, entre 20 e 40 minutos, está entre as mais longas observadas até o momento (GRANT, 1883; MARKOW, 1996). Em insetos, este caráter depende de processos de coevolução sexualmente antagônica (PARKER, 1979; HOLLAND; RICE, 1998; MOORE; PIZZARI, 2005), devido aos “interesses” reprodutivos distintos entre machos e fêmeas.

A duração da cópula mais curta resulta em oportunidades para reacasalamentos e escolha críptica da fêmea em seu trato reprodutivo (MARKOW; HOCUTT, 1998; KNOWLES; MARKOW, 2001), enquanto cópulas longas beneficiam os machos porque impedem as fêmeas de se reacasalarem, assegurando a paternidade da prole (CHEN et al., 1988; ALCOOK, 1994; SCHOEFL; TABORSKY, 2002; CHAPMAN et al., 2003; LIU; KUBLI, 2003; MAZZI et al. 2009; SKWIERZYŃSKA et al. 2018). Contudo, a extensão do período de cópula também poderia ser vantajosa para a fêmea, pois o ejaculado dos machos é responsável pelo aumento na fecundidade (NEUBAUM; WOLFNER, 1999; SAVALLI; FOX, 1999; WOLFNER, 2002; XUE; NOLL, 2002; EDVARDSSON; CANAL, 2006; WIGBY et al., 2009). Recentemente, também foi demonstrado que sob risco de competição de esperma, as proteínas do fluido seminal, já no trato reprodutivo da fêmea, poderiam melhorar a produção de descendentes do último macho competidor, e aumentar o número de espermatozoides liberados (NGUYEN; MOEHRING, 2018; IWATA et al., 2021).

Entre os caracteres reprodutivos pós-zigóticos, a produtividade, definida aqui como o número de descendentes produzidos nos cruzamentos, também pode ser afetada em cruzamentos interpopulacionais de espécies em divergência. Cruzamentos entre populações de uma mesma espécie em processo de diferenciação incipiente, e cruzamentos interespecíficos, podem gerar menor produtividade que os cruzamentos intrapopulacionais e intraespecíficos, degeneração da produtividade da F2, e, ainda, cruzamentos F1x F1 sem descendentes devido à esterilidade do macho híbrido (MADI-RAVAZZI; BICUDO, 1992; MADI-RAVAZZI; BICUDO; MANZATO, 1997; MACHADO; CASTRO; MADI-RAVAZZI, 2002; MACHADO, MADI-RAVAZZI; TADEI, 2006, como exemplos em espécies cactófilas do neotrópico).

Apesar das diferenças observadas quanto aos caracteres reprodutivos pré-zigóticos entre as populações de *Drosophila maculifrons* e *D. mediopunctata*, não houve interferência na produtividade dos intercruzamentos. Contudo, algumas diferenças podem ser destacadas na produtividade dos cruzamentos de *D. mediostriata*, a população SSF foi

mais produtiva que PMA e os cruzamentos interpopulacionais apresentaram produtividade semelhante ao cruzamento intrapopulacional quando a fêmea envolvida no cruzamento interpopulacional pertencia a mesma população do cruzamento intrapopulacional. Assim, ♀PMAx♂SSF apresentou produtividade semelhante ao cruzamento intrapopulacional ♀PMAx♂PMA, e ♀SSFx♂PMA obteve produtividade similar a ♀SSFx♂SSF.

O postulado de que o conflito sexual na evolução de caracteres pré-zigóticos leva ao isolamento reprodutivo é baseado na evolução arbitrária, ao acaso, como causa da seleção sexual dirigindo o isolamento entre populações alopátricas (COBB; BURNET; CONNOLLY, 1988; PRICE et al., 2001; TANUJA; RAMACHANDRA; RANGANATH, 2001; COYNE et al., 2002). Contudo, nem toda variedade de “ajuste” ao conflito sexual é possível, porque os machos têm um número limitado de fêmeas para cruzar, e as fêmeas são capazes de produzir um número limitado de descendentes (BATEMAN, 1948), pois os óvulos são um recurso limitante devido ao alto custo energético de sua produção (ALEXANDER; SHERMAN, 1977). Deste modo, baseado em experimentos que não demonstraram a correlação entre conflito sexual diferencial e o surgimento de mecanismos de isolamento, Bacigalupe e colaboradores (2007) propuseram que os custos para os machos e fêmeas no conflito sexual, e também evolução paralela, ao invés de arbitrária, das trajetórias evolutivas das características reprodutivas poderiam ser os fatores responsáveis pela ausência desta correlação.

Pode ser concluído que uma provável seleção de caracteres pré-zigóticos, resultado da competição de esperma, pode levar a uma tendência de aumento no tamanho dos testículos dos machos, o qual é seletivamente vantajoso por possibilitar maior produção de espermatozoides, que pode, por sua vez, resultar em um maior número de espermatozoides armazenados pela fêmea. Porém, o maior número de espermatozoides não determina um incremento correspondente no número de descendentes produzidos pela fêmea, nem as diferenças populacionais nestes parâmetros levou, ao menos neste momento evolutivo, a divergência em caracteres pós-zigóticos. No entanto, vale aqui destacar que a diferença na produtividade entre os cruzamentos interpopulacionais recíprocos de *Drosophila mediostriata* sugerem certa assimetria da produtividade interpopulacional. O risco para competição de esperma deve ser uma próxima etapa da avaliação do sistema reprodutivo de *D. maculifrons* e *D. mediostriata*, a fim de melhor auxiliar na compreensão da evolução e relação entre esses parâmetros em espécies polífagas do Neotrópico, em que esses estudos são escassos.

## AGRADECIMENTOS

Nós somos gratos à CAPES pelo auxílio financeiro via PROAP PPGBioEvol e pelas bolsas de Mestrado de S. A. Beira e C. H. dos Santos. À Fundação Araucária pela bolsa de Mestrado para L. T. O. da Silva. À UNICENTRO pela infraestrutura. E ao Laboratório

Multiusuário de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), por possibilitar o preparo para microscopia de fluorescência e análise das lâminas de espermatozoides. Nós agradecemos também ao Prof. Dr. Vanderlei A. de Lima (UTFPR, *Campus* Pato Branco) por gentilmente construir o gráfico da postura de ovos ao longo do tempo. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) – Código 001.

## REFERÊNCIAS

ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ, **Igitur Archief**, Utrecht Publishing and Archiving Service, 2004.

ALCOCK, J. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p.1-21, 1994.

ALEXANDER, R. D.; SHERMAN, P. W. Local mate competition and parental investment in social insects. **Science**, v. 196, p. 494-500, 1977.

ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, v. 60, p. 145-164, 2000.

BACIGALUPE, L. D.; CRUDGINGTON, H. S.; HUNTER, F.; MOORE, A. J.; SNOOK, R. R. Sexual conflict does not drive reproductive isolation in experimental populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, p.1763-1771, 2007.

BALANYA, J.; OLLER, J. M.; HUEY, R. B.; GILCHRIST, G. W.; SERRA, L. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. **Science**, v. 313, p. 1773-1775, 2006.

BATEMAN, A. J. Intra-sexual selection in *Drosophila*. **Heredity**, v. 2, p. 349-368, 1948.

BRESSAC, C.; FLEURY, A.; LACHAISE, D. Another way of being anisogamous in *Drosophila* subgenus species: giant sperm, one-to-one gamete ratio, and high zygote provisioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 10399-10402, 1994.

CAVASINI, R.; BUSCHINI, M. L. T.; MACHADO L. P. B.; MATEUS, R. P. Comparison of Drosophilidae (Diptera) Assemblages from two Highland Araucaria Forest Fragments, with and without Environmental Conservation Policies. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, p. 761-768, 2014.

CHAPMAN, T.; ARNQVIST, G.; BANGHAM, J.; ROWE, L. Sexual conflict. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p. 41-47, 2003.

CHEN, P. S.; STUMM-ZOLLINGER, E.; AIGAKI, T.; BALMER, J.; BIENZ, M.; BÖHLEN, P. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. **Cell**, v.54, p. 291-298, 1988.

- COBB M.; BURNET, B.; CONNOLLY, K. Sexual isolation and courtship behaviour in *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, and their interspecific hybrids. **Behavior Genetics**, v. 18, p. 211–225, 1988.
- COYNE, J. A.; KIM, S. Y.; CHANG, A. S.; LACHAISE, D.; ELWYN, S. Sexual isolation between two sibling species with overlapping ranges: *Drosophila santomea* and *Drosophila yakuba*. **Evolution**, v. 56, p. 2424–2434, 2002.
- DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **The Journal of Animal Ecology**, v. 19, p. 1–14, 1950.
- dos SANTOS, K.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P. Sampling two species of the *Drosophila guarani* group in a fragmento f Araucaria Florest: testing different types of baits, fermentation time, and period of the day. **Drosophila information Service**, Norman, v. 93, p. 185-188. 2010.
- EBERHARD, W. G. **Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1996. 501p.
- EDVARDSSON, M.; CANAL, D. The effects of copulation duration in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Behavioural Ecology**, v. 17, p. 430–434, 2006.
- FUJII S.; KRISHNAN, P. Nocturnal Male Sex Drive in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 17, p. 244–251, 2007.
- GAGE, M. J. Associations between body-size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 258, p. 247–254, 1994.
- GILBERT, D. G. Ejaculate esterase 6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, p. 641-650, 1981.
- GILCHRIST A. S.; PARTRIDGE, L. Why it is difficult to model sperm displacement in *Drosophila melanogaster*: the relation between sperm transfer and copulation duration. **Evolution**, v. 54, n. 2, p.534–542, 2000.
- GRANGETEAU, C.; YAHOU, F.; EVERAERTS, C.; DUPONT, S.; FARINI, J-P; BENEY, L.; FERVEUR, J-F. Yeast quality in juvenile diet affects *Drosophila melanogaster* adult life traits. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13070- 13080, 2018.
- GRANT, B. On the relationships between average copulation duration and insemination reaction in the genus *Drosophila*. **Evolution**. v. 37, p. 854-856, 1983.
- GROMKO, M. H.; NEWPORT, M. E. A.; KORTIER, M. G. Sperm dependence of female receptivity to remating in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 38, , p. 1273-1282, 1984.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**, versão 3.16, 2017.
- HIRAI, Y.; SASAKI, H.; KIMURA, M. T. Copulation duration and its genetic control in *Drosophila elegans*. **Zoological Science**, v. 16, p. 211–214, 1999.

HOLLAND, B.; RICE, W. R. Chase away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. **Evolution**, v. 52, p. 1–7, 1998.

IWATA, Y.; SATO, N.; HIROHASHI, N.; WATANABE, Y.; SAUER, W. H.; SHAW, P. W. Sperm competition risk affects ejaculate strategy in terms of sperm number but not sperm size in squid. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 34, p. 1352-1361, 2021.

KLACZKO, L. B. Evolutionary genetics of *Drosophila mediopunctata*. **Genetica**, v. 126, p. 43–55, 2006.

KNOWLES, L. L.; MARKOW, T. A. Sexually antagonistic coevolution of a postmating-prezygotic reproductive character in desert *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8692–8696, 2001.

KNOWLTON, N.; GREENWELL, S. R. Male sperm competition avoidance mechanisms: the influence of female interests. In: SMITH, R. L. (Ed.). **Sperm competition and the evolution of animal mating systems**. Academic Press, New York, p. 61-84, 1984.

LEFEVRE JR, G.; JONSSON, U. B. Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 47, n.12, p. 1719-1736, 1962.

LIU, H.; KUBLI, E. Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 9929–9933, 2003.

LÜPOLD, S., PITNICK, S. Sperm form and function: what do we know about the role of sexual selection?. **Reproduction**, v.155, n. 5, p. 229-243, 2018.

LÜPOLD, S.; MANIER, M K.; PUNIAMOORTHY, N.; SCHOFF, C.; STARMER, W T.; LUEPOLD, S. H. B.; BELOTE, J M.; PITNICK, S. How sexual selection can drive the evolution of costly sperm ornamentation. **Nature**, v. 533, p. 535–538, 2016.

MACHADO, L. P. B.; CASTRO, J. P.; MADI-RAVAZZI, L. Evaluation of the courtship and of the hybrid male sterility among *Drosophila buzzatii* cluster species (Diptera, Drosophilidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 601-608, 2002.

MACHADO, L. P. B.; MADI-RAVAZZI, L.; TADEI, W. J. Reproductive relationships and degree of synapsis in the polytene chromosomes of the *Drosophila buzzatii* species cluster. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 279-293, 2006.

MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H. E. M. C. Differentiation of *Drosophila serido* (isofemale line A95F3) and *D. koepferae* (isofemale line B20D2) reproductive isolation, development time and polytene chromosome banding patterns. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, p. 831-851, 1992.

MADI-RAVAZZI, L.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. **Cytobios**, v. 89, p. 21-30, 1997.

MARKOW, T. A. Courtship behavior and control of reproductive isolation between *Drosophila mojavensis* and *Drosophila arizonensis*. **Evolution**, v. 35, p.1022–1026, 1981.



- MARKOW, T. A. A comparative investigation of the mating system of *Drosophila hydei*. **Animal Behaviour**, v. 33, p. 775-781, 1985.
- MARKOW, T. A. Evolution of *Drosophila* mating systems. **Evolutionary Biology**. v. 29, p. 73-106, 1996.
- MARKOW, T. A.; HOCUTT, G. D. Reproductive isolation in Sonoran Desert *Drosophila*: testing the limits of the rules. In: HOWARD, D.J.; BERLOCHER, S.H. (Eds.). **Endless Forms: Species and Speciation**. New York: Oxford Univ. Press, p. 234-244, 1998.
- MATEUS, R. P., NAZARIO-YEPIZ, N. O., IBARRA-LACLETTE, E., RAMIREZ LOUSTALOT-LACLETTE, M.; MARKOW, T. A. Developmental and transcriptomal responses to seasonal dietary shifts in the cactophilic *Drosophila mojavensis* of North America. **Journal of Heredity**, v. 11, p. 58-67, 2019.
- MAZZI, D.; KESÄNIEMI, J.; HOIKKALA, A.; KLAPPERT, K. Sexual conflict over the duration of copulation in *Drosophila montana*: why is longer better? **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p.132-144, 2009.
- MILLER, G. T.; PITNICK, M. Sperm-Female Coevolution in *Drosophila*. **Science**, v. 298, n. 5596, p.1230-1233, 2002.
- MØLLER, A. P. Testes size, ejaculate quality and sperm competition in birds. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 33, p. 273-283, 1988.
- MØLLER, A. P. Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals. **Functional Ecology**, v. 3, p. 91-96, 1989.
- MOORE, A. J., PIZZARI, T. Quantitative genetic models of sexual conflict based on interacting phenotypes. **The American Naturalist**, Chicago, v. 165, n. 5, p. 88-97, 2005.
- NEUBAUM, D. M.; WOLFNER, M. F. Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. **Genetics**, v. 153, p. 845-857, 1999.
- NGUYEN, T. T. X.; MOEHRING, A. J. A male's seminal fluid increases later competitors' productivity. **Journal of Evolutionary Biology**, v.31, n. 10, p.1572-1581, 2018.
- OLIVEIRA, G. F.; ROHDE, C.; GARCIA, A. C. L.; MONTES, M. A.; VALENTE, V. L. S. Contributions of dryland forest (Caatinga) to species composition, richness and diversity of Drosophilidae. **Neotropical Entomology**, v.45, p. 537-547, 2016.
- PARKER, G. A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Reviews**, v.45, p. 525-567, 1970.
- PARKER, G. A. Sexual selection and sexual conflict. In: Blum MS, Blum NA (eds) **Sexual selection and reproductive competition in insects**. Academic Press, New York, NY, 1979. p. 123-166.
- PARKER, G. A.; IMMLER, S.; PITNICK, S.; BIRKHEAD, T. R. Sperm competition games: Sperm size (mass) and number under raffle and displacement, and the evolution of P2. **Journal of Theoretical Biology**, v. 264, p. 1003-1023, 2010.

PAVAN, C.; DOBZHANSKY, T.; BURLA, H. Diurnal behavior of some neotropical species of *Drosophila*. **Ecology**, v. 31, p. 36–43, 1950.

PITNICK, S. Male size influences mate fecundity and remating interval in *Drosophila melanogaster*. **Animal Behaviour**, v. 41, p. 735-745, 1991.

PITNICK, S. Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*, **American Naturalist**, v. 148, p. 57-80, 1996.

PITNICK, S.; MARKOW, T. A. Large-male advantages associated with costs of sperm production in *Drosophila hydei*, a species with giant sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 91, n. 20, p. 9277-9281, 1994a.

PITNICK, S.; MARKOW, T. A. Male gametic strategies: sperm Size, testes size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila pachea* and its relatives. **The American Naturalist**, v. 143, n. (5), p. 785–819, 1994b.

PITNICK, S.; MARKOW, T. A.; SPICER, G. Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 23, p.10614-10618, 1995.

PITNICK, S.; MARROW, T.; SPICER, G. S. Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in *Drosophila*. **Evolution**, v. 53, p. 1804-1822, 1999.

PRICE, C. S. C.; KIM, C. H.; GRONLUND, C. J.; COYNE, J. A. Cryptic reproductive isolation in the *Drosophila simulans* species complex. **Evolution**, v. 55, p. 81–92, 2001.

RAFAEL V.; VELA D. *Drosophilayangana* sp. nov. un nuevo miembro del grupo repleta subgrupo inca (Diptera: Drosophilidae). **Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador**, v.71, p.129–139, 2003.

ROBE, L. J.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Radiation of the "Drosophila" subgenus (Drosophilidae, Diptera) in the Neotropics. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, p.310–321, 2010.

ROBE, L. J.; VALENTE, V. L. S.; LORETO, E. L. S. Phylogenetic relationships and macro-evolutionary patterns within the *Drosophila tripunctata* "radiation" (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, p. 138, 725–735, 2010.

SALZANO, F. M. Chromosomal polymorphism in two species of the *guarani* group of *Drosophila*. **Chromosoma**, v. 7, p. 39–50, 1955.

SAVALLI, U. M; FOX, C. W. The effect of male mating history on paternal investment, fecundity and female remating in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Functional Ecology**, v. 13, p. 169–177, 1999.

SCHMITZ, H. J.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE V. L. S. Assemblages of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) in mangrove forests: community ecology and species diversity. **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 100, p. 133–140, 2010.

SCHOEFL, G.; TABORSKY, M. Prolonged tandem formation in firebugs (*Pyrrhocoris apterus*) serves mate-guarding. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 52, p. 426–433, 2002.

SENE, F. M.; VAL, F. C.; VILELA, C. R.; PEREIRA, M. A. Q. R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura**, v. 33, p. 315-326, 1980.

SIMMONS, L. W.; FIRMAN, R. C.; RHODES, G.; PETERS, M. Human sperm competition: Testis size, sperm production and rates of extrapair copulations. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 297–302, 2004.

SKWIERZYŃSKA, A. M.; PLESNAR-BIELAK, A.; KOLASA, M.; RADWAN, J. Evolution of mate guarding under the risk of intrasexual aggression in a mite with alternative mating tactics. **Animal Behaviour**, v. 137, p. 75–82, 2018.

SNOOK, R. R.; BACIGALUPE, L. D.; MOORE, A. J. The quantitative genetics and coevolution of male and female reproductive traits. **Evolution**, v.64, n.7, p.1926-1934, 2005.

SNOOK, R. R.; MARKOW, T. A.; KARR, T. L. Functional nonequivalence of sperm in *Drosophila pseudoobscura*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11222-11226, 1994.

STOCKLEY, P.; GAGE, M.; PARKER, G. A.; MØLLER, A. P. Sperm competition in fishes: The evolution of testis size and ejaculate characteristics. **American Naturalist**, v. 149, p. 933–954, 1997.

TANUJA, M. T.; RAMACHANDRA, N. B.; RANGANATH, H. A. Incipient sexual isolation in the *nasuta-albomicans* complex of *Drosophila*: No-choice experiments. **Journal of Biosciences**, v. 26, p. 71–76, 2001.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: KING, R.C. (Org). **Invertebrates of Genetic Interest**. Plenum Press, New York, 1975. Cap.17, p. 421-469.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 233–247, 2006.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 311-317, 1992.

TORRES, F.R.; MADI-RAVAZZI, L. Seasonal variation in natural populations of *Drosophila* spp (Diptera) in two woodlond in the state of São Paulo, Brazil. **Iheringia Série Zoologia**, v. 96, p. 437 - 444, 2006.

TRIVERS, R. Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, G. B. (Org). **Sexual selection and the descent of man**. Aldine, New York, 1972. Cap. 7, p. 136-179.

WIGBY, S.; SIROT, L. K.; LINKLATER, J. R.; BUEHNER, N.; CALBOLI, F. C.; BRETMAN, A.; WOLFNER, M. F.; CHAPMAN, T. Seminal fluid protein allocation and male reproductive success. **Current Biology**, v. 19, p. 751–757, 2009.

WOLFNER, M. F. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. **Heredity**, v. 88, p. 85–93, 2002.

XUE, L.; NOLL, M. Dual role of the Pax gene paired in accessory gland development of *Drosophila*. **Development**, v. 129, p. 339–346, 2002.

# CAPÍTULO 16

## BENZOFENONA E OCTOCRILENO COMO POLUENTES EMERGENTES: UMA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL E DE SAÚDE PÚBLICA

*Data de aceite: 10/01/2022*

### **Diego Espirito Santo**

Acadêmico. Curso de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campus de Campo Mourão  
Campo Mourão, Paraná, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/4298214372751175>

### **Andrielle Karine Ribeiro Mendes**

Acadêmica. Curso de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campus de Campo Mourão  
Campo Mourão, Paraná, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/9289734963700278>

### **Débora Cristina de Souza**

Docente. Departamento Acadêmico de Biodiversidade e Conservação da Natureza (DABIC). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campus de Campo Mourão  
Campo Mourão, Paraná, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/9682347849778341>

### **Flávia Vieira da Silva Medeiros**

Docente. Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB). Programa de Pós-Graduação em Inovações Tecnológicas (PPGIT). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campus de Campo Mourão  
Campo Mourão, Paraná, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/8298141172237555>

### **Ana Paula Peron**

Docente. Departamento Acadêmico de Biodiversidade e Conservação da Natureza (DABIC). Programa de Pós-Graduação em Inovações Tecnológicas (PPGIT). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Campus de Campo Mourão. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA).

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campus de Francisco Beltrão  
Campo Mourão, Paraná, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3605560420792065>

**RESUMO:** O objetivo do capítulo foi caracterizar os poluentes emergentes quanto à estrutura, degradação e regulamentação ambiental, com enfoque em duas substâncias fotoprotetoras, benzofenona-3 (BP-3) e octocrileno (OC), destacando circunstâncias em concentrações em que foram encontradas no ambiente, danos associados e sua relação com as estações de tratamento de esgoto (ETEs). Os poluentes emergentes são compostos químicos sintéticos de estrutura complexa e baixa biodegradabilidade constantemente lançados no ambiente, onde persistem em níveis entre ng e  $\mu\text{g}$ , geralmente sem legislações de controle. A BP-3 foi observada em águas superficiais e potáveis em todo o mundo, com toxicidade comparada à de diversos metais e responsável pela morte de corais nas zonas costeiras. Em peixes, afetou a produção de ovos, incubação e testosterona, e em ratos, a densidade de espermatozoides e ciclo estral. Enquanto que em humanos, foram encontrados em amostras de urina, leite materno e plasma sanguíneo, e constatado seu potencial como desregulador endócrino ao interferir no período gestacional, crescimento fetal, células neuronais e doença de Hirschsprung, além de provocar alterações de peso em recém-nascidos. O OC, muito utilizado para estabilizar outros

fotoprotetores como a BP-3, também foi frequente em ambientes aquáticos e registrado em sedimentos e peixes com valores superiores aos de poluentes orgânicos persistentes, além de aparecer em água de rio, mar e tratada; em ensaios com zebrafish relacionado a alterações na transcrição de genes do cérebro e fígado; e encontrado em leite materno humano. Os métodos convencionais aplicados nas ETEs, como separação físico-química e lodo ativado, que se atém à remoção de sólidos suspensos e matéria orgânica, não são eficientes para sua eliminação. Dessa forma questiona-se a necessidade de um tratamento terciário, como os processos oxidativos avançados. Cabe o alerta de que novos levantamentos sejam realizados para que se obtenha dados sólidos dos níveis dos poluentes nos ecossistemas, além de ensaios com diferentes organismos-testes buscando concentrações seguras a serem emitidas no ambient.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fotoprotetores, contaminantes de caráter emergencial, ecossistemas, ser humano.

## BENZOPHENONE AND OCTOCRYLENE AS EMERGING POLLUTANTS: ENVIRONMENTAL AND PUBLIC HEALTH ISSUES

**ABSTRACT:** The objective of the chapter was to characterize the emerging pollutants in terms of structure, degradation and environmental regulation, focusing on two photoprotective substances, benzophenone-3 (BP-3) and octocrylene (OC), highlighting circumstances in concentrations where they were found in the environment, associated damages and their relationship with sewage treatment plants (ETEs). Emerging pollutants are synthetic chemical compounds of complex structure and low biodegradability that are constantly released into the environment, where they persist at levels between ng and  $\mu\text{g}$ , generally without control legislation. BP-3 has been observed in surface and drinking waters around the world, with toxicity compared to that of various metals and responsible for coral death in coastal areas. In fish, it affected egg production, incubation and testosterone, and in rats, sperm density and estrous cycle, while in humans, they were found in urine, breast milk and blood plasma samples, and their potential as an endocrine disruptor was found. by interfering with the gestational period, fetal growth, neuronal cells and Hirschsprung's disease, in addition to causing weight changes in newborns. OC, widely used to stabilize other sunscreens such as BP-3, was also frequent in aquatic environments and recorded in sediments and fish with values higher than those of persistent organic pollutants, in addition to appearing in river, sea and treated water; in zebrafish assays related to changes in brain and liver gene transcription; and found in human breast milk. Conventional methods applied in ETEs, such as physical-chemical separation and activated sludge, which focus on the removal of suspended solids and organic matter, are not efficient for their elimination. Thus, the need for a tertiary treatment, such as advanced oxidative processes, is questioned. It is worth warning that new surveys are carried out in order to obtain solid data on the levels of pollutants in ecosystems, in addition to tests with different test organisms seeking safe concentrations to be emitted into the environment..

**KEYWORDS:** Photoprotectors, emergency contaminants, ecosystems, human beings.

## 1 | INTRODUÇÃO

A proteção do meio ambiente não faz parte da cultura do homem – é dessa forma

que Souza e Souza (2016) abrem seu artigo sobre os perigos silenciosos da poluição; para elas, o fato do ser humano estar inserido na era da informação deveria implicar em um aumento da reflexividade social e das circunstâncias em que vive.

Porém, sob a ótica do Brasil, principalmente pós-2018, aos cuidados de um governo que articula o desmonte da agenda ambiental (SCANTIMBURGO, 2018) e de uma sociedade capitalista desigual (SILVA; FLAIN, 2017), o cenário é aterrador.

No tocante aos recursos hídricos, ao extrapolar a água para além da sua importância como elemento vital e entendê-la como bem de valor econômico e matéria-prima que tende a escassear em quantidade e qualidade (SOARES; LEÃO, 2015), suas características químicas, físicas e biológicas são constantemente afetadas por atividades como agricultura, indústria, mineração, descarte de resíduos, crescimento demográfico, urbanização e mudanças climáticas (BRASIL, 2014).

Através delas, uma série de compostos sintéticos tem o meio ambiente como destino, dentre eles fármacos, drogas ilícitas, cosméticos de beleza e produtos de higiene pessoal, aditivos alimentares, anticorrosivos, plastificantes e agrotóxicos, bem como hormônios e esteroides, que juntos constituem os poluentes emergentes (DIAS *et al.*, 2015; SOARES; SOUZA, 2020).

Os poluentes emergentes são substâncias de estrutura complexa e difícil degradação, cujos métodos convencionais de tratamento de água e esgoto no país não são eficientes para sua remoção (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015). Dessa forma, esses compostos são persistentes em água, solo e sedimentos, e são bioacumulativos em organismos vivos, em níveis entre ng e  $\mu\text{g}$ , e em países em desenvolvimento econômico, como o Brasil, essa classe de poluentes não está incluída em programas de monitoramento ou legislações de controle (SOUZA; SOUZA, 2016).

A Portaria do Ministério da Saúde nº 2914/11, que trata da potabilidade da água, e as Resoluções CONAMA nº 357/05, dos padrões de classificação dos corpos hídricos, e 430/11, do lançamento de efluentes, por exemplo, não dispõem de valores limites para o descarte desses poluentes (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

Assim, o objetivo do capítulo foi caracterizar os poluentes emergentes quanto à estrutura, degradação e regulamentação ambiental, com enfoque em duas substâncias fotoprotetoras, benzofenona-3 e octocrileno, destacando circunstâncias e concentrações em que foram encontradas, danos associados e sua relação com as estações de tratamento de esgoto.

## 2 | DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Histórico sobre a escassez e mal uso da água

A humanidade desempenha um papel importante sobre a ecologia e a geologia

do planeta, que Crutzen e Stoemer (2000) a descrevem de forma poética, ao colocá-la como agente da transformação do equilíbrio biogeoquímico, em competição com as forças naturais no impacto e modificação do sistema terrestre.

Em 2021, a combinação de um governo negacionista que sequer mascara seu desmonte da agenda ambiental (SCANTIMBURGO, 2018) com uma sociedade capitalista e desigual, em que o consumismo é incentivado pela grande oferta de produtos e uma publicidade apta em criar a necessidade na população de se adquirir novos bens, faz do presente um cenário desastroso (SILVA; FLAIN, 2017).

Ao entender a água não somente como um elemento vital, mas como um recurso de valor econômico para o desenvolvimento, e por isso, como uma matéria-prima que tende a se tornar escassa em quantidade e qualidade (SOARES; LEÃO, 2015), nota-se uma rede de atividades que afetam suas características químicas, físicas e biológicas, como agricultura, indústria, mineração, descarte de resíduos, crescimento demográfico, urbanização e mudanças climáticas (BRASIL, 2014).

Enquanto sua demanda dobra a cada 21 anos, a disponibilidade da parcela de água doce, que corresponde a 2,5% do total da água no planeta, caiu 62% mundialmente nos últimos 50 anos (CONSTANTINOV, 2010).

Quando a água é imprópria ou inadequada, ela é a causa de 3,1% dos óbitos anuais em todo o mundo, um montante de mais de 1,7 milhões de pessoas (BRASIL, 2014), principalmente atrelada à falta de tratamento e disposição correta de efluentes – nos índices nacionais mais recentes, a média de atendimento total com rede de esgoto era de 53,2% em 2018, com apenas 46,3% do efluente tratado (BRASIL, 2019).

Baseado em efeitos como toxicidade aquática, genotoxicidade, perturbação endócrina em animais selvagens e seleção de bactérias patogênicas resistentes, pesquisadores têm apresentado evidências de que um grupo de substâncias configura uma nova ameaça, os chamados poluentes emergentes (DIAS *et al.*, 2015; SILVA, 2012; JARDIM *et al.*, 2012; MONTAGNER *et al.*, 2013).

## **2.2 Poluentes emergentes: definição, estrutura química complexa, baixa degradação e falta de monitoramento e regulamento ambiental**

Diversos compostos sintéticos têm como destino o solo, corpos hídricos e sedimentos, entre os quais estão os fármacos (antibióticos, analgésicos e anti-inflamatórios, drogas de uso psiquiátrico, reguladores lipídicos e seus metabólitos,  $\beta$ -bloqueadores e contraceptivos), cosméticos de beleza e produtos de higiene pessoal (maquiagens, cremes, fragrâncias, protetores solares, repelentes de insetos e antissépticos), químicos industriais (aditivos, plastificantes, preservantes, anticorrosivos e artigos de limpeza), agrotóxicos, drogas ilícitas e hormônios e esteroides (HESPANHOL, 2015; SOARES; SOUZA, 2020).

Para Sauv e e Desrosiers (2014), tais classes de produtos aparecem sob a alcunha de contaminantes de preocupação emergente, e foram separados em três grupos: os



emergentes verdadeiros, que são novas espécies químicas descobertas com técnicas analíticas de alta sensibilidade, uma vez que são encontradas no ambiente na ordem de ng ou  $\mu\text{g}$  (BARBOSA, 2020; CALDAS *et al.*, 2019); os de interesse emergente, que mesmo estabelecidos, demandam mais estudos que demonstrem seus mecanismos de ação e estabeleçam relações de causa e efeito conclusivas a diferentes espécies de organismos (MONTAGNER *et al.*, 2013); e os emergentes conhecidos, relacionados àqueles de longa data para os quais se têm uma série de trabalhos demonstrando seus efeitos adversos ao ambiente e à saúde pública, mas que pouco ou quase nada foi feito em termos de regulação para seu uso.

Com estruturas químicas complexas, os poluentes emergentes são substâncias constituídas por longas cadeias carbônicas, normalmente acima de  $\text{C}_{10}$ , o que lhes confere baixa solubilidade em água. Dentre eles, os mais conhecidos quanto à estrutura química e efeitos adversos a diferentes organismos, bem como à dificuldade em removê-los do ambiente por métodos convencionais de tratamento, estão o corante amarelo tartrazina (FREITAS, 2012); o conservante antisséptico triclosan (TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014); o antibiótico eritromicina (RAMOS, 2016); e o microplástico politereftalato de etileno ou PET (COUCEIRO, 2019) (Figura 1).

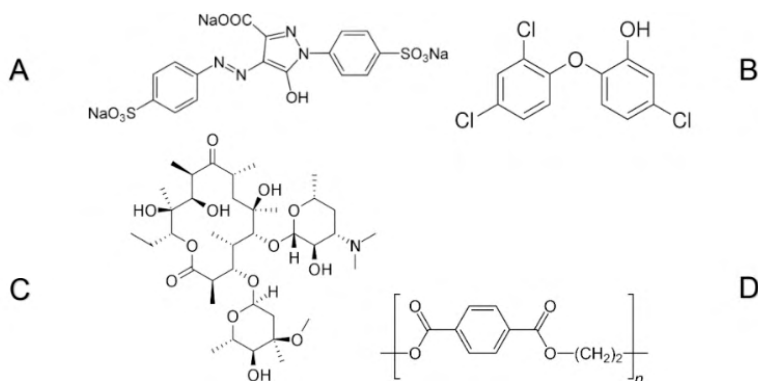


Figura 1 – Fórmula estrutural da tartrazina (A), triclosan (B) e eritromicina (C), e unidade química repetitiva do politereftalato de etileno (D)

Fonte: Adaptado de (A) FREITAS (2012); (B) TIBURTIUS; SCHEFFER (2014); (C) RAMOS (2016); (D) SILVA (2010)

Os microrganismos, capazes de degradar os compostos orgânicos naturais, não possuem as enzimas necessárias para a desintegração desses compostos sintéticos (CALVO-FLORES; ISAC-GARCÍA; DOBADO, 2018), o que afeta sua biodegradabilidade e os tornam persistentes no ambiente e bioacumulativos em organismos vivos (BADIA-FABREGAT *et al.*, 2012).

São contaminantes que ainda possuem como agravante o fato de não estarem

inclusos em programas de monitoramento de órgãos regulatórios de proteção ao meio ambiente e saúde no Brasil, assim como na maioria das regiões do mundo, ou inseridos em legislações de controle ambiental (SOUZA; SOUZA, 2016).

Em locais onde o tratamento de esgoto é incipiente, não haver limites seguros para o seu lançamento (MELO *et al.*, 2009) amplia seu contato com a população e a biota aquática porque, em geral, os mananciais que os recebem são os mesmos utilizados no abastecimento de água (FERNANDES, 2018), e os padrões de potabilidade, quando cumpridos, baseiam-se na toxicidade isolada desses poluentes e desconsideram sua interação com o meio (SODRÉ *et al.*, 2007).

A introdução de substâncias fotoprotetoras no ambiente, por exemplo, é cada vez maior devido ao aumento da incidência de sol, sobretudo nos países tropicais, atrelado ao maior acesso à informação acerca dos danos provocados por ela, o que tem feito com que o cuidado com a pele deixe de ser uma questão estética e passe a ser fator de saúde e bem-estar (LIMA *et al.*, 2019).

### 2.3 Fotoprotetores de pele e de superfícies inanimadas

O espectro de radiação que atinge a Terra compreende a zona ultravioleta (UV) (100-400 nm), visível (400-800 nm) e infravermelha (superior a 800 nm), e o de maior energia é aquele com menor comprimento de onda, ou seja, UV, que se divide em UVA (320 a 400 nm), UVB (290 a 320 nm) e UVC (100 a 290 nm) (CRISTA, 2012).

Como o intervalo UVC é absorvido pela camada de ozônio, as células do corpo humano estão expostas ao UVB, que alcança somente a epiderme e pode provocar vermelhidão e sensação de ardência; e ao UVA, que penetra em maior profundidade até a derme e estimula a melanina, responsável por atuar como um filtro solar natural, induzindo o que se conhece popularmente por bronzeamento (CARVALHO, 2019; GRANGER; BROWN, 2001; SAUCEDO; VALLEJO; GIMÉNEZ, 2020).

Uma exposição excessiva aos intervalos UVA e UVB pode acarretar em queimaduras com efeitos agudos e crônicos e alterar os mecanismos de proteção ao danificar gradativamente a integridade das fibras colágenas e elásticas, sendo capaz de ocasionar envelhecimento cutâneo precoce, patologias de fotossensibilidade e neoplasias, como câncer (CARVALHO, 2019; GRANGER; BROWN, 2001).

A tentativa de redução das radiações UVs ocorre por reflexão ou absorção: enquanto os filtros com capacidade reflexiva, denominados filtros de efeito físico ou inorgânicos, atuam através de um filme de partículas metálicas, como óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) (SEVERINO *et al.*, 2018), os absorventes, filtros de efeito químico ou orgânicos, contém substâncias específicas que reemitem a radiação em forma de calor (RAMOS *et al.*, 2016).

Os filtros orgânicos, além de constituírem a base dos protetores solares, estão presentes em artigos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, além de aplicados pelas

indústrias têxteis e da construção civil para evitar a fotodegradação de pigmentos e polímeros (RAMOS *et al.*, 2016), em produtos geralmente elaborados a partir da combinação de três a oito substâncias fotoprotetoras diferentes, equivalendo até 15% do seu peso final (FENT; ZENKER; RAPP, 2010).

Dentre essas substâncias estão a benzofenona, omeridamato e avobenzona, mais relacionadas à proteção UVA, e o octocrileno, cinamatos e ensulizol, com UVB. Esses compostos atingem o ambiente, como demonstrado na Figura 2, principalmente por meio de descargas de efluente industrial, lixiviado de aterro sanitário, atividades recreativas e ausência ou ineficiência de remoção nas estações de tratamento (GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2012).

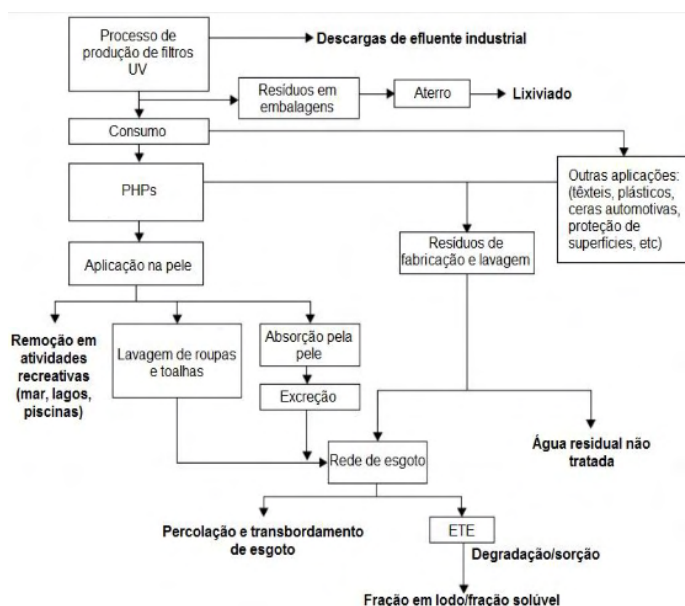


Figura 2 – Aporte dos filtros UV ao ambiente

Fonte: Adaptado de PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH (2014)

A benzofenona, portanto, é um dos filtros que fornece proteção UVA e UVB à pele e superfícies inanimadas ao absorver radiação entre 240 e 360 nm (ROGGIA *et al.*, 2014), mas tem seu uso restrito em seres humanos devido a efeitos colaterais como irritação dérmica e ocular, e pode ser derivada em outras moléculas como a benzofenona-3 (BP-3), amplamente empregada pelas indústrias em geral, dada sua estabilidade fotoquímica (KIM *et al.*, 2016; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

## 2.4 Benzofenona-3: composição química, produtos a qual faz parte e efeitos adversos ao meio ambiente

Também conhecida como oxibenzona, difenilcetona ou 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, a BP-3 tem fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$  (CAS 131-57-7) (Figura 3) e está em circulação no mercado desde 1970 (KIM; CHOI, 2014) em protetores solares, fragrâncias, shampoos, condicionadores de cabelos, cremes, repelentes de insetos, surfactantes como sabões e detergentes, óleos de banho (DOWNS *et al.*, 2016), tintas de parede, vernizes e plásticos, além de certificada como aditivo alimentar indireto nos Estados Unidos da América (EUA) (KIM, 2018).

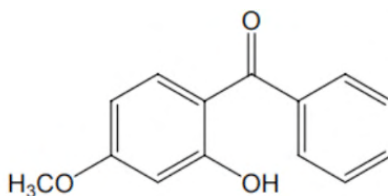


Figura 3 – Fórmula estrutural da benzofenona-3

Fonte: PAESE (2008)

Em sua forma pura, a benzofenona-3 tem aspecto cristalino e coloração amarelada, com peso molecular de 228,24 g/mol, densidade de 1,2 g/cm<sup>3</sup>, ponto de ebulição de 224 °C e fusão de 62 °C, com solubilidade em água de 3,7 mg/L a 20 °C (PAESE, 2008), o que de acordo com Ney (1995) é baixa por ser inferior a 10 mg/L.

Essa substância apresenta coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) de 3,79, constante adimensional indicadora de hidrofobicidade (MARGOT *et al.*, 2015), que para Rogers (1996), determina o caráter de um composto em ser acumulativo como sendo baixo se  $\log K_{ow} < 2,5$ ; médio se  $2,5 < \log K_{ow} < 4,0$ ; e alto se  $\log K_{ow} > 4,0$ .

A BP-3, cujo coeficiente situa-se de médio para alto, tem lenta biodegradação e baixa volatilização, o que favorece sua adsorção em sedimentos e sólidos em suspensão (GHAZIPURA *et al.*, 2017; PAESE, 2008; ROGGIA *et al.*, 2014), e faz dela o filtro orgânico com maior índice de detecção em amostras ambientais, principalmente em águas recreacionais durante o verão (PAREDES *et al.*, 2014).

Por isso, a busca por microrganismos capazes de degradá-la tem se intensificado, como apontaram Fagervold *et al.* (2021) em um estudo realizado com objetivo de identificar qualquer microrganismo degradante de BP-3 no lodo de estações de tratamento de águas residuais.

Esses autores identificaram uma cepa bacteriana, a *Sphingomonas wittichii* (BP14P), com a capacidade de usar a BP-3 como única fonte de energia e carbono, degradando-a completamente após 7 dias, mas ao testarem a cepa em outros nove filtros UV, sua aptidão

foi restrita à BP-3, ressaltando a complexidade das relações entre poluentes emergentes e microrganismos (FAGERVOLD *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, a BP-3 foi registrada por Wu *et al.* (2017) em amostras de água de fontes pontuais em Xangai, na China, em concentração de 30 ng/L, e por Mao *et al.* (2018), em águas superficiais de Singapura entre 2,3 e 122,3 ng/L.

No Brasil, Silva, Emídio e Marchi (2015), ao analisarem seis ETAs em várias cidades do Sudeste, obtiveram concentrações de BP-3 entre 18 e 115 ng/L, e destacaram que esses valores se mantiveram na mesma faixa em água bruta, tratada e clorada, sem que houvesse remoção no tratamento; e Caldas *et al.* (2019) encontraram essa substância em níveis ainda mais elevados no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, em águas superficiais (340 ng/L) e potável (290 ng/L).

Cabe ressaltar que, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 69 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2016), que dispõe sobre a lista de filtros ultravioletas permitidos em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes no Mercosul, é permitida concentração máxima de 10% de BP-3, sendo necessária advertência no rótulo caso o valor ultrapasse 0,5%.

Paredes *et al.* (2014), ao avaliarem o comportamento de alguns filtros UV, incluindo BP-3, quanto à toxicidade para organismos marinhos de três níveis tróficos (autotróficos, herbívoros e carnívoros), encontrados na faixa de dezenas ou mesmo centenas de ng/L, registraram que a espécie mais afetada foi a microalga *Isochrysis galbana*, com efeitos que se equipararam à toxicidade de metais como cobre, mercúrio, chumbo, cádmio e zinco; e também nas regiões costeiras, ela demonstrou ser prejudicial aos recifes de corais por induzi-los ao estresse oxidativo e expelir as algas de sua superfície, descolorindo e levando-os à morte (SCHNEIDER; LIM, 2019).

No corpo humano, essa substância foi identificada em amostras de leite materno (MOLINS-DELGADO *et al.*, 2018) e plasma sanguíneo (JANJUA *et al.*, 2008), e pesquisadores a enquadram ao lado dos desreguladores endócrinos por suspeitarem que possa, dentre outros efeitos, reduzir a duração do período gestacional (ZHONG *et al.*, 2020) e influenciar no crescimento fetal (FERGUSON *et al.*, 2018); causar a perda de células neuronais (WNUK *et al.*, 2018); e estar associada à doença de Hirschsprung, onde a ausência de células nervosas nos músculos do intestino grosso dificulta a passagem das fezes (DINARDO; DOWNS, 2019).

Em estudo encomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, a BP-3 foi encontrada em 96,8% das amostras de urina analisadas (CALAFAT *et al.*, 2008), o que pode ser atribuído ao seu potencial lipofílico, que faz com que até 10% seja absorvido pela pele em aplicações cutâneas e a maior parte seja excretada na forma original ou metabólitos (SCHNEIDER; LIM, 2019).

Ao também avaliar os efeitos da substância como interferente endócrino, Ghazipura *et al.* (2017) reuniram evidências de que em humanos, altos níveis de exposição a ela

podem estar relacionados com aumento e perda de peso em recém-nascidos, além de declínio no tempo gestacional. Em peixes, resultou em declínio na produção de ovos, incubação e testosterona; e em ratos, diminuiu a densidade de esperma nos machos e prolongou o ciclo estral ou cio nas fêmeas.

Comparado à BP-3, o octocrileno (OC) é um filtro orgânico que foi introduzido no mercado no final dos anos 1990 (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008), mas sua excelente fotoestabilidade faz com ele seja amplamente aplicado para estabilizar outros filtros oferecendo-lhes maior resistência à água (SCALIA; MEZZENA, 2009), resultando na ocorrência conjunta de BP-3 e OC em muitos dos pontos estudados (MIZUKAWA *et al.*, 2017; MOLINS-DELGADO *et al.*, 2018).

## 2.5 Octocrileno: composição química, produtos a qual faz parte e efeitos adversos ao meio ambiente

O OC é um filtro orgânico constituído por um éster do grupo dos cinamatos, de fórmula molecular  $C_{24}H_{27}NO_2$  (CAS 6197-30-4) (Figura 4), que em sua forma pura, é um líquido de aspecto viscoso e amarelado (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008).

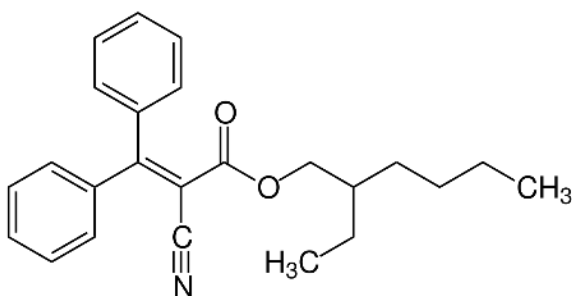


Figura 4 – Fórmula estrutural do octocrileno

Fonte: BROOKE; BURNS; CROOKES (2008)

O octocrileno tem peso molecular de 361,49 g/mol, densidade de 1,051 g/cm<sup>3</sup>, baixa solubilidade em água de 0,0038 mg/L a 25 °C, ponto de ebulição de 218 °C e fusão de -10 °C (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008; NEY, 1995).

Com ação entre 290 e 360 nm, ele cobre a maior parte dos comprimentos de onda UVB e pequenos comprimentos UVA, e assim como a BP-3, é regido pela RDC nº 69, podendo ser empregado em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes em concentração máxima de 10% (BRASIL, 2016).

O coeficiente de partição de 6,88 (log  $K_{ow}$ ) confere ao OC uma alta lipofilicidade e baixa biodegradabilidade em meio aquoso, o que facilita a absorção cutânea (GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2012), como demonstrado por Krause *et al.* (2012), que o registraram em 67% das amostras de leite materno humano analisadas em até 30,18

ng/g.

Isso faz com que, impulsionado pela resistência à degradação solar (GAGO-FERRERO *et al.*, 2013), o octocrileno seja frequentemente detectado em ambientes aquáticos, à exemplo da recente pesquisa de Barbosa (2020) em sedimentos superficiais na Baía de Paranaguá, Paraná, que o constatou em até 41,29 ng/g nas amostras analisadas.

Gago-Ferrero *et al.* (2013), ao estudar a faixa litorânea do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo, entre 1994 e 2009, demonstraram a frequência de OC em mamíferos aquáticos, principalmente no fígado de golfinhos *Pontoporia blainville* – dos 56 animais avaliados, 21 estavam contaminados, em níveis entre 89 e 782 ng/g, o que ultrapassou os valores esperados pelos pesquisadores de até 23 ng/g.

Molins-Delgado *et al.* (2018) analisaram músculos, brânquias e fígados de 11 peixes *Mugil liza* da urbanizada Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, utilizando técnicas avançadas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem (HPLC-MS/MS), e detectaram oito filtros UV e metabólitos, incluindo BP-3 e OC nos tecidos. As concentrações mais baixas estavam nos músculos e guelras (3,07-31,6 ng/g) e as mais significativas nos fígados (5,47-451 ng/g), levando a uma estimativa de ingestão diária dessas substâncias entre 0,3 e 15,2 ng/kg de peso corporal, maior do que valores relatados em peixes para poluentes orgânicos persistentes (POPs).

De forma complementar, Blüthgen *et al.* (2014) avaliaram OC quanto à bioacumulação e efeitos moleculares em machos adultos de zebrafish, e sugeriram alterações na transcrição de genes do desenvolvimento do cérebro e fígado.

Nove filtros UV orgânicos e três benzotriazóis também foram investigados em sedimentos de quatro rios urbanos afluentes do Iguaçu na região de Curitiba, Paraná, por Mizukawa *et al.* (2017), com técnicas LC-MS/MS, e BP-3 e OC foram alguns dos compostos predominantes, adsorvidos em concentrações entre 5,6 e 322,2 ng/g, e constituindo, na época, dados inéditos a respeito do acúmulo de benzotriazóis polares e filtros UV orgânicos lipofílicos em sedimentos no Brasil.

A presença de OC ainda foi observada por Buser *et al.* (2006) em tecido muscular de peixes *Salmo trutta*, coletados em sete rios da Suíça, em concentrações de até 2400 ng/g; na Espanha, em peixes (30 ng/g) (GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013) e em água tratada (170 ng/L) (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2012); e na Itália, em água de rio (112 ng/L) e mar (32 ng/L) (MAGI *et al.*, 2012), o que induz o questionamento de que os métodos convencionais adotados na maioria das estações de tratamento não são eficientes em eliminar esses poluentes.

## **2.6 Estações de tratamento: Ineficiência dos métodos convencionais, novas tecnologias e perspectivas futuras**

As ETEs, em geral, contam com tratamento primário, que consiste em etapas

de separação físico-químicas para remoção de sólidos suspensos, como decantadores e flutuadores, e tratamento secundário para remoção da matéria orgânica por processos biológicos como lodo ativado (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

A maioria dos poluentes, entretanto, tende a permanecer na fase aquosa, o que favorece sua mobilidade através da própria ETE e do corpo receptor, estando presentes em diversas matrizes, como visto (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; MELO *et al.*, 2009).

Dessa forma, é necessário introduzir uma etapa adicional, o que caracteriza um tratamento terciário, para desinfecção do efluente: diversas tecnologias têm sido investigadas com enfoque não somente em sua eliminação, mas na destruição do seu efeito potencial (FENG *et al.*, 2013). À princípio, esses tratamentos avançados são promissores e podem ocorrer de duas formas, por transferência de fase ou processos oxidativos (QUERO-PASTOR *et al.*, 2014).

Nos tratamentos que contemplam transferência de fase, os poluentes são transferidos de uma fase para outra sem que haja degradação – são exemplos disso os processos de adsorção e separação por membrana, como ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (FREIRE *et al.*, 2000).

Enquanto alguns processos oferecem desvantagens, como a adsorção, cujo caráter não destrutivo implica na necessidade de procedimentos auxiliares, orientados ao tratamento ou disposição das fases sólidas (VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELLO, 2015), as técnicas de nanofiltração e osmose reversa costumam apresentar eficiência elevada, mas o alto custo operacional envolvido e o baixo fluxo também dificultam o desenvolvimento de rotinas para grandes volumes (CRUZ *et al.*, 2010).

Os processos oxidativos, caracterizados pela capacidade de degradá-los, se dão através de métodos físicos, relacionados à incineração e queima dos resíduos, mas com liberação de gases para atmosfera; biológicos, com presença de microrganismos que convertem parte da matéria orgânica em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , se aeróbios, ou  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , se anaeróbios, mas sensível às condições ambientais e características do efluente; e químicos ou POA's, baseados no uso de oxidantes para mineralização dos poluentes, sendo aqueles que vêm ganhando mais atenção (SOARES, 2011; VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELLO, 2015).

Em contrapartida, como apontado por Martins e Montagner (2018), não se deve, de forma radical, desprezar por completo o papel dessas substâncias caracterizadas, uma vez que um alerta sobre os perigos associados a elas, desvinculado de seu contexto, pode exacerbar debates baseados em interpretações errôneas sobre o tema.

Por isso a importância de esclarecer que são poluentes que surgem em decorrência das atividades humanas no antropoceno, criados para combater problemas de saúde pública, elevar a expectativa de vida e garantir a oferta de alimentos, resultados de muita evolução de pesquisa farmacêutica e química, mas que acima de tudo, estão inseridos



em uma lógica de mercado que prega a urgência da lucratividade em detrimento de testes ecotoxicológicos profundos, o que os torna capazes de gerar novas doenças (MARTINS; MONTAGNER, 2018).

Não se trata, portanto, de introduzir corretivos ao sistema que criou a atual perturbação ecológica, mas de educar para sua transformação (BOFF, 2012), o que implica em superar a visão reducionista e mecanicista operante e assumir a cultura da complexidade, principalmente o desapego à percepção individualista, enxergando através da ótica do coletivo (SOUZA; SOUZA, 2016).

### 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao caracterizar os poluentes emergentes e exemplificá-los, nota-se um padrão de compostos químicos sintéticos onipresentes no cotidiano de qualquer pessoa, com longas cadeias carbônicas, elevado coeficiente de partição octanol-água e baixa volatilização e, portanto, difíceis de serem degradados de forma natural, e que acabam por persistir no ambiente e nos organismos vivos em concentrações entre ng e  $\mu\text{g}$ .

Apartir da confecção do capítulo, ressalta-se a importância da pesquisa tendo em vista o crescente uso de substâncias fotoprotetoras, uma das classes de poluentes emergentes, em decorrência do aumento da radiação solar e uma variedade cada vez maior de produtos, bem como seu contínuo lançamento nos corpos hídricos com pouca ou nenhuma remoção pelas estações de tratamento de esgoto, principalmente sob a perspectiva do Brasil, um país tropical com déficit de esgotamento sanitário e desprendimento governamental às pautas ambientalistas.

A revisão trouxe à tona que a benzofenona-3 e o octocrileno estão dispersos por todo o mundo em águas superficiais de rios e mares, água potável, sedimentos e seres vivos, em níveis entre 2,3 e 2400 ng/g ou ng/L, com toxicidade similar à de diversos metais, desencadeando efeitos como a morte de corais em zonas costeiras; interferência na transcrição de genes do cérebro e fígado, produção de ovos, incubação e testosterona em peixes; e densidade de esperma e ciclo estral em ratos.

Detectados também em fluidos humanos como urina, leite materno e plasma sanguíneo, ambas as substâncias têm potencial de atuar como desreguladores endócrinos ao afetar o período gestacional, crescimento fetal, células neuronais e doença de Hirschsprung, além de aumento e perda de peso em recém-nascidos.

Em se tratando de uma problemática relativamente recente, com trabalhos concentrados ao longo da última década, cabe o alerta de que levantamentos sejam realizados com frequência para que se construa um sólido banco de dados com o monitoramento dos níveis desses poluentes no ambiente.

Espera-se que novos ensaios sejam conduzidos com diferentes organismos-testes em busca de concentrações mais seguras, à fim de pressionar órgãos ambientais e demais

poderes relacionados quanto a um maior investimento em tecnologias de processos oxidativos avançados para as estações de tratamento e atualização das normas vigentes com limites prudentes ou, de maneira mais radical, a proibição e posterior substituição desses compostos por espécies menos nocivas.

## REFERÊNCIAS

BADIA-FABREGAT, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; GAGO-FERRERO, P.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; VICENT, T.; BARCELÓ, D.; CAMINAL, G. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid médium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p. 114-120, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.039>. Acesso em: 09 out. 2021.

BARBOSA, T. M. **Contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes em sedimentos superficiais de áreas costeiras do Brasil**. 2020. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2020. Disponível em: [http://www.oceanografia.ufba.br/TCC\\_Tamires\\_Matos\\_FINAL.pdf](http://www.oceanografia.ufba.br/TCC_Tamires_Matos_FINAL.pdf). Acesso em: 18 out. 2021.

BLÜTHGEN, N.; MEILI, N.; CHEW, G.; ODERMATT, A.; FENT, K. Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**, v. 476, p. 207-217, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.015>. Acesso em: 18 out. 2021.

BOFF, L. **Sustentabilidade: o que é, o que não é**. Petrópolis: Vozes, 2012. 200 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 69**. Brasília: Ministério da Saúde, 23 mar. 2016. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2016/rdc0069\\_23\\_03\\_2016.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2016/rdc0069_23_03_2016.pdf). Acesso em: 17 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 2.914**. Brasília: Ministério da Saúde, 12 dez. 2011. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso em: 07 out. 2021.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. **Plano Nacional de Saneamento Básico – PLANSAB**. Brasília: Ministério das Cidades, 2014. Disponível em: [https://antigo.mdr.gov.br/images/stories/ArquivosSNSA/PlanSaB/plansab\\_texto\\_editado\\_para\\_download.pdf](https://antigo.mdr.gov.br/images/stories/ArquivosSNSA/PlanSaB/plansab_texto_editado_para_download.pdf). Acesso em: 07 out. 2021.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto – 2018**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Regional, 2019. Disponível em: [http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico\\_AE2018.pdf](http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico_AE2018.pdf). Acesso em: 10 out. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 17 maio 2005. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_altrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf). Acesso em: 07 out. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº 430**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 13 maio 2011. Disponível em: <https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=114770>. Acesso em: 07 out. 2021.

BROOKE, D. N.; BURNS, J. S.; CROOKES, M. J. **UV-filters in cosmetics – prioritisation for environmental assessment**. Bristol: Environment Agency, 2008. 112 p.

BUSER, H.; BALMER, M. E.; SCHMID, P.; KOHLER, M. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 5, p. 1427-1431, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es052088s>. Acesso em: 18 out. 2021.

CALAFAT, A. M.; WONG, L.; YE, X.; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. L. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 7, p. 893-897, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.11269>. Acesso em: 08 out. 2021.

CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; MELLO, L. L.; CERQUEIRA, M. B. R.; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in Southern Brazil: data on 4-year monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180154>. Acesso em: 18 out. 2021.

CALVO-FLORES, F. G.; ISAC-GARCIA, J.; DOBADO, J. A. **Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties**. Germany: Wiley-VCH, 2018. 528 p.

CARVALHO, D. S. **A química dos protetores solares: uma proposta de texto de divulgação científica**. 2019. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2019. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/22445>. Acesso em: 08 out. 2021.

CONSTANTINOV, G. Novos paradigmas dos créditos ambientais. In: FARIAS, T.; COUTINHO, F. S. N. (Coord.). **Direito Ambiental: o meio ambiente na contemporaneidade**. Belo Horizonte: Fórum, 2010. 491 p.

COUCEIRO, D. C. DA S. **Definição de uma metodologia para extração e quantificação de microplásticos em areia de praia**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/34896>. Acesso em: 30 out. 2021.

CRISTA, D. M. A. **Degradação dos filtros UV 4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano e 2-etilhexil-4-metoxicinamato em águas cloradas**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2012. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/65479/2/24231.pdf>. Acesso em: 30 out. 2021.

CRUTZEN, P.; STOERMER, E. F. The Anthropocene. **Global Change Newsletter**, n. 41, p. 17-18, 2000. Disponível em: <http://www.igbp.net/download/18.316f18321323470177580001401/1376383088452/NL41.pdf>. Acesso em: 07 out. 2021.

CRUZ, L. H. DA; HENNING, F. G.; SANTOS, A. B. DOS; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1270-1274, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600010>. Acesso em: 17 nov. 2021.

DIAS, A. C. V.; GOMES, F. W.; BILA, D. M.; SANT'ANNA JR, G. L.; DEZOTTI, M. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41-47, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>. Acesso em: 13 out. 2021.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; GAGO-FERRERO, P.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2325-2333, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5560-8>. Acesso em: 18 out. 2021.

DINARDO, J.; DOWNS, C. A. Can oxybenzone cause Hirschsprung's disease?. **Reproductive Toxicology**, v. 86, p. 98-100, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.02.014>. Acesso em: 08 out. 2021.

DOWNS, C. A.; KRAMARSKY-WINTER, E.; SEGAL, R.; FAUTH, J.; KNUTSON, S.; BRONSTEIN, O.; CINER, F. R.; JEGER, R.; LICHTENFELD, Y.; WOODLEY, C. M.; PENNINGTON, P.; CADENAS, K.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 2, p. 265-288, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0227-7>. Acesso em: 08 out. 2021.

FAGERVOLD, S. K.; ROHÉE, C.; RODRIGUES, A. M. S.; STIEN, D.; LEBARON, P. Efficient degradation of the organic UV filter benzophenone-3 by *Sphingomonas wittichii* strain BP14P isolated from WWTP sludge. **Science of The Total Environment**, v. 758, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143674>. Acesso em: 1 nov. 2021.

FENG, L.; HULLEBUSCH, E. D. VAN; RODRIGO, M. A.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 944-964, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.061>. Acesso em: 17 out. 2021.

FENT, K.; ZENKER, A.; RAPP, M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1817-1824, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.005>. Acesso em: 07 out. 2021.

FERGUSON, K. K.; MEEKER, J. D.; CANTONWINE, D. E.; MUKHERJEE, B.; PACE, G. G.; WELLER, D.; MCEL RATH, T. F. Environmental phenol associations with ultrasound and delivery measures of fetal growth. **Environment International**, v. 112, p. 243-250, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.011>. Acesso em: 08 out. 2021.

FERNANDES, J. G. **Ocorrência de poluentes emergentes nos rios Pirai, Paraíba do Sul, Guandu e na água de abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro**. 2018. 106 f. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.97.2019.tde-28052019-142211>. Acesso em: 22 out. 2021.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas técnicas para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400013>. Acesso em: 17 out. 2021.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.35818/acta.v7i2.90>. Acesso em: 30 out. 2021.

GAGO-FERRERO, P.; ALONSO, M. B.; BERTOZZI, C. P.; MARIGO, J.; BARBOSA, L.; CREMER, M.; SECCHI, E. R.; AZEVEDO, A.; LAILSON-BRITO JR., J.; TORRES, J. P. M.; MALM, O.; ELJARRAT, E.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. First determination of UV filters in marine mammals. octocrylene levels in franciscana dolphins. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 5619-5625, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es400675y>. Acesso em: 10 out. 2021.

GAGO-FERRERO, P.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2597-2610, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6067-7>. Acesso em: 10 out. 2021.

GAGO-FERRERO, P.; MASTROIANNI, N.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1294, p. 106-116, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.037>. Acesso em: 18 out. 2021.

GHAZIPURA, M.; MCGOWAN, R.; ARSLAN, A.; HOSSAIN, T. Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity: a systematic review of human and animal studies. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 175-183, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.015>. Acesso em: 18 out. 2021.

GRANGER, K. L.; BROWN, P. R. The chemistry and HPLC analysis of chemical sunscreen filters in sunscreens and cosmetics. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 19, p. 2895-2924, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/JLC-100107346>. Acesso em: 08 out. 2021.

HESPANHOL, I. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. **Revista USP**, n. 106, p.79-94, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i106p79-94>. Acesso em: 13 out. 2021.

JANJUA, N. R.; KONGSHOJ, B.; ANDERSSON, A.; WULF, H. C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 4, p. 456-461, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>. Acesso em: 18 out. 2021.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. UMBUZEIRO, G. DE A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3-8, 2012. Disponível em: 10.1016/j.seppur.2011.06.020. Acesso em: 07 out. 2021.

KIM, B.; KWON, B.; JANG, S.; KIM, P.; JI, K. Major benzophenone concentrations and influence of food consumption among the general population in Korea, and the association with oxidative stress biomarker. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 649-655, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.009>. Acesso em: 09 out. 2021.

KIM, J. Y. U. **Degradação de filtros solares selecionados, ureia e desinfecção de água de piscina por fotoeletrocatalise combinada com ozonização**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara - SP, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153461>. Acesso em: 17 out. 2021.

KIM, S.; CHOI, K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. **Environment International**, v. 70, p. 143-157, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.015>. Acesso em: 08 out. 2021.

KRAUSE, M.; KLIT, A.; JENSEN, M. B.; SØEBORG, T.; FREDERIKSEN, H.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; SKAKKEBAEK, N. E.; DRZEWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 3, p. 424-436, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x>. Acesso em: 18 out. 2021.

LEITE, J. R. M.; AYALA, P. DE A. **Dano ambiental: do individual ao coletivo extrapatrimonial: teoria e prática**. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2010. 399 p.

LIMA, A. M. A.; TEIXEIRA, R. R.; SILVA, B. F. DA; SIQUEIRA, R. P.; SILVA, I. E. P. DA; SANTOS, E. G.; FERNANDES, M. C.; GONÇALVES, V. H. S.; BRESSAN, G. C.; MENDES, T. A. DE O.; PAULA, S. O. DE; COSTA, A. V.; SANTOS, M. H. DOS. Síntese e avaliação das atividades fotoprotetora, citotóxica e antiviral contra o zika vírus de derivados triazólicos da benzofenona. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 473-484, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170365>. Acesso em: 09 out. 2021.

MAGI, E.; CARRO, M. D.; SCAPOLLA, C.; NGUYEN, K. T. N. Stir bar sorptive extraction and LC-MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices. **Chromatographia**, v. 75, p. 973-982, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2202-z>. Acesso em: 18 out. 2021.

MAO, F.; YOU, L.; REINHARD, M.; HE, Y.; GIN, K. Y. Occurrence and fate of benzophenone-type UV filters in a tropical urban watershed. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 7, p. 3960-3967, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05634>. Acesso em: 1 nov. 2021.

MARGOT, J.; ROSSI, L.; BARRY, D. A.; HOLLIGER, C. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. **WIRES Water**, v. 2, n. 5, p. 457-487, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>. Acesso em: 07 out. 2021.

MARTINS, J. R. S.; MONTAGNER, C. C. Dos predadores pré-históricos aos contaminantes emergentes atuais: uma histórica de ameaças à humanidade. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 6, p. 1719-1732, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20180115>. Acesso em: 07 out. 2021.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100034>. Acesso em: 08 out. 2021.

MIZUKAWA, A.; MOLINS-DELGADO, D.; AZEVEDO, J. C. R. DE; FERNANDES, C. V. S.; DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguaçú watershed, Curitiba (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 18284-18294, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9472-9>. Acesso em: 1 nov. 2021.

MOLINS-DELGADO, D.; MUÑOZ, R.; NOGUEIRA, S.; ALONSO, M. B.; TORRES, J. P.; MALM, O.; ZIOLLI, R. L.; HAUSER-DAVIS, R. A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D.; DÍAZ-CRUZ, M. S. Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 451-459, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.033>. Acesso em: 1 nov. 2021.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F.; OHE, P. C. VON DER; UMBUZEIRO, G. A. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil – the need for regulatory actions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, 2013. Disponível em: [10.1007/s11356-013-2063-5](https://doi.org/10.1007/s11356-013-2063-5). Acesso em: 07 out. 2021.

NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores orgânicos: pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 190-223, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140015>. Acesso em: 09 out. 2021.

NEY, R. **Fate and transport of organic chemicals in the environment: a practical guide**. 2 ed. United States: Abs Consulting, 1995. 302 p.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos**. 2008. 213 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/13393>. Acesso em: 17 out. 2021.

PAREDES, E.; PEREZ, S.; RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; BEIRAS, R. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. **Chemosphere**, v. 104, p. 44-50, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.053>. Acesso em: 08 out. 2021.

PESTOTNIK, K.; KOSJEK, T.; HEATH, E. Transformation products of personal care products: UV filters case studies. In: LAMBROPOULOU, D. A.; NOLLET, L. M. L. (Ed.). **Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks**. United Kingdom: Wiley, 2014. 992 p.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>. Acesso em: 17 out. 2021.

QUERO-PASTOR, M.; VALENZUELA, A.; QUIROGA, J. M.; ACEVEDO, A. Degradation of drugs in water with advanced oxidation processes and ozone. **Journal of Environmental Management**, v. 137, p. 197-203, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.02.011>. Acesso em: 17 out. 2021.

RAMOS, L. F. **Fotocatálise heterogênea na degradação de eritromicina**. 2016. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/156549>. Acesso em: 30 out. 2021.

RAMOS, S.; HOMEM, V.; ALVES, A.; SANTOS, L. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. **Environmental International**, v. 86, p. 24-44, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.004>. Acesso em: 17 out. 2021.

ROGERS, H. R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **Science of The Total Environment**, v. 185, n. 1-3, p. 3-26, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05039-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05039-5). Acesso em: 30 out. 2021.

ROGGIA, I.; FERRONY, D.; ALVES, M. P.; LAPORTA, L. V.; FRIEDRICH, M.; SANTOS, M. R.; RUBIM, A.; PEIXOTO, S. C.; PAESE, K. Validação de metodologia analítica para a determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 223-232, 2014. Disponível em: <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/134>. Acesso em: 09 out. 2021.

SAUCEDO, G. M. G.; VALLEJO, R. S.; GIMÉNEZ, J. C. M. Efectos de la radiación solar y actualización em fotoprotección. **Anales de Pediatría**, v. 92, n. 6, p. 377.e1-377.e9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.04.014>. Acesso em: 08 out. 2021.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>. Acesso em: 07 out. 2021.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation in lipid microparticles of the UVA filter, butyl methoxybenzoylmethane combined with the UVB filter, octocrylene: effect on photostability. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 384-390, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9217-2>. Acesso em: 10 out. 2021.

SCANTIMBURGO, A. O desmonte da agenda ambiental no governo Bolsonaro. **Perspectivas**, v. 52, p. 103-117, 2018. Disponível em: <https://periodicos.fclar.unesp.br/perspectivas/article/view/13235>. Acesso em: 13 out. 2021.

SCHNEIDER, S. L.; LIM, H. W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 266-271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.06.033>. Acesso em: 08 out. 2021.

SEVERINO, P.; MESSTERMANN, A.; LIMA, T.; LIMA, F. DA C.; BARBOSA, T. C.; ANDRADE, L. R. M. DE; OLIVEIRA, D. M. DE L.; ANDRADE, L. N. Fotoenvelhecimento cutâneo e inovações em filtros solares. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 5, n. 1, p. 67-82, 2018. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/cadernobiologicas/article/view/5252>. Acesso em: 07 out. 2021.

SILVA, C. P. DA; EMÍDIO, E. S.; MARCHI, M. R. R. DE. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 19706-19715, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5174-3>. Acesso em: 1 nov. 2021.

SILVA, G. A. A descoberta do plástico e uma imersão no PET (politereftalato de etileno). **Jornal Eletrônico das FIVJF**, v. 2, n. 2, 2010. Disponível em: <https://www.jornaleletronicofivj.com.br/jefvj/article/view/579>. Acesso em: 30 out. 2021.

SILVA, M. B. O. DA; FLAIN, V. S. Capitalismo e consumismo: os desafios do consumo sustentável na sociedade contemporânea. **Revista da AJURIS**, v. 44, n. 143, p. 357-378, 2017. Disponível em: <http://ajuris.kinghost.net/OJS2/index.php/REVAJURIS/article/view/621>. Acesso em: 13 out. 2021.

SILVA, R. F. DA. **Determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras de esgoto bruto do Distrito Federal como suporte à realização de estimativas de consumo**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/12431>. Acesso em: 07 out. 2021.



SOARES, A. F. S.; LEÃO, M. M. D. Contaminação dos mananciais por micropoluentes e a precária remoção desses contaminantes nos tratamentos convencionais de água para potabilização. **De Jure**, v. 14, n. 24, p. 36-85, 2015. Disponível em: [10.5935/1809-8487.20150002](https://doi.org/10.5935/1809-8487.20150002). Acesso em: 13 out. 2021.

SOARES, A. F. S.; SOUZA, L. P. S. E. Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde. **Revista de Direito Sanitário**, v. 20, n. 2, p. 100-133, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9044.v20i2p100-133>. Acesso em: 08 out. 2021.

SOARES, T. **Avaliação da eficiência de tratamentos com radiação UV e UV/H2O2 na degradação de micropoluentes orgânicos**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) – Universidade Federal do Paraná, Universidade de Stuttgart, SENAI, Curitiba – PR, 2011. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/27581>. Acesso em: 17 out. 2021.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007. Disponível em: <https://ecotoxbrasil.org.br/revista/22/ecotoxicology-and-environmental-contamination/>. Acesso em: 08 out. 2021.

SOUZA, M. C. DA S. A. DE; SOUZA, G. K. A. DE. Poluentes emergentes: um perigo silencioso para o meio ambiente e um desafio para as novas tecnologias de informação e comunicação. **Direito Público**, v. 13, n. 72, p. 76-90, 2016. Disponível em: <https://www.portaldeperiodicos.idp.edu.br/direitopublico/article/view/2629>. Acesso em: 07 out. 2021.

TIBURTIUS, E. R. L.; SCHEFFER, E. W. O. Triclosan: destino no meio ambiente e perspectivas no tratamento de águas de abastecimento público. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1144-1159, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140075>. Acesso em: 30 out. 2021.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. A.; ZAMBELLO, E. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? – An overview and a discussion on perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 467-491, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.020>. Acesso em: 17 out. 2021.

WNUK, A.; RZEMIENIEC, J.; LASOŃ, W.; KRZEPTOWSKI, W.; KAJTA, M. Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic Status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 5059-5074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0704-2>. Acesso em: 08 out. 2021.

WU, M.; XIE, D.; SUN, R.; XIA, X.; LIU, W.; TANG, L. Benzophenone-type UV filters in surface waters: an assessment of profiles and ecological risks in Shanghai, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 235-241, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.013>. Acesso em: 1 nov. 2021.

ZHONG, Q.; PENG, M.; HE, J.; YANG, W.; HUANG, F. Association of prenatal exposure to phenols and parabens with birth size: A systematic review and meta-analysis. **Science of The Total Environment**, v. 703, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134720>. Acesso em: 08 out. 2021.

## MORFOLOGIA VEGETAL: UMA ABORDAGEM PALINOLOGICA DE *HIBISCUS ROSA-SINENSIS* L.

Data de aceite: 10/01/2022

### João Marcos Gomes Leite

acadêmico do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - IFTO  
<http://lattes.cnpq.br/9805753432461771>

### Maristela Tavares Gonçalves

Especialista em Metodologia da Educação do Ensino Superior. - IFTO  
<http://lattes.cnpq.br/7603332695026462>

### Alessandro Oliveira Silva

Mestre em Ciências Ecológicas – IFTO –  
*campus* Araguatins  
<http://lattes.cnpq.br/5259775910234201>

**RESUMO:** A acetólise é um processo químico que foi criado por Erdtman (1960), com o intuito de facilitar os estudos palinológicos através da limpeza minuciosa de grãos de pólen na estrutura que contém o gameta masculino vegetal. Esse método de limpeza submete os grãos de pólen a soluções ácidas para remoção da estrutura interna (intina), deixando apenas a parte externa (exina) facilitando assim a observação das características morfológicas estruturais. Auxiliando na identificação e classificação taxonômica de espécies vegetais, já que essas características permanecem geneticamente estáveis. O objetivo desse trabalho foi analisar a estrutura morfológica externa do grão de pólen de *Hibiscus rosa-sinensis* L. após a aplicação do tratamento com acetólise, o que auxilia em estudos botânicos. *Hibiscus rosa-sinensis* L. pertencente à família Malvaceae, um arbusto

lenhoso, com caule fibroso e ramificado, podendo chegar até 5 m de altura. Essa espécie é tipicamente tropical e símbolo do Havaí, onde apresentou ser uma espécie que se adequa ao processo de acetólise após ser submetida ao tratamento. No presente estudo foi utilizado o protocolo de acetólise fornecido pelo Laboratório de Estudos de Abelhas – LEA da UFMA (Universidade Federal do Maranhão) de São Luís (2017) por apresentar um resultado satisfatório em relação a tratamentos similares de limpeza.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hibisco, *Hibiscus rosa-sinensis* L., acetólise, grãos de pólen, Palinologia.

### PLANT MORPHOLOGY: A PALINOLOGICAL APPROACH TO *HIBISCUS ROSA-SINENSIS* L.

**ABSTRACT:** Acetolysis is a chemical process that was created by Erdtman (1960), in order to facilitate palynological studies through the thorough cleaning of pollen grains in the structure that contains the vegetable male gamete. This cleaning method subjects the pollen grains to acidic solutions to remove the internal structure (intin), leaving only the external part (exine), thus facilitating the observation of structural morphological characteristics. Assisting in the identification and taxonomic classification of plant species, as these characteristics remain genetically stable. The objective of this work was to analyze the external morphological structure of the pollen grain of *Hibiscus rosa-sinensis* L. after the application of treatment with acetolysis, which helps in studies concerning botany. The species chosen to be used in the process was *Hibiscus rosa-sinensis* L. of the genus *Hibiscus*

belonging to the Malvaceae family, a woody shrub with some characteristics, such as fibrous and branched, reaching up to 5 m in height, a typical plant tropical and symbol of Hawaii, where it presented itself as a species that suits the process after undergoing treatment. In the present research, the acetolysis protocol provided by the UFMA (Federal University of Maranhão) of São Luís (2017) was used for presenting a satisfactory result in relation to similar cleaning treatments.

**KEYWORDS:** Hibiscus, Hibiscus rosa-sinensis L., acetolysis, pollen grains, Palynology.

## 1 | INTRODUÇÃO

A palinologia é a área de estudos que analisa e identifica a morfologia dos grãos de pólen e esporos, com ênfase na fisionomia estrutural e escultural da parede dessas estruturas. Uma parte vegetativa microscópica possui na constituição da parede a substância orgânica mais resistente da natureza, a esporopolenina, presente na exina (SANTOS-SEREJO, 2010), podendo resistir a intempéries por milhares a milhões de anos, algo que desperta fascínio em pesquisadores e estudiosos. A exina é resistente tanto à digestão por animais quanto à decomposição por micro-organismos, podendo ainda manter sua forma mesmo com a exposição a ataques de substâncias ácidas. Aliando todas essas características, várias vertentes de estudos sobre a exina começaram a surgir para facilitar o entendimento das estruturas vegetativas ao decorrer do tempo (MONDRAGÓN, 2016).

No âmbito científico, podem-se observar áreas de estudos como a geopalinologia ou paleopalinologia que estuda os grãos de pólen nos horizontes do solo (camadas), a fim de reconstituir antigas áreas vegetativas (SOEJARTO, 1972). A melissopalinologia busca compreender o hábito alimentar de abelhas para determinar a importância de espécies vegetais para a produção de mel, o que mantém as futuras gerações de enxames apícolas (MONTEIRO, 2017), assim como a copropalinologia que identifica o pólen nos excrementos, com intenção de explorar a alimentação de animais (DEL FRETE, 2009). Conjuntamente, a palinotaxonomia auxilia na determinação de níveis de parentesco entre grupos de espécies, o que possibilita um estudo mais avançado em outras áreas (MILWARD-DE-AZEVEDO, 2010). Por isso, torna-se visível a grande utilidade do processo de remoção e limpeza de partes do grão, o que propicia de forma eficiente a visualização e o estudo de determinadas espécies vegetais. Logo, o objetivo desse trabalho foi analisar a reação do grão do pólen da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* L. quando submetido ao processo de acetólise determinando a funcionalidade e desempenho na remoção da intina, o que possibilita o estudo da identificação dessas estruturas vegetais microscópicas.

## 2 | REFERENCIAL TEÓRICO

O Hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), originário do continente asiático e pertence à família Malvaceae. Essa família botânica apresenta ocorrência de 70 gêneros e 750 espécies no Brasil (LORENZI, 2012) possuindo cerca de 5000 mil variedades e 300

espécies dentro do gênero *Hibiscus* (REIS, 2010), também pode ser separada por razões didáticas em dois grandes grupos, onde Lorenzi (2015) afirma que não existem nomes especiais para designá-los.

É considerada uma planta ornamental (LORENZI, 2012), podendo também ser usada como cercas vivas. Reis (2010) relata que seus aspectos paisagísticos indicam preferência por climas quentes, onde requer uma frequência na exposição a raios solares. Assim, pode-se ver a floração desse arbusto nos meses de julho a agosto dependendo da localização geográfica.

Possui algumas características morfológicas similares a outras espécies, sendo algumas dessas características visíveis a olho nu (Figura 1), como sua flor que é bissexuada (hermafrodita) com estames numerosos, uma característica da família Malvaceae. Logo, a flor exibe tanto a estrutura reprodutiva masculina quanto feminina. Uma característica bastante visível ao microscópio óptico é a presença de espinho no grão de pólen, constituída pela exina (REIS, 2010).

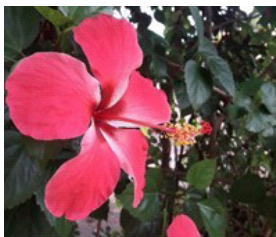


Figura 1 – Estruturas visíveis a olho nu de *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Fonte: autor, 2018

Os grãos de pólen são estruturas produzidas nas anteras (Figura 2) localizadas no androceu (estrutura reprodutiva masculina) que auxilia no transporte do gameta até o estigma (estrutura reprodutiva feminina). A composição do grão auxilia na proteção contra a desidratação e viabiliza a absorção de substâncias como a sacarose, o que permite a germinação do tubo polínico (SANTOS-SEREJO et al., 2010).



Figura 2 – Detalhe da antera com grãos de pólen de *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Fonte: autor, 2018

O grão é composto por duas estruturas (Figura 3), sendo a intina (parte interna) formada de celulose, e a exina (parte externa) formada por esporopolenina, onde se subdivide em nexina - camada mais densa, que dará origem a parte superficial, a sexina, responsável pelas características que permitem a identificação da espécie (GALVÃO et al., 2009), alguns grãos apresentam peculiaridades como a do hibisco, que é a presença de espinhos feitos da sexina. Outros grãos também irão possuir estruturas semelhantes (BARTH, 1980), que auxilia na fixação do grão tanto em agentes polinizadores (abelhas, morcegos e outros) quanto na adesão do estigma floral. Já a intina, é menos estudada na palinologia, tendo em vista que se trata de estudo voltado para estrutura, classificação e dispersão dos grãos de pólen (GALVÃO et al., 2009), mas por ser bem menos resistente, deve ser retirada com o uso de soluções ácidas.

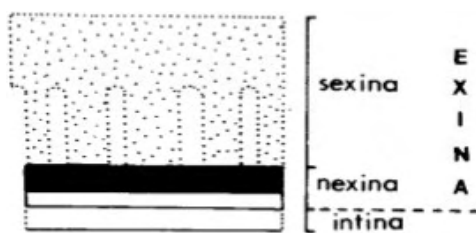


Figura 3 – Estruturas básicas do grão de pólen

Fonte: RAMALHO, 21-?

Os grãos possuem aberturas, que favorecem no desenvolvimento do tubo polínico, estrutura que irá levar o gameta do grão até o ovário (REDE DE CATÁLOGOS POLÍNICOS ONLINE, 2016). Essas aberturas variam quanto ao número, posição, forma e estrutura o que depende da espécie vegetal.

Sendo assim, é possível identificar no grão de pólen do *H. rosa-sinensis* L.

as aberturas (poros) e característica desses poros: quanto ao número de aberturas (Pantoporado), a forma do grão (Esferoidal), ornamentação da exina (Equinada), simetria do pólen (Radial), âmbito do pólen (Circular), e polaridade do pólen, sendo esta apolar (REDE DE CATÁLOGOS POLÍNICOS ONLINE, 2016).

### 3 I METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins - *campus* Araguatins, localizado no povoado Santa Teresa – km 05, a cerca de 5 km de distância de Araguatins (IBGE, 2010). O município de Araguatins está situado às margens do rio Araguaia (05°39'04"S e 48° 07'28"W) no extremo norte do estado do Tocantins.

A localização do *campus* possui o clima adequado para o desenvolvimento da planta o que possibilitou coletas durante os meses de novembro de 2017 a junho de 2018, totalizando sete meses de coletas do material polínico. A espécie, por ser de fácil identificação, não exigiu uma chave dicotômica para determiná-la, apresentando semelhança a uma variedade da espécie conhecida como Mimo-de-vênus. Sendo essa última, bastante difundida na região por também possuir características morfológicas que permitem fazer da espécie uma planta ornamental, sendo a pigmentação o diferencial entre ambas (TERRA DA GENTE, 2017).

A coleta dos grãos foi feita em diferentes turnos (matutino, vespertino e noturno) antes e depois da antese floral para que fossem coletados os grãos entre dispersão do pólen. Nas coletas, o material foi preservado em frasco Eppendorf contendo ácido acético glacial puro. Ademais, em outras coletas, o material botânico foi extraído ainda na flor para que fossem coletados os grãos de pólen antes mesmo da antese floral. No laboratório foi feita uma lavagem com ácido acético glacial puro para retirada dos grãos.

A análise foi feita no laboratório de microscopia do *campus*, em que foi usado o protocolo de acetólise fornecido pelo Laboratório de Estudos de Abelhas – LEA da UFMA de São Luís no Maranhão. Para o processo foi preparado a solução acetolítica, glicerina aquosa 50% e a gelatina glicerizada de Kaiser (BUCHERL, 1962) para imersão dos grãos limpos. Posteriormente foi feita a montagem das lâminas com esse material inoculado.

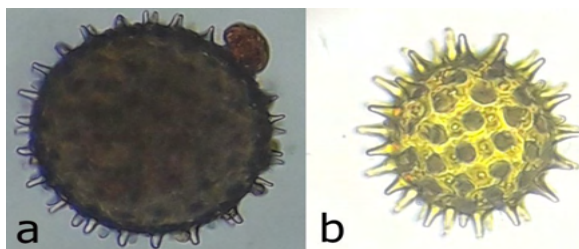
Em sequência rigorosa, as etapas foram: a) retirada do material polífero colocando-os em tubos de ensaio com cinco ml de ácido acético glacial puro; b) centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos; c) descarte do sobrenadante; d) acréscimos de 5 ml da solução acetolítica (4,5 ml de anidrido acético e 0,5 de ácido sulfúrico); e) o tubo foi colocado em banho-maria a 100°C por 2 minutos onde foi mantido um bastão de vidro dentro do tubo para que a solução fosse feita a homogeneização da mistura; f) nova centrifugação por 5 minutos e descarte do sobrenadante; g) adição de água destilada e 2 a 3 gotas de álcool etílico no tubo de ensaio contendo os grãos de pólen; h) centrifugação final por 5 minutos e

descarte do sobrenadante; i) adição de solução aquosa de glicerina a 50% com pausa de 30 minutos a 24 horas para encaminhando então o material para preparação das lâminas com intuito de serem permanentes e usadas como material didático.

Para a preparação das lâminas foram feitos cubos de gelatina glicerinada com o tamanho aproximado de um grão de arroz. Em seguida, os cubos de gelatina foram posicionados com o grão de pólen limpo em seu interior, manuseados com alças de platina feitas de agulha de injeção, fixadas em palitos de churrasco. O material já confeccionado sobre lâmina foi contornado com parafina em formato circular e, sobre esse círculo, fixada a lamínula para a visualização em microscópio óptico.

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através dos resultados obtidos foi possível realizar uma observação mais acurada dos grãos de pólen com a identificação de estruturas da exina como os espinhos feitos da sexina que caracteriza o grão da espécie e sua forma (Figura 4).



Grão de pólen sem o processo de limpeza com acetólise; b) Detalhe geral do pólen de *Hibiscus rosa-sinensis* L. após o processo de limpeza com acetólise

Figura 4 – Fotos do grão de pólen tiradas em microscópio antes e após a Acetólise

Fonte: autor, 2018

Oliveira e Dos Santos (2004), mostram em seu trabalho resultados semelhantes aos obtidos, o que mostra que é possível distinguir espécies a partir das estruturas dos grãos de pólen que são submetidos à acetólise. Assim como a descrição do Catálogo sistemático dos pólen das plantas arbóreas, confeccionado por Barth (1975), também foram encontradas as estruturas da exina, regularmente espinhosas, com espinhos pequenos e bases largas com o ápice ligeiramente arredondado, o que tem uma variação de acordo com a espécie.

#### 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o processo de acetólise, pode-se fazer uma análise minuciosa de estruturas que proporcionam a identificação de espécies já conhecidas e novas, como já mencionado, auxiliando no melhor entendimento da flora da região. Tendo em vista ainda que, a

diferença do grão de pólen antes da limpeza acetolítica e posterior à limpeza, apresentam uma diferença notória quando comparados, podendo destacar os detalhes estruturais do grão de pólen, permitindo a identificação da espécie.

Assim por possuírem estruturas geneticamente estáveis, os grãos só variam sua forma de acordo com as espécies fazendo da palinologia um estudo de extrema importância tanto em pesquisas quanto em botânica. Outra vertente seria o uso de lâminas permanentes como recurso didático, proporcionando uma melhor compreensão de alunos e pesquisadores.

Também, foi possível determinar que é necessária uma coleta minuciosa com intuito de evitar a contaminação por grãos de outras espécies ou estruturas que prejudicam a visualização dos grãos decorrente de polinização biótica ou abiótica. Outro ponto importante estabelecido foi que a coleta deve ser feita antes da antese floral com o botão ainda fechado, porque se evita contaminação por agentes polinizadores como as abelhas que levam outros grãos de pólen derivados de outras espécies.

Decerto, a confecção de lâminas deixa claro que é possível realizar coleções que possam ser disponibilizadas as escolas públicas da região para estudo e visualização, tornando assim as aulas de Ciências Biológicas mais interessantes e didáticas.

## REFERÊNCIAS

ANDREATA, H. P.; TRAVASSOS, O. P. **Glossário de Botânica**. Rio de Janeiro: Ed. Universitária Santa Úrsula, 1994. 134p. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/herb/glossario.pdf>> Acesso em: 16 jul. 2018.

BARTH, Ortrud Monika. Morfologia do pólen e palinotaxonomia do gênero *Kielmeyera* (Guttiferae). **Rodriguésia**, v. 32, p. 105-133, 1980.

BARTH, Ortrud Monika. Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional: XVIII-Malvaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 73, p. 1-18, 1975.

BUCHERL, W. **Técnica microscópica**. 3.ed. São Paulo: Polígono, 1962.

DEL PRETE, Carlo et al. Studi sulla flora e vegetazione della Riserva Naturale Integrale dell'Isola di Montecristo Arcipelago Toscano-Il contingente pteridofitico. In: **104° Congresso Nazionale Società Botanica Italiana**. Grafica Sannita, 2009. p. 220-220.

GALVÃO M. N.; PEREIRA, A. C. M.; ESTEVES, V. G.; ESTEVES, R. L. **Palinologia de espécies de Asteraceae de utilidade medicinal para a comunidade da Vila Dois Rios, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil**. Rio de Janeiro. Acta bot. bras. 23(1): 247-258. 2009.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002**. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: síntese de indicadores 2010. Rio de Janeiro: IBGE. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1998.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil**. 2. Ed. São Paulo, 2015.



LORENZI, H.; SOUSA, V. C. **Botânica Sistemática**. 3. Ed. São Paulo, 2012.

MARTINS, V. F. **Aspectos da reprodução de Angiospermas**. 21-?. Disponível em: <<https://www2.ib.unicamp.br/profs/fsantos/bt682/2013/Aula8/Aula8-Reproducao.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

MILWARD-DE-AZEVEDO, Michael e Alvim et al. Palinotaxonomia de *Passiflora L.* subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 133-145, 2010.

MONDRAGÓN, Alcides. Caracterización morfológica de la exina del polen de siete especies del género *Sterculia L.* **Bioagro**, v. 18, n. 3, p. 139-143, 2006.

MONTEIRO, Ricardo dos Santos. USO DA MELISSOPALINOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DO MEL DE *Melipona scutellaris L.*, 1811. 2017.

OLIVEIRA, Paulino Pereira; DOS SANTOS, Francisco de Assis Ribeiro. Morfologia polínica de *Hibiscus pernambucensis* Arruda e *Hibiscus tiliaceus L.* (Malvaceae). **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 203-211, 2004.

RAMALHO, M. **Analisando o grão de pólen**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/pesquisa/palinologia.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

SOEJARTO, Doel D.; FONNEGRA, R. Polen: Diversidad en formas y tamaños. **Actualidades Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 2-13, 1972.

**Rede de catálogos polínicos online**. Disponível em: <<http://chaves.rcpol.org.br/>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

REIS, F. **Hibisco (*Hibiscus syriacus L.*)**. Plantas de chaves. 2010. Disponível em: <<http://plantasdechaves.blogspot.com/2010/09/hibisco-hibiscus-syriacus-l.html>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

RUBIRA, T. H. S.; SANTOS, J. F.; VIANA, A. C. **O uso do Hibiscus Sabdariffa como alimento funcional**. Conexão Eletrônica – Três Lagoas, MS – Volume 13 – Número 1 – Ano 2016.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L. SOUZA A. S.; COSTA M. A. P. C. **Estudo da morfologia polínica e viabilidade de pólen de bananeira**. 2010. 2 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. 2010.

Terra da gente. **Mimo-de-vênus**. 2017. Disponível em: <<http://faunaeflora.terradagente.g1.globo.com/flora/arbustos-tuberculos/NOT,0,0,1223962,Mimo-de-venus.aspx>> Acesso em: 23 de jul. 2018.

# CAPÍTULO 18

## CONSIDERAÇÕES SOBRE O FITOPLÂNCTON DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO: GRUPOS FUNCIONAIS DE REYNOLDS (GFR) E IMPLICAÇÕES PARA OS MÚLTIPLOS USOS DA ÁGUA

*Data de aceite: 10/01/2022*

*Data de submissão: 08/10/2021*

**Carlos Vinícius da Silva Cabral**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina - Pernambuco

**Vladimir de Sales Nunes**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina - Pernambuco

**Angélica Barbosa Jericó**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina - Pernambuco

**Mávani Lima Santos**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina – Pernambuco

**Nadiane Nunes da Silva**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina – Pernambuco

**Caio Carvalho Novais de Moraes**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina - Pernambuco

**Gabriel Luiz Celante da Silva**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina – Pernambuco

**Bruno César Silva**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pró-Reitoria de Planejamento e Desenvolvimento Institucional  
Petrolina - Pernambuco

**Benoit Jean Bernard Jahyny**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina – Pernambuco

**René Geraldo Cordeiro Silva Júnior**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Medicina Veterinária  
Petrolina – Pernambuco

**Edson Gomes de Moura Júnior**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental

**Ludwig Lima Nunes**

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas  
Petrolina - Pernambuco

**RESUMO:** O que se conhece como algas compreende uma ampla variedade de organismos aquáticos e fotossintetizantes, com diversas manifestações morfológicas e grande importância ecológica e econômica. Atuando como produtores primários em ecossistemas aquáticos e sendo responsáveis por quase metade da produção do oxigênio na biosfera, as algas do fitoplâncton são cruciais para a compreensão da biodiversidade e esforços de conservação de corpos hídricos de múltiplos usos. Uma técnica utilizada para auxiliar em

estudos ecológicos do fitoplâncton é a abordagem dos Grupos Funcionais de Reynolds (GFR), que agrupa determinados táxons de algas em categorias funcionais ou códons definidos com base na afinidade e sensibilidade dos organismos a um conjunto de características ambientais. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou determinar os GFR ocorrentes em um ponto amostral do rio São Francisco em Petrolina, Pernambuco, Brasil, com base no levantamento taxonômico do fitoplâncton do local. Após a coleta do material utilizando rede de plâncton com malha de 20  $\mu\text{m}$  e identificação dos organismos e GFR com base na literatura especializada, obteve-se 14 códons dos GFR. Os códons identificados, com base em suas características definidoras, reforçaram a característica do ponto de coleta como um ponto lótico de estado trófico de mesotrófico a eutrófico. Além disso, a presença do código  $L_M$ , representado pela co-ocorrência dos gêneros *Ceratium* e *Microcystis*, acende um importante alerta visto o potencial destes táxons em causar florações prejudiciais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Algas; ecologia; levantamento taxonômico; *Microcystis*; eutrofização.

## CONSIDERATIONS ON THE PHYTOPLANKTON OF THE SUB-MIDDLE SÃO FRANCISCO RIVER: REYNOLDS FUNCTIONAL GROUPS (RFG) AND IMPLICATIONS ON THE MULTIPLE USES OF WATER

**ABSTRACT:** What is known as algae comprises a wide variety of aquatic and photosynthetic organisms, with different morphological manifestations and great ecological and economic importance. Acting as primary producers in aquatic ecosystems and accounting for nearly half of the biosphere's oxygen production, phytoplankton algae are crucial to understanding the biodiversity and conservation efforts for multipurpose water bodies. One technique used to aid in ecological studies of phytoplankton is the Reynolds Functional Groups (RFG) approach, which groups certain algal taxa into functional categories or coda defined based on the organisms' affinity and sensitivity to a set of environmental characteristics. From this perspective, the present study aimed to determine the RFG occurring in a sampling point of the São Francisco river in Petrolina, Pernambuco, Brazil, based on the taxonomic survey of the phytoplankton at the site. After collecting the material using a 20  $\mu\text{m}$  plankton net and identifying the organisms and RFG based on the specialized literature, 14 RFG coda were obtained. The identified coda, based on their defining characteristics, reinforced the characteristic of the collection point as a lotic point of trophic state ranging from mesotrophic to eutrophic. Furthermore, the presence of the  $L_M$  codon, represented by the co-occurrence of the genera *Ceratium* and *Microcystis*, raises an important warning given the potential of these taxa to cause harmful blooms.

**KEYWORDS:** Algae; ecology; taxonomic survey; *Microcystis*; eutrophication.

## 1 | INTRODUÇÃO

E, espalhados por ali, alguns em suas máquinas de guerra tombadas (...), estavam os marcianos – mortos! -, derrotados pela bactéria (...); mortos, depois de todas as armas dos homens falharem, pelas coisas mais insignificantes que Deus, com sua sabedoria, colocara nesta Terra (WELLS, H. G., 1898, p. 165).

No início deste capítulo que tratará acerca das algas continentais microscópicas

do Rio São Francisco, evocamos o trecho acima, retirado do clássico *Guerra dos Mundos*, publicado ainda no fim do século XIX pelo célebre escritor britânico H. G. Wells, para ilustrar como a diversidade do mundo microscópico permeia e faz parte, desde há muito, do imaginário humano. Na citada obra, os invasores marcianos, após semear o caos pela Terra em uma destruidora invasão interplanetária, terminam sua belicosa jornada destruídos por “simples” bactérias, que não haviam sido levadas em conta na elaboração da ambiciosa estratégia de guerra.

A adequação desta citação encontra guarida no fato de que o que se conhece de maneira genérica como “algas”, são, na verdade, uma variedade de organismos amplamente distintos em morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia. Como exemplificam BICUDO & MENEZES (2006), “alga”, no contexto taxonômico, é meramente um termo de uso popular, tal qual o termo “palmeira” é utilizado para denominar árvores distintas, ou “grama” é aplicado a um número vasto das mais diversas gramíneas. Contudo, essa nomenclatura tem validade na ecologia, visto que engloba grupos taxonômicos diversos em um grupo coerente de organismos aquáticos, quase todos clorofilados, e com órgãos de reprodução jamais envolvidos por um conjunto ou tecido de células estéreis. Dessa forma, consideram-se como algas desde diminutas bactérias fotossintetizantes unicelulares (Cyanobacteria) a formas oceânicas de Eukaryota multicelulares com dezenas de metros de comprimento (BICUDO & MENEZES, 2006).

O termo “ALGAE” aparece, pela primeira vez, na obra *Species Plantarum*, publicada pelo naturalista sueco Carl Linnaeus (ou Lineu) em 1753, sendo o primeiro trabalho de botânica a aplicar o sistema de nomenclatura binomial para a classificação de organismos (LINNAEUS, 1753). Dos organismos classificados por Lineu, apenas cinco gêneros e 48 espécies constituem o que hoje se conhece por algas (BICUDO & MENEZES, 2006). Em contraste, a maior base de dados internacional acerca da taxonomia, nomenclatura, e distribuição de algas, a *AlgaeBase*, conta atualmente com 163.687 espécies catalogadas (GUIRY & GUIRY, 2021).

A ideia de algas como organismos predominantemente pigmentados, capazes de realizar fotossíntese, naturalmente evoca sua similaridade (que, de fato, existe) com as embriófitas, tradicionalmente chamadas de plantas terrestres. Contudo, especialmente quando se explora a ampla diversidade morfológica das algas microscópicas, formada em porção mais significativa pelo fitoplâncton (algas que medem de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ ), não raro se pode cair em uma tentadora definição rápida das algas como “pequenas plantas aquáticas”, o que é impreciso pelo fato de que muitos desses organismos microscópicos que ocorrem em todas as classes de ambientes aquáticos, entre outras tantas características, se movem ativamente, por vezes apresentam flagelos, e alguns, além da fotossíntese (quando não em sua total ausência), também apresentam alimentação heterotrófica, utilizando alimento orgânico e formas de carbono inorgânico, caracterizando a mixotrofia (RAVEN, 2007). Já as “plantas aquáticas”, também chamadas de “macrófitas aquáticas”, correspondem

a um grupo ecológico que compreende organismos fotossintetizantes visíveis a olho nu que habitam permanentemente ou por alguns meses do ano, parcialmente ou totalmente, ambientes de água doce ou salobra (ESTEVES & THOMAZ, 2012).

De fato, o fitoplâncton ocorre na coluna d'água de corpos hídricos em concomitância com outro tipo de plâncton, o zooplâncton, este composto por organismos heterotróficos, também de alta variação morfológica, frequentemente de rápido movimento, e que, por vezes, se alimentam do fitoplâncton (RAVEN, 2007). Portanto, uma associação intuitiva e desavisada das algas, destacadamente as fitoplanctônicas, com formas ou estruturas animais, não é algo raro de ocorrer, principalmente ao observar espécimes vivos ao microscópio óptico. Charles Darwin, em *A Origem das Espécies*, relata o seguinte no capítulo XV da referida obra:

Se considerarmos as duas divisões principais – isto é, os reinos animal e vegetal –, algumas formas inferiores possuem um caráter de tal forma intermediário que os naturalistas têm discordado sobre o reino ao qual elas deveriam pertencer. Como assinalou o professor Asa Gray, “os esporos e outros corpos reprodutores de muitas algas inferiores podem ter, em princípio, uma característica animal, e, mais tarde, indiscutivelmente, uma existência vegetal” (DARWIN, 1859, p. 549).

Para além de sua notória diversidade morfológica, um outro importante fator sobre as algas que merece o devido destaque é, sem dúvida, sua ampla distribuição. Esses organismos ocorrem em uma grande variedade de ambientes em todas as latitudes, longitudes e altitudes, sendo encontrados em rios, lagos, represas, açudes, bem como sobre o solo, rochas, troncos de árvores e em tanques de bromélias, entre outros locais (BICUDO & MENEZES, 2006; FRANCESCHINI *et al.*, 2010). Como notavelmente assinalam BICUDO & MENEZES (2006), não existe água em que não ocorram algas.

Finalmente, mas de forma nada menos importante, a relevância ecológica das algas, principalmente do fitoplâncton, encontra sua representação mais crucial para além do papel fundamental de produtores primários em ecossistemas aquáticos, formando a base do fluxo energético em vários níveis tróficos (MBONDE *et al.*, 2002). Esses organismos são importantes na produção de oxigênio através do processo de fotossíntese, oxigenando as águas e sendo responsáveis por quase metade de toda a produção de oxigênio na biosfera, além de serem um componente significativo do ciclo do carbono (THÉBAULT *et al.*, 2009).

A composição do fitoplâncton em diferentes ecossistemas aquáticos é dinâmica e muda de um ecossistema para outro tanto em composição de espécies quando na distribuição de biomassa. Assim, mudanças nesses parâmetros podem ser indicativos de mudanças ambientais nos ecossistemas aquáticos, onde parte significativa da produção biológica é realizada pelas algas (MBONDE *et al.*, 2002).

Visto que o fitoplâncton reage prontamente a mudanças ecológicas, esses organismos podem ser utilizados como indicadores do estado trófico dos corpos hídricos onde ocorrem, oferecendo um valioso indicativo da qualidade da água. (PARMAR,

RAWTANI & AGRAWAL, 2016; TRIPATHI & GAUR, 2021). Contudo, quando o ecossistema aquático é alterado, principalmente pela entrada de efluentes ricos em nutrientes, há em tese um estímulo ao rápido crescimento de espécies fitoplânctônicas e de macrófitas aquáticas, levando, em casos extremos, ao desenvolvimento de florações mono específicas de cianobactérias, as “algas azuis” (OBERHOLSTER, BOTHA & ASHTON, 2009). Nessa perspectiva, encontra grande aplicabilidade a abordagem dos grupos funcionais no estudo do fitoplâncton, atualmente chamada de Grupos Funcionais de Reynolds (GFR) em homenagem idealizador dessa metodologia (REYNOLDS *et al.*, 2002).

A partir da definição original de Reynolds, FRANCESCHINI *et al.* (2010) sintetizaram a definição de grupo funcional como um grupo de espécies que respondem igualmente a um conjunto de condições ambientais, compartilhando adaptações para sobrevivência e dominância quando submetidos a um mesmo gradiente ambiental. Dessa forma, a abordagem dos GFR pode ser utilizada para detectar padrões na distribuição e dinâmica das populações do fitoplâncton, relacionando-as com mudanças no ambiente.

Os GFR permitem classificar a diversidade do fitoplâncton em categorias ecológicas (códons) definidas com base na ideia de que um habitat com determinados parâmetros em relação a disponibilidade de luz ou nutrientes, por exemplo, é mais provável de ser habitado por espécies com as adaptações próprias para este ambiente que por espécies que não possuem tais adaptações, ou sensíveis a essas características. Nesse sentido, a abordagem dos GFR permite, inclusive, potencialmente prever quais espécies podem ocorrer em determinado ecossistema com base em suas características limnológicas e vice-versa, conferindo importância prática à abordagem dos GFR na gestão de recursos hídricos, especialmente importante em áreas de múltiplos-usos (NUNES *et al.*, 2021).

Apesar da relativa facilidade e aplicação intuitiva da abordagem, erros em sua interpretação não são raros de encontrar na literatura. Nesse sentido, um importante estudo voltado exclusivamente à análise dos erros mais comuns e à definição detalhada de cada código dos GFR foi conduzido em 2008 por PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES (2008).

Entre os mais extensos corpos hídricos do Brasil, o rio São Francisco é o maior rio dentre aqueles inseridos totalmente dentro do território nacional. Sua bacia hidrográfica corresponde a 8% do território nacional, nascendo no estado de Minas Gerais e percorrendo 505 municípios nos estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, além do Distrito Federal (CBHSF, 2021). Apesar de divergir em diferentes trabalhos na literatura, o estudo conduzido por SILVA *et al.* (2003) oferece uma extensão variável do rio São Francisco entre 2.814 e 2.863 km, a depender da referência geográfica das nascentes.

A população no entorno no rio São Francisco passa dos 15 milhões de pessoas, e sua maior concentração está na região fisiográfica do Alto São Francisco. Cerca de 54% da bacia hidrográfica está localizada na região semiárida, e três biomas são abrangidos ao longo de sua extensão: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, além do ecossistema estuarino

do rio. O território da região fisiográfica do Submédio São Francisco se divide em 59,4% de área representada por Pernambuco, 39,5% pela Bahia, e 1,1% por Alagoas (CBHSF, 2021).

Os municípios de Juazeiro (Bahia) e Petrolina (Pernambuco) estão localizados no centro do Submédio São Francisco, na região Nordeste do Brasil. O clima é semiárido quente e a temperatura média anual é de 24,8 °C. Se considerada conjuntamente, a população das duas cidades ultrapassa meio milhão de habitantes. Além disso, a região é um importante polo nacional de fruticultura irrigada, aproveitando-se da localização estratégica às margens do Rio São Francisco (PMP, 2021).

Uma das descrições detalhadas mais longevas da região é fornecida pelo relato da famosa expedição dos naturalistas alemães Spix e Martius, realizada entre 1817 e 1820. Sobre o rio São Francisco, eles escreveram:

O rio São Francisco separa as capitanias de Bahia e Pernambuco (...); a própria região em que nos achávamos exercia influência estimulante nos nossos ânimos, pois o majestoso São Francisco derrama aqui não só todas as bênçãos de um grande rio, mas também faz lembrar ao viajante alemão o pátrio Reno (...). O rio, durante nossa estada, tinha muito pouca água, devido à demorada seca precedente, nas regiões do sul, e este ano não havia transbordado (...). A agricultura não parece ser tão favorecida, quanto na região do sul, que o rio atravessa (...). Os produtos locais provêm da criação de gado bovino e equino (SPIX, 2017, p. 310-311).

A partir do retrato feito pelos naturalistas e em comparação com o cenário atual, percebe-se que as atividades se inverteram depois dois séculos: a agricultura é a mais significativa atividade econômica da região, sendo esta, como previamente mencionado, o maior polo de fruticultura irrigada do país (CORREIA, ARAUJO & CAVALCANTI, 2001). Além disso, a atividade de criação de gado bovino na região é hoje extremamente reduzida, e o rio São Francisco, após a construção da Barragem de Sobradinho, apresenta maior regularidade de vazão (SANTOS *et al.*, 2017).

Em concordância com a intensa ocupação do Submédio São Francisco, a bacia hidrográfica, nessa região, mostra uma variedade de usos que incluem, entre outras atividades, a geração de energia, a pesca, a navegação de cargas e de pessoas, o uso para irrigação e o abastecimento de água potável para consumo (SANTOS *et al.*, 2017). O volume de água implicado no atendimento de todas essas demandas por si só oferece indicação da importância da gestão dos recursos hídricos nessa região (FREITAS & LOPES, 2003).

Contudo, a intensa ocupação na região também implica uma histórica degradação ambiental e poluição dos ecossistemas aquáticos. Nesse sentido, o despejo direto de efluentes causa a eutrofização dos ecossistemas aquáticos através do acúmulo de nutrientes como nitrogênio e fósforo, originários, por exemplo, do esgoto doméstico. A consequência direta mais visível é o acúmulo de macrófitas aquáticas do gênero *Eichhornia*, abundantes nas margens do rio São Francisco tanto em Juazeiro quanto em Petrolina (BRITTO, 2015).

Assim como o fitoplâncton, as macrófitas podem também ser bioindicadoras do estado trófico do ecossistema aquático, mas a presença excessiva desses organismos pode levar à competição por luz e nutrientes. Entre outros fatores, a cobertura da coluna d'água pelas plantas prejudica a realização de fotossíntese por parte do fitoplâncton, diminuindo a oxigenação da água e podendo até mesmo afetar a ictiofauna, causando a mortandade de peixes em casos extremos (CATELA, 2012).

Por sua vez, o risco de florações monoespecíficas de cianobactérias com a eutrofização é uma problemática bem conhecida e que pode ocasionar problemas graves para a saúde humana. No caso mais notável na região, em 1996, 52 pacientes de uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco, foram a óbito após experienciarem sintomas como dor de cabeça, dor nos olhos, visão turva, náusea, vômito e, finalmente, insuficiência hepática aguda, no evento conhecido como "Síndrome de Caruaru". A intoxicação dos pacientes se deu através de dois grupos cianotoxinas: microcistinas, produzidas pelos gêneros de cianobactéria *Microcystis* e *Anabaena*, e cilindropermopsina, produzida pelo gênero *Cylindrospermopsis* (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Dessa forma, integrando o conhecimento sobre a diversidade e importância ecológica e econômica das algas, a abordagem dos Grupos Funcionais de Reynolds na interpretação do fitoplâncton, e a necessidade de uma gestão consciente dos recursos hídricos visando o uso sustentável da água em seus múltiplos-usos, este trabalho objetivou determinar e analisar os códons dos GFR com base em um levantamento taxonômico do fitoplâncton do Rio São Francisco visando agregar dados que possam subsidiar a tomada de decisões na conservação do Submédio São Francisco.

## 2 | METODOLOGIA

Esta pesquisa baseou-se na coleta, identificação e interpretação do fitoplâncton do Rio São Francisco às margens da cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil. A coleta das algas ocorreu no dia 15 junho de 2020 em área de múltiplos usos da água oposta à margem pertencente à cidade de Juazeiro, Bahia, Brasil (Figura 1). As coordenadas geográficas do local de coleta são 09°24,245'S e 040°30,004'O, e a elevação do local é de 358 metros acima do nível do mar. De acordo com a classificação de Köppen, a classificação do clima para a área de coleta é *BSh*, correspondendo a uma área seca e semiárida de baixa latitude e altitude (ALVARES *et al.*, 2014).



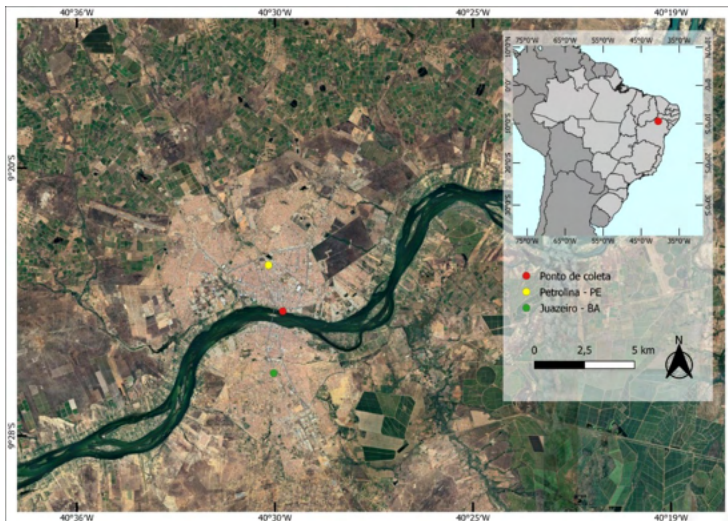


Figura 1. Imagem de satélite da área de coleta e adjacências, evidenciando a característica de múltiplos usos da água no local.

Foram realizadas amostragens sucessivas através do arraste em superfície e filtragem da água utilizando uma rede de fitoplâncton com abertura de malha de  $20\ \mu\text{m}$ . O pH e temperatura da água medidos no local de coleta foram 6,0 e  $22,9\ ^\circ\text{C}$ , respectivamente. O material filtrado foi concentrado em potes de vidro recobertos por material opaco preto com capacidade para 150 mL. As amostras foram fixadas com formalina, álcool e ácido acético (FAA) de acordo com o preconizado por BICUDO & MENEZES (2006) para a coleta de fitoplâncton visando à manutenção das estruturas das microalgas por longa data e com dano mínimo. As amostras encontram-se armazenadas sob refrigeração a  $6\ ^\circ\text{C}$  no Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, onde estão disponíveis para consulta.

Subsequentemente, o material coletado foi analisado através de microscopia óptica. A identificação do fitoplâncton foi feita utilizando como literatura de referência os trabalhos de BICUDO & MENEZES (2006) e FRANCESCHINI *et al.* (2010). Concomitantemente ao processo identificação até o nível taxonômico mais abrangente possível, foi construída uma planilha atrelada a um banco de imagens contendo uma fotografia para cada espécime inserido. As fotografias foram realizadas através de câmera digital acoplada a um microscópio óptico modelo Diag Tech XJS300. Para a edição e medição das imagens, utilizou-se o software TSView, versão 6.2.4.5.

Em seguida, procedeu-se à identificação dos grupos funcionais seguindo a classificação proposta por REYNOLDS *et al.* (2002), bem como as observações de PADISÁK *et al.* (2009) sobre o trabalho anterior, além da avaliação dos táxons quanto a sua frequência de ocorrência nas amostras analisadas (MATTEUCCI & COLMA, 1982).

### 3 I RESULTADOS

A análise das amostras coletadas permitiu identificar a presença de 36 gêneros de algas, 32 dos quais puderam ser agrupados em 14 códons, considerando a classificação de PADISÁK et al. (2009). A Figura 2 apresenta a diversidade taxonômica e a frequência de ocorrência dos gêneros de fitoplâncton registrados nas amostras analisadas. O códon de GFR mais representativo na riqueza de fitoplâncton da área de estudo foi  $N_A$ , que contemplou 28,13% dos táxons registrados nas amostras analisadas, sendo esse seguido por  $L_O$  (12,5%), MP e J (9,38% cada). Os códons dos GFR referentes aos organismos identificados estão destacados na Figura 3.

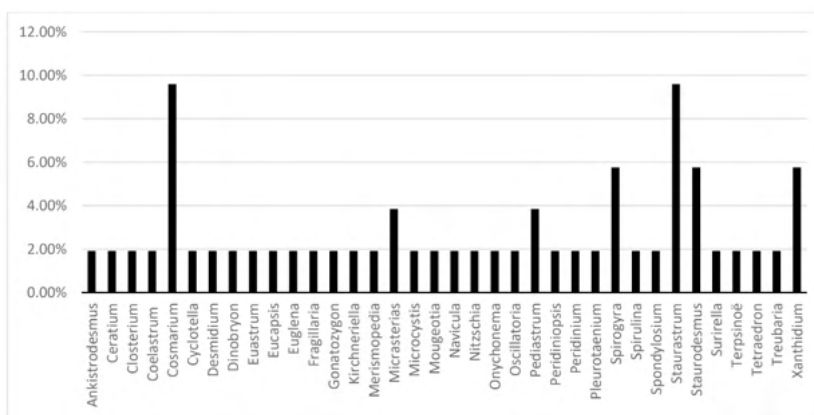


Figura 2. Representatividade, em porcentagem, de espécies pertencentes aos 36 gêneros do fitoplâncton identificados em área de múltiplos usos da água amostrada no trecho submédio do rio São Francisco em Petrolina, Pernambuco, Brasil, em junho de 2020.

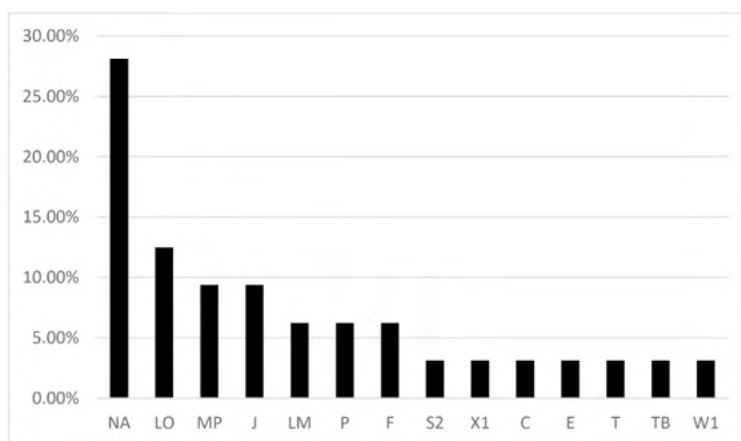


Figura 3. Percentual da riqueza taxonômica do fitoplâncton por Grupos Funcionais de Reynolds (GFR) registrada em amostras coletadas no trecho submédio do rio São Francisco em Petrolina, Pernambuco, Brasil, em junho de 2020.

## 4 | DISCUSSÃO

É importante destacar que a área amostral é utilizada para pesca, como atracadouro de barcos, e como local de travessia de barcas de transporte de passageiros entre uma cidade e outra. Contudo, a presença de despejo de esgoto residencial e comercial nas adjacências do local de coleta resulta no aumento significativo do conteúdo de matéria orgânica, evidenciado pela abundante flora de macrófitas aquáticas do gênero *Eichhornia* (BARRETO, 2015; MINHONI *et al.*, 2018).

A Prefeitura Municipal de Petrolina, Pernambuco, não-raro opta pela onerosa remoção direta das plantas do local utilizando máquinas retroescavadeiras, resultando em efêmeros períodos de melhoria. Contudo, a problemática não é resolvida ao longo prazo em razão, além da continuidade do despejo do esgoto, da presença de um banco de sementes no local, que continuam seu desenvolvimento sob condições ideais (BRITTO, 2015; CBHSF, 2015).

O códon  $N_A$ , mais representativo na riqueza do fitoplâncton na área de estudo, não existia na proposta original dos GFR, tendo sido sugerido por SOUZA *et al.* (2008) para incluir espécies em baixas latitudes, em ambientes oligo-mesotróficos e sensíveis à desestratificação da coluna d'água, ou seja, à eliminação da variação vertical na temperatura e densidade da água (LIMA NETO, 2019; PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009). O estado trófico preconizado por esse códon implica corpos d'água de baixa a média produtividade, com possíveis implicações para a qualidade da água, mas em níveis geralmente aceitáveis (ANA, 2021). Os principais representantes desse códon são as desmídias unicelulares *Cosmarium*, *Staurodesmus*, *Staurastrum* e outras desmídias unicelulares ou filamentosas (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; SOUZA *et al.*, 2018).

O códon  $L_O$ , segundo mais representativo na riqueza total do fitoplâncton identificada na área de estudo, com 12,5%, é característico de habitats profundos ou rasos, com estado trófico variando de oligotrófico a eutrófico e apresentando sensibilidade a perturbações da coluna d'água. Este códon inclui um grande número de cianobactérias e dinoflagelados, incluindo *Ceratium* spp. (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002). Contudo, quando este ocorre concomitantemente com *Microcystis*, o códon  $L_M$  é implicado, tendo este também sido identificado em nossa pesquisa (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002).

O códon MP inclui várias diatomáceas e cianobactérias, e o habitat característico é de ambientes lênticos rasos e turvos, com tolerância a alta insolação e sensibilidade a perturbações e baixa luminosidade (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002). Já o códon J inclui espécies que vivem em ambientes rasos, eutróficos e frequentemente submetidos a perturbações da coluna d'água, sendo sensíveis a baixa luminosidade. Aqui se incluem diversas algas verdes coloniais (PADISÁK,

CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002).

Como mencionado previamente, o códon  $L_M$  é tipicamente representado pela co-ocorrência de *Ceratium hirundinella* e/ou *Ceratium furcoides* com *Microcystis* spp. Este códon é característico de ambientes eutróficos a hipertróficos, sendo sensível a perturbações na coluna d'água e a baixa estratificação (REYNOLDS *et al.*, 2002). É importante notar que *Ceratium* e *Microcystis*, presentes nas nossas amostras e representados pelo códon  $L_M$ , podem ser problemáticos e representar riscos à qualidade da água através da redução da sedimentação e entupimento de filtros, no caso de *Ceratium*, ou através da produção de toxinas (microcistinas), no caso de *Microcystis*. Apesar de florações serem típicas de ambientes lênticos, a presença desses grupos na área amostral e o uso da água para consumo pode levar, eventualmente, ao transporte dos organismos a algum local de armazenamento onde haja condições favoráveis à sua proliferação (ALMEIDA *et al.*, 2016; PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002).

O códon P é típico de habitats semelhantes ao do códon  $N_A$ , mas em estados tróficos de maior quantidade de nutrientes. Aqui se incluem algumas diatomáceas e desmídias, no epilímnio de ambientes eutróficos, tolerantes a luminosidade moderada e sensíveis à estratificação da coluna d'água (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002). Já o códon F é típico do epilímnio de ambientes mesotróficos a eutróficos com frequente perturbação. Seus representantes, aqui inclusas algumas algas verdes coloniais, a exemplo de *Kirchneriella*, são tolerantes a turbidez e sensíveis à deficiência de  $CO_2$  (PADISÁK, CROSETTI & NASELLI-FLORES, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2002).

O códon S2 compreende organismos cujo hábitat são águas quentes, rasas, e frequentemente alcalinas, a exemplo de *Spirulina* spp. O códon é tolerante a condições de baixa luminosidade e sensível a perturbações na coluna d'água. O códon X1, por sua vez, é típico de habitats rasos, eutróficos a hipertróficos, tolerantes à estratificação e sensíveis à deficiência de nutrientes. Aqui se incluem diversas algas verdes coloniais a exemplo de *Ankistrodesmus* spp. Já o códon C é típico de ambientes eutróficos, tolerantes a alta luminosidade e com sensibilidade a estratificação. Este códon inclui algumas diatomáceas, a exemplo de *Cyclotella meneghiniana* e *C. ocellata*. O códon E é característico de ambientes rasos, oligotróficos, tolerantes à deficiência de nutrientes e sensíveis à deficiência de  $CO_2$ . Este códon foi representado em nossa pesquisa pela presença de *Dinobryon*. O códon T é típico de camadas submetidas a perturbação, ocorrendo no epilímnio águas profundas, sendo tolerantes à baixa luminosidade e sensíveis à deficiência de nutrientes. Neste trabalho, o códon T foi representado por *Mougeotia* spp. O códon  $T_B$  foi proposto por BORICS *et al.* (2007) e é típico de ambientes altamente lóticos. Seus representantes incluem diversas diatomáceas, várias delas representadas neste trabalho, a exemplo de *Fragilaria*, *Surirella*, *Nitzschia* e *Navicula*. Por fim, o códon W1 é típico de ambientes eutróficos, ricos em matéria orgânica, especialmente originados de efluentes domésticos.

O representante deste códon identificado neste trabalho foi *Euglena* sp.

A descrição implícita a cada um dos códons dos GFR identificados nesta pesquisa corrobora com as características do trecho amostrado do rio São Francisco, em Petrolina (PE). O estado trófico predominante de mesotrófico a hipertrófico atestado pelos códons identificados reforça a alta quantidade de nutrientes que a água do local amostral apresenta, como previamente sinalizado pelas macrófitas aquáticas presentes no local. Ademais, nota-se também a significância da representação de códons característicos de ambientes com frequente perturbação, como esperado pelo ambiente lótico do local amostral, bem como da predominância de códons que compreendem organismos frequentes no epilímnio, a camada superior da coluna d'água, e alta turbidez da água, diminuindo a representatividade do fitoplâncton em camadas mais profundas. É válido lembrar que a coleta foi feita às margens do rio, em ambiente raso.

Outra conclusão importante deste trabalho é a presença do códon L<sub>M</sub>, representado pela co-ocorrência de *Ceratium hirundinella* e/ou *Ceratium furcoides* com *Microcystis* spp. e característico de ambientes eutróficos a hipertróficos. O espécime de *Ceratium* identificado neste trabalho não pode ser diferenciado quanto a *Ceratium hirundinella* ou *Ceratium furcoides* uma vez que não foi possível evidenciar a divisão das plaquetas da epiteca. Contudo, a ocorrência do gênero juntamente com *Microcystis aeruginosa* acende um importante alerta principalmente no que se refere ao uso da água para consumo. Apesar de florações serem típicas de ambientes lênticos, opostos ao caráter lótico do rio São Francisco, o transporte da água para armazenamento em outros locais pode desencadear eventos danosos de floração, se as condições forem favoráveis. Dessa forma, este estudo oferece subsídio para a tomada de decisões na gestão dos recursos hídricos do rio São Francisco, especialmente em zonas populosas.

## 5 | CONCLUSÕES

Logramos identificar 14 códons dos Grupos Funcionais de Reynolds com base em um levantamento taxonômico do fitoplâncton do rio São Francisco em um ponto amostral às margens do rio em Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Com base nas descrições implícitas na definição de cada códon, os dados obtidos permitem corroborar as características do ponto amostral do rio São Francisco, com predominância de ambientes de mesotróficos a eutróficos e alta perturbação da coluna d'água.

A presença do códon L<sub>M</sub>, representado pela co-ocorrência de *Ceratium hirundinella* e/ou *Ceratium furcoides* com *Microcystis* spp., acende um importante alerta para o uso da água para consumo humano, visto que, em ambientes com condições ideais, estes táxons podem desencadear florações prejudiciais à qualidade da água, eventos que, em casos extremos, podem ser letais.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. R. *et al.* The effectiveness of conventional water treatment in removing *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans, *Microcystis* sp. and microcystins. **Water SA**, v. 42, n. 4, 2016.

ALVARES, C. A. *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2014. Disponível em: [https://www.schweizerbart.de/papers/metz/detail/22/82078/Koppen\\_s\\_climate\\_classification\\_map\\_for\\_Brazil](https://www.schweizerbart.de/papers/metz/detail/22/82078/Koppen_s_climate_classification_map_for_Brazil). Acesso em: 28 set. 2021.

AZEVEDO, S. M. F. O. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, 2002.

BARRETO, R. D. **Uso e ocupação do solo às margens do rio São Francisco no município de Petrolina-PE: impactos ambientais no canal fluvial**. 2015. 111f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

BICUDO, C. E. M. & MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. 502 p.

CATELA, B. M. A. **Estudo da adsorção de fosfatos em colunas de leito fixo contendo cinzas volantes de biomassa efeito do TRH e da carga de P**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2012.

CBHSF. COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO. 2021. **Principais características da bacia hidrográfica do rio São Francisco**. Disponível em: <https://cbhsaofrancisco.org.br/a-bacia/>. Acesso em: 7 out. 2021.

CORREIRA, R. C.; ARAUJO, J. L. P.; CAVALCANTI, E. B. **A fruticultura como vetor de desenvolvimento: o caso dos municípios de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA)**. Petrolina: Empraba Semiárido, 2001.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. Tradução de Carlos Duarte e Anna Duarte. 1. ed. São Paulo: Martin Claret, 2014.

ESTEVES, F. A. & THOMAZ, S. M. Comunidade de Macrófitas Aquáticas. *In*: ESTEVES, F.A (Org.). **Fundamentos de Limnologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011, pp. 461-520.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 2021. **AlgaeBase**. National University of Ireland, Galway. Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 7 out. 2021.

FRANCESCHINI, I. M. *et al.* **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FREITAS, M. A. S.; LOPES, A. V. Avaliação da demanda de água para irrigação: aplicação à bacia do rio São Francisco. *In*: **Anais do XII Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem**. Juazeiro: 2003.

FUENTES, E. V. **Efeito da heterogeneidade de habitats sobre o fitoplâncton no reservatório de Moxotó, rio São Francisco, Brasil**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

LINNÆUS, C. **Species Plantarum**. Estocolmo: Impensis Laurentii Salvii, 1753. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/13830#page/573/mode/1up>. Acesso em: 7 out. 2021.

MATTEUCCI, S. D.; COLMA, A. **Metodología para el estudio de la vegetación**. Washington: The General Secretariat of The Organization of American States, 1982.

MBONDE, A. *et al.* Phytoplankton species diversity and abundance in the near shore waters of Tanzanian side of Lake Victoria. **Tanz. J. Sci.**, v. 30, n. 1, 2004.

MINHONI, R. T. A. *et al.* Monitoramento de macrófitas aquáticas no rio São Francisco no trecho urbano de Petrolina-PE. **Scientia Plena**, v. 14, n. 3, 2018.

NUNES, V. S. *et al.* Grupos Funcionais de Reynolds (GFR) no Fitoplâncton do Rio São Francisco em Petrolina, Pernambuco, Brasil. In: NUNES, V. S. *et al.* **Anais da IX Semana Acadêmica de Biologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco**. Petrolina: Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2021. Disponível em: <http://www.univasf.edu.br/~tcc/00001f/00001f3c.pdf>. Acesso em: 7 out. 2021.

OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A. M.; ASHTON, P. J. The influence of a toxic cyanobacterial bloom and water hydrology on algal populations and macroinvertebrate abundance in the upper littoral zone of Lake Krugersdrift, South Africa. **Ecotoxicology**, v. 18, 2009.

PADISÁK, J. *et al.* Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: A critical review with updates. **Hydrobiologia**, v. 621, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/226060276>. Acesso em: 7 out. 2021.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21553769.2016.1162753>. Acesso em: 7 out. 2021.

PMP. PREFEITURA MUNICIPAL DE PETROLINA. **História do Município**. 2021. Disponível em: <https://petrolina.pe.gov.br/historia>. Acesso em: 7 out. 2021.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal**. Coordenação de tradução Jane Elizabeth Kraus. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REYNOLDS, C. S. *et al.* Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 24, n. 5, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/plankt/article/24/5/417/1507791>. Acesso em: 7 out. 2021.

SANTOS, M. O. *et al.* Avaliação das alterações hidrológicas da bacia do rio São Francisco causadas pela construção da usina hidrelétrica de Sobradinho. **Scientia Plena**, v. 13, n. 11, 2017.

SILVA, P. A. *et al.* Determinação da extensão do rio São Francisco. In: **Anais da XI SBSR**. Belo Horizonte: INPE, 2003.

SOUZA, M. B. G. *et al.* The role of atelomixis in phytoplankton assemblages' replacement in Dom Helvecio Lake, South-East Brazil. **Hidrobiologia**, v. 607, 2008.

SPIX, J. B. **Viagem pelo Brasil (1817-1820)**. Tradução de Lúcia Furquim Lahmeyer, v. 2. Brasília: Edições do Senado Federal, 2017.

THÉBAULT, J. *et al.* Barium and molybdenum records in bivalve shells: Geochemical proxies for phytoplankton dynamics in coastal environments? **Limnol. Oceanogr**, v. 54, n. 3, 2009.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Recovery Responses of Freshwater Phytoplankton Assemblage After the Disappearance of Metal Toxicity in Semi-Continuous Cultures. **Research Square**, 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-657719/v1>. Acesso em: 7 out. 2021.

WELLS, H. G. **Guerra dos Mundos**. Tradução de Livia Bono. São Paulo: Pé da Letra, 2019.



# CAPÍTULO 19

## AVALIAÇÃO DE MISTURAS TERNÁRIAS DIESEL-BIODIESEL-ETANOL PARA APLICAÇÃO COMO COMBUSTÍVEL EM MOTORES DE CICLO DIESEL

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 23/10/2021

**Rene Gonzalez Carliz**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola  
de Química  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/0672946757410567>

**Guilherme Brandão Guerra**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola  
de Química  
Rio de Janeiro – RJ  
ID 0000-0002-9933-0258 Orcid

**Gisel Chenard Díaz**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola  
de Química  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/0508124357020553>  
ID Orcid 0000-0002-3892-1556

**Yordanka Reyes Cruz**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola  
de Química  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/2484115263109864>  
ID Orcid 0000-0002-2309-3698

**Vinicius Rossa**

Universidade Federal Fluminense, Instituto de  
Química  
Niterói – RJ, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/2852735029222599>  
ID Orcid 0000-0001-5483-3030

**Donato Alexandre Gomes Aranda**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola  
de Química  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/9833601447849479>  
ID Orcid 0000-0002-5736-4118

**RESUMO:** Com as catástrofes “naturais” cada vez mais recorrentes e com maior potencial destrutivo, a sociedade passou a entender que deve olhar para o meio ambiente com maior responsabilidade. Principalmente, no que diz respeito aos veículos e máquinas equipadas com motores a diesel, que são fontes móveis de poluição atmosférica, causando riscos à saúde do planeta. Diante desse cenário, foi proposto o presente trabalho, que visa a formulação e avaliação de misturas formadas por óleo diesel, biodiesel e etanol com vistas à sua utilização em motores que operam no ciclo diesel. As análises das propriedades físico-químicas foram realizadas em conjunto com estudos de lubricidade e estabilidade. O resultado das análises físico-químicas mostrou que características importantes permaneceram, em sua maioria, dentro das especificações exigidas. Uma exceção é feita para o ponto de fulgor, pois no caso do etanol ele já é baixo. O estudo de lubricidade mostrou que a presença de biodiesel na mistura impactou positivamente nas propriedades lubrificantes dos combustíveis, com menor desgaste das carrocerias. Por fim, o estudo de estabilidade demonstrou as propriedades de cosolvência do biodiesel na mistura e sua higroscopicidade, não contribuindo, entretanto, para um aumento no tempo de estabilidade da

mistura. No entanto, as misturas são viáveis para uso comercial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiesel, diesel, etanol, combustíveis renováveis.

## EVALUATION OF DIESEL-BIODIESEL-ETHANOL TERNARY MIXTURES FOR APPLICATION AS A FUEL IN DIESEL CYCLE ENGINES

**ABSTRACT:** With “natural” catastrophes increasingly recurrent and with greater destructive potential, society has come to understand that it must look to the environment with greater responsibility. Mainly, with regard to vehicles and machines equipped with diesel engines, mobile sources of atmospheric pollution, causing risks to the health of the planet. Given this scenario, the present work was proposed, which aims at the formulation and evaluation of blends formed by diesel oil, biodiesel and ethanol with a view to their use in engines that operate in the diesel cycle. The physicochemical properties analyzes were carried out in conjunction with lubricity and stability studies. The physicochemical analyzes result showed that important characteristics remained, for the most part, within the required specifications. An exception is made for the flash point, as in the case of ethanol it is already low. The lubricity study showed that the presence of biodiesel in the mixture had a positive impact on the lubricating properties of fuels, with less wear on the bodies. Finally, the stability study demonstrated the co-solvency properties of biodiesel in the mixture and its hygroscopicity, not contributing, however, to an increase in the stability time of the mixture. However, blends are viable for commercial use.

**KEYWORDS:** Biodiesel, diesel, ethanol, renewable fuels.

## 1 | INTRODUÇÃO

O uso de misturas oxigenadas, com menor proporção de hidrocarbonetos aromáticos e enxofre em sua composição, levam a uma redução no número e tamanho de partículas emitidas pelo escapamento.(ARMAS et al., 2013) Se uma política de longa duração for implantada no sentido de paulatinamente reduzir esse tipo de emissão, poder-se-á observar um declínio na tendência anual de mortes por doenças respiratórias e cardiovasculares.(BAKEAS; KARAVALAKIS; STOURNAS, 2011; ONU, 2005; SILVA et al., 2012; STACHOWIAK, G. W.; BATCHELOR, 2005).

Substituir uma porcentagem, por exemplo, de diesel e gasolina utilizados no transporte por biocombustíveis (biodiesel e bioetanol) é o caminho mais simples para esse setor. No sentido de contribuir no combate das mudanças climáticas surgiu a ideia de desenvolver a presente pesquisa que tem como meta principal a avaliação das misturas ternárias Diesel-Biodiesel-Etanol para aplicação em motores ciclo Diesel.

## 2 I PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas no desenvolvimento do trabalho são:

- Óleo Diesel A S10 produzido na Refinaria do Paraná da Petrobras (REPAR) que atende às especificações de qualidade estabelecidas na Resolução ANP nº 65, de 9/12/2011;
- Etanol anidro (EAC, 99,8% de pureza) marca Isofar que atende às especificações de qualidade estabelecidas na Resolução ANP nº 19, de 15/4/2015;
- Biodiesel produzido na usina da Petrobras Biocombustíveis (PBio) localizada em Montes Claros (MG) a partir de mistura de óleo de soja com sebo animal que atende às especificações contidas na Resolução ANP nº 30, de 23/06/2016.

### 2.2 Produção das misturas

Com o objetivo de avaliar a influência da adição do etanol nas propriedades físico-químicas das misturas diesel-biodiesel, foram formuladas e caracterizadas diversas misturas, todas em base volumétrica. (TRUJILLO G., 2004)

Primeiramente foram produzidas as misturas diesel-biodiesel (BX) com os seguintes teores de biodiesel: 10, 15 e 20%. Escolheram-se essas concentrações pois: 10% – teor de biodiesel que estava sendo adicionado ao diesel de petróleo quando foram realizados os estudos; 15% – teor a ser atingido até 2023 de acordo com autorização governamental, e 20% – estimativa do que pode vir a ser uma nova diretriz daqui a alguns anos.

A partir de cada BX gerada, foram produzidas misturas com teores de 10 e 15% de etanol, contabilizando ao todo nove misturas (Tabela 1) (CRUZ, 2019).

Identificação	Produto
B10	Diesel + 10% de biodiesel
B15	Diesel + 15% de biodiesel
B20	Diesel + 20 % de biodiesel
B10E10	Diesel + 10% de biodiesel + 10% de etanol
B10E15	Diesel + 10% de biodiesel + 15% de etanol
B15E10	Diesel + 15% de biodiesel + 10% de etanol
B15E15	Diesel + 15% de biodiesel + 15% de etanol
B20E10	Diesel + 20 % de biodiesel + 10% de etanol
B20E15	Diesel + 20 % de biodiesel + 15% de etanol

Tabela 1. Misturas produzidas para o trabalho

## 2.3 Caracterização das matérias-primas e das misturas produzidas

Nas matérias-primas e amostras produzidas pelas misturas destas foram realizados ensaios para inferir suas características e qualidade. Os ensaios executados foram Viscosidade cinemática a 40 °C, Destilação, Densidade a 15 °C, Ponto de fulgor, Corrosividade ao cobre, Cinzas, Número de acidez, Teor de água, Índice de iodo, Ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) °C, Estabilidade à oxidação Rancimat, Teor de enxofre e Número de cetano derivado.

## 2.4 Estudo de lubricidade

Adicionalmente, foi realizado um estudo de lubricidade. O método utilizado foi o ASTM D4172 - “Quatro Esferas”. Nele, em resumo, três esferas alinhadas são fixadas em uma cuba preenchida com a amostra e uma quarta esfera é mantida em contato simultâneo sob força com as outras três e realizando movimento giratório em um eixo movido por motor. São controlados tempo, temperatura, rotação e força aplicada e, ao final, medem-se com auxílio de microscópio os diâmetros das ranhuras (“cicatrizes”) formadas pelo atrito entre a esfera que gira e as outras três fixas.

Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições – ensaio a 45 °C de temperatura, 3 minutos de duração, 30 kgf e 1800 rpm para posterior comparação entre elas.

## 2.5 Estudo de estabilidade

É muito importante também avaliar a estabilidade, fundamentalmente quando se misturam componentes com diferente polaridade. Neste estudo de estabilidade alíquotas das amostras foram separadas e submetidas a três diferentes condições de temperatura como segue:

- Alíquotas mantidas a 10 °C em geladeira (temperatura controlada);
- Alíquotas mantidas a 22 °C em sala climatizada (temperatura controlada) e;
- Alíquotas mantidas à temperatura ambiente (sem controle de temperatura) e, portanto, sujeitas às variações durante os dias.

A boca de todos os frascos utilizados nos testes foi vedada com papel alumínio e fita adesiva. Em todos foi realizado um furo bem pequeno para simular o respiro das tampas dos tanques de combustível. Esta consideração é muito importante, pois é justamente através deste respiro dos tanques de combustível que durante a noite, quando ocorre diminuição de temperatura ambiente, há a entrada de ar úmido. Esta umidade é absorvida fundamentalmente pelo etanol, muito higroscópico.

O intuito deste estudo foi verificar como se comportariam as misturas com o decorrer do tempo, acompanhando possíveis mudanças de aspecto que poderiam ocorrer

após transcorridas horas, dias e meses para então realizar uma análise comparativa. As amostras foram observadas quase que diariamente, à exceção dos fins de semana. Ao se identificar separação de fases era determinado o teor de água.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico-química

Os resultados de caracterização físico-química realizada foram compilados nas Tabelas 3 e 4.

Análise	Especificação	B100	Diesel	B10	B15	B20	B10 E10	B10 E15	B15 E10	B15 E15	B20 E10	B20 E15
Ponto de fulgor (°C)	38 mín.	142	70	72	74	74	30	25	30	25	30	25
Densidade 15/4 (kg/m³)	817,5 a 865	875,8	832,2	834,5	836,2	837,8	829,9	828,0	831,9	829,6	833,2	831,5
Viscosidade (mm²/s)	1,9 a 4,1	5,047	2,585	2,547	2,778	2,821	2,330	2,054	2,387	2,255	2,418	2,315
CFPP (°C)	0 a 12	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8	Abaixo de -8
Acidez, (mg KOH/g)	0,30 máx	0,07	0,15	0,17	0,18	0,14	0,13	0,17	0,16	0,18	0,18	0,07
Estabilidade à oxidação (h)	20 h	26,11	16,54	16,20	15,56	15,57	15,01	13,43	8,81	8,07	4,46	26,11
Teor de água (mg/kg)	165	18,30	22,50	50,50	52,50	73,40	122,9	115,3	145,8	124,20	154,50	18,30
Corrosividade ao Cu	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A	1A
Índice de iodo (mgI <sub>2</sub> /100g)	anotar	80	1	Não realizado	Não realizado	16	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
Cinzas (%)	0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Nº cetano	48 mín.	62,84	57,83	50,59	48,32	46,97	50,80	51,19	48,39	48,78	48,38	47,78
Teor de enxofre	10 mg/kg	2,60	2,60	2,50	2,50	2,60	2,40	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50

Tabela 3. Resultados da caracterização físico-química das matérias-primas e das misturas. Fonte: ANP com adaptações.(ANP BRASIL, 2014, 2018)

Como observado na Tabela 3, a característica que sofreu maior variação com a adição do etanol foi o ponto de fulgor. Com os teores de etanol utilizados este item diminuiu para valores inferiores à especificação (mín. 38 °C). Por esse motivo as misturas com 15% de etanol foram descartadas e a avaliação continuou apenas com as misturas com 10%. Por tal motivo, seguindo as especificações de qualidade estabelecidas atualmente para o combustível diesel, seria necessário adicionar teores de etanol inferiores a 10% de modo a garantir o cumprimento da especificação estabelecida para o ponto de fulgor. A estabilidade à oxidação das misturas também diminuiu, mas este ponto pode ser melhorado com a adição de aditivos. Os demais índices apresentaram leves variações e ficaram dentro dos limites especificados na norma.

O índice de iodo foi determinado apenas na mistura de diesel com 20% de Biodiesel (B20). Como nas misturas ternárias produzidas o único componente que aumenta o grau de insaturação é o biodiesel, ao conhecer o índice de iodo da mistura com maior percentual deste componente podemos inferir que nas demais amostras o número de iodo será inferior.

### 3.2 Estudo de lubrificidade

Na Tabela 4 a seguir são apresentados os resultados das cicatrizes de desgaste formadas ao final do ensaio quatro esferas.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro de ranhura (mm)</b>
Diesel	1,30
Biodiesel	0,37
B10	0,52
B15	0,42
B20	0,37
B10E10	0,59
B10E15	0,49
B15E10	0,60
B15E15	0,50
B20E10	0,78
B20E15	0,50

Tabela 4. Valores de diâmetro de ranhura após ensaio de desgaste.

Nota-se que o aumento do percentual de biodiesel nas misturas leva a um aumento da lubrificidade das mesmas e, por conseguinte, um diâmetro de cicatriz menor. Efeito inverso ocorre com a introdução do etanol. Com o aumento dos teores de álcool há aumento do diâmetro de cicatriz. No entanto, devido ao efeito benéfico do biodiesel nenhuma

das misturas avaliadas apresentou cicatriz de desgaste superior àquela provocada pelo combustível diesel (1,30 mm).

### 3.3 Estudo de estabilidade

Antes do início do estudo de estabilidade foram medidos os teores de água nas amostras (misturas com 10% de etanol).

Amostra	Teor de água (mg/kg)
B10E10	298
B15E10	306
B20E10	314

Tabela 5. Teor de água no início do estudo

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar o comportamento da estabilidade das misturas em diferentes condições de temperatura e umidade, já que existe uma diferença de polaridade considerável entre o etanol e o diesel.

#### 3.3.1 Estudo de estabilidade a 10 °C, controlada

O início deste experimento se deu em 30 de janeiro de 2019, seguindo a metodologia descrita no item 2.4. O teor de umidade no interior da geladeira se manteve próximo de 46 % durante o período do experimento. Na Figura 1(a) mostra-se a aparência das misturas no início dos testes e após 96 horas (4 dias) de preparo das amostras onde identificou-se a separação das misturas, conforme apresentado na Figura 1(b).

Neste momento o produto foi novamente homogeneizado e retirado uma amostra para determinação do teor de umidade. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

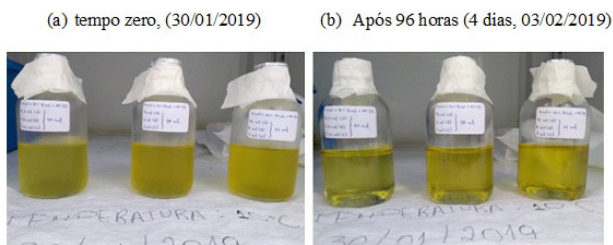


Figura 1. Aparência das misturas durante o período do experimento

Amostra	Teor de água, mg/kg
B10E10	4089
B15E10	4518
B20E10	4611

Tabela 6. Teor de água após separação, 96 h decorridas (4 dias)

Comparando os resultados de umidade inicial das misturas, Figura 1(a), com os teores de água identificados no momento da separação, Figura 1(b), na condição de 10 °C e 46% de umidade no meio, houve um aumento considerável de umidade nas misturas em apenas 4 dias. Também nos resultados da Tabela 7 verifica-se que a amostra com maior teor de biodiesel (B20) absorveu maior quantidade de umidade no meio no mesmo período de tempo, comportamento que está relacionado com a elevada higroscopicidade do biodiesel. Conforme esperado, a presença de maior teor de biodiesel conseguiu solubilizar maior quantidade de água na mistura.

### 3.3.2 Estudo de estabilidade a 22 °C, controlada

O início deste experimento se deu em 30 de janeiro de 2019 também seguindo a metodologia descrita no item 2.4. O teor de umidade no interior da sala climatizada se manteve próximo de 52% durante o período do experimento. Na Fig. 2(a) demonstra-se a aparência das misturas no início dos testes e após 48 horas de preparo das amostras identificou-se uma mudança na coloração das misturas, conforme apresentado na Figura 2(b).

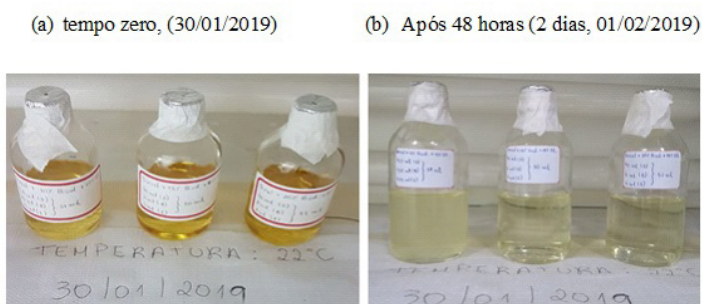


Figura 2. Aparência das misturas durante o período do experimento

Ainda com essa alteração na cor das amostras os testes continuaram. Decorridos 30 dias (02/02/2019), começou a aparecer uma fase levemente amarelada no fundo dos frascos. Esta fase era maior naqueles que continham as misturas B10E10 e B15E10. No entanto, nas três amostras fue possível constatar a formação dessa fase inferior. Por tal



motivo, o teor de água nas amostras foi determinado nesse momento, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.3.1 (homogeneização e retirada de amostra). Os resultados são apresentados nas Tabela 7.

Amostra	Teor de água (mg/kg)
B10E10	4103
B15E10	4566
B20E10	4635

Tabela 7. Teor de água após separação, 30 dias decorridos (02/02/2019)

Os teores de água presentes na mistura no dia em que aconteceu a separação das fases é muito próximo do teor de água que provocou a separação das misturas no estudo realizado a 10 °C. As principais diferenças entre os experimentos, além da alteração na cor das amostras avaliadas a 22 °C, são o tempo até a separação das fases (à temperatura de 10 °C de 4 dias e à temperatura de 22 °C de 30 dias) e a forma como aconteceu esta separação (a 10 °C apareceu uma fase superior e a 22 °C apareceu uma fase inferior).

Após a aparição da fase inferior os testes continuaram. Decorridos 60 dias, esta fase amarelada era maior nas três misturas, adquirindo coloração amarela mais intensa à medida em que se passavam os dias 90 (3 meses, 02/04/2019) - Figura 3(a) e 120 (4 meses, 02/05/2019) - Figura 3(b).

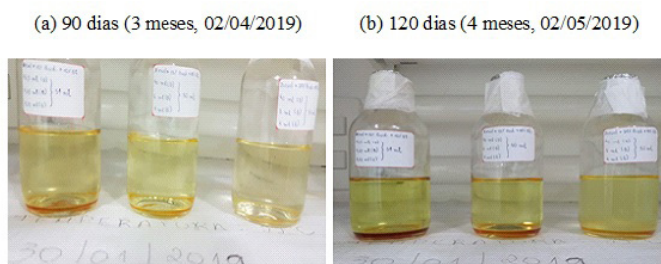


Figura 3. Amostras decorridos 90 e 120 dias.

O produto dessa fase tinha a aparência de uma goma, que pode haver-se formado como resultado de um processo de degradação de um ou mais componentes da mistura.

Visto que o comportamento se repetiu, foi realizada uma análise sobre as possíveis causas dessa alteração na coloração das misturas e do aparecimento de fase inferior com aparência de goma. Uma das hipóteses levantadas foi a possibilidade de contaminação microbiológica, já que a sala climatizada utilizada neste estudo é uma sala de cultivo de microalgas, local onde normalmente podem existir determinados microrganismos

no ambiente, como bactérias. Esses microrganismos poderiam acelerar o processo de degradação do combustível, formando borras, lacas ou vernizes.

Para verificar se o comportamento das misturas estava relacionado especificamente com as condições do local foi montado um novo experimento em outro local climatizado com temperatura controlada de 22 °C e umidade de aproximadamente 60%, Figura 4(a). No dia 10 de julho, 37 dias após a preparação das misturas, apareceu uma segunda fase no fundo da garra que continha a amostra B20E10, Figura 4(b).

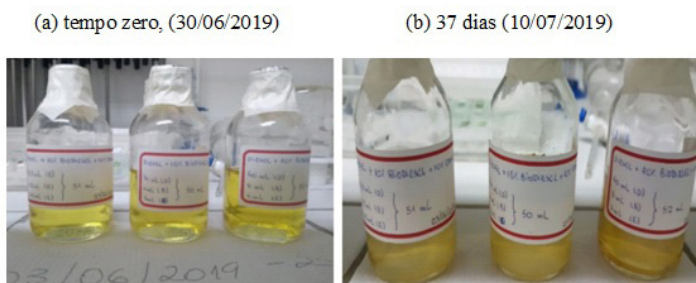


Figura 4. Aparência das misturas durante o período do experimento

O teor de água identificado na amostra (S10 + 20% biodiesel + 10% etanol), quando formada a segunda fase, foi de 4650 mg/kg. Também muito próximo dos valores identificados nesta mistura nos experimentos anteriores.

Após 62 dias a preparação das misturas, o experimento foi interrompido por considerar este período de tempo suficiente para o consumo da mistura em larga escala. A amostra B10E10 ainda permanecia homogênea. O teor de água identificado na amostra (S10 + 15% biodiesel + 10% etanol), quando interrompido o experimento, foi de 4109 mg/kg, valor ligeiramente superior aos teores que provocaram a separação das fases nos experimentos realizados a 10 °C e 22 °C (sala de cultivo de microalgas), condições nas quais 4089 e 4103 mg/kg, respectivamente, provocaram o aparecimento de uma segunda fase.

Os novos resultados do estudo de estabilidade realizado a 22 °C, mas agora em local diferente da sala de cultivo de microalgas, corroboram a hipótese de que uma possível contaminação microbiológica provocou a alteração na coloração das amostras, degradando o combustível e propiciando a formação de produtos secundários no fundo das garrafas.

É importante destacar que o aumento do teor de biodiesel nas misturas, conforme esperado, aumenta a quantidade de água solubilizada na amostra atuando como um cossolvente. No entanto, as propriedades higroscópicas do biodiesel contribuem para uma maior absorção de água do ambiente, fazendo com que as misturas com maior teor de biodiesel fiquem estáveis por um tempo igual ou menor que suas homólogas formuladas

com menor teor de biodiesel.

Ésteres metílicos de ácidos graxos vêm sendo largamente estudados como aditivos promotores da mistura diesel-etanol. Diversas patentes são descritas por Ahmed Irshad (2003) na utilização de álcoois etoxilados e ésteres como aditivos para melhorar a estabilidade das misturas diesel-etanol. (IRSHAD AHMED., 2003) Depósitos de patentes brasileiras com a utilização de ésteres de ácidos graxos de álcoois metílicos, etílicos, cíclicos ou aromáticos ou ainda polióis etoxilados para efeito promotor na mistura diesel-etanol também são encontrados na literatura. (CAMPI A. R, 1999a, 1999b) Esses trabalhos mostram que a adição de 1 a 2% (em volume) de aditivo é capaz de promover uma mistura normalmente inferior a 15% de etanol anidro em diesel. Estes aditivos, cuja função é impedir a separação de fases, atuam como cossolventes nas misturas álcool ao diesel.

### 3.3.3 Estudo de estabilidade à temperatura ambiente, sem controle

A exemplo dos dois primeiros experimentos, o início deste também se deu em 30 de janeiro de 2019 e a umidade na sala era de 60%. As temperaturas às quais as amostras estiveram sujeitas durante o experimento estão concatenadas na Tabela 8.

Mês	Mínima média (°C)	Média (°C)	Máxima média (°C)
Fevereiro de 2019	24	28	32
Março de 2019	24	27	31
Abril de 2019	23	27	30

Tabela 8. Temperaturas médias para os meses do experimento, Fonte: dados de AccuWeather.

A seguir, na Figura 5(a), são mostradas as amostras no início do experimento e Figura 5(b) as imagens registradas durante o tempo de duração do estudo (90 dias).

(a) tempo zero, (30/01/2019)

(b) 90 dias (3 meses, 02/05/2019)

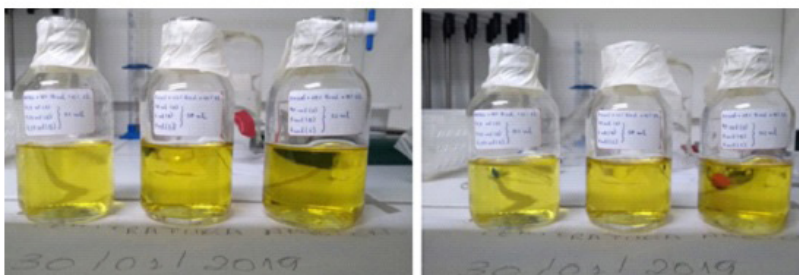


Figura 5. Aparência das misturas durante o período do experimento

Após de três meses de observação às amostras estocadas à temperatura ambiente continuavam homogêneas e apresentavam os seguintes teores de água descritos na Tabela 9 a seguir.

Amostra	Teor de água (mg/kg)
B10E10	441
B15E10	451
B20E10	494

Tabela 9. Teor de água após 90 dias de observação

Os resultados mostram que, nas condições avaliadas neste item, as misturas absorveram menor quantidade de água do que se comparadas às condições de 10 e 22 °C. Com isso conclui-se que quanto mais baixa é a temperatura, maior é a absorção de água pelas misturas e consequentemente menor a estabilidade das mesmas.

A seguir a Tabela 10 apresenta os resultados do estudo de estabilidade realizado.

Amostra	10 °C, 46% UR		22 °C, 52% UR		Sem controle	
	Tempo (dias)	Água (mg/kg)	Tempo (dias)	Água (mg/kg)	Tempo (dias)	Água (mg/kg)
B10E10	4	4089	30	4103	90	441
B15E10	4	4518	30	4566	90	451
B20E10	4	4611	30	4635	90	494

Tabela 10. Resultados do estudo de estabilidade das misturas

## 4 | CONCLUSÃO

No presente trabalho os combustíveis formulados a partir de misturas compostas por etanol, biodiesel e diesel se mostraram viáveis para a utilização em motores ciclo Diesel. A adição de etanol e biodiesel ao diesel não atua de forma deletéria, no que tange à especificação, nas novas qualidades de combustíveis formuladas. Os parâmetros medidos se mantiveram dentro dos intervalos estabelecidos nas especificações ou acima do mínimo requerido, com exceção do ponto de fulgor, algo já esperado, dado o baixo ponto de fulgor do etanol.

O estudo de lubricidade mostrou que a presença de biodiesel nas misturas permitiu melhorar as características lubrificantes dos combustíveis formulados, propriedade prejudicada pela adição do etanol. Nas concentrações testadas verificou-se um aumento da lubricidade das misturas em relação ao combustível diesel, diminuindo o diâmetro da cicatriz de desgaste formada ao final dos ensaios. Isto se traduz em um menor desgaste

relacionado ao atrito relativo entre as superfícies por onde o combustível flui.

Com relação ao estudo de estabilidade, os resultados variaram bastante, de razoáveis a bons, indicando a necessidade de cautela na utilização das misturas combustíveis, a exemplo do que é consagrado com relação ao ponto de entupimento de filtro a frio nas diferentes regiões do país, em diferentes períodos do ano.

Uma conclusão clara nestes resultados é que teores mais elevados de biodiesel conseguem solubilizar maior quantidade de água, comprovando seu caráter cossolvente. Contudo, devido ao fato de ser mais higroscópico que o diesel de petróleo, termina absorvendo maior quantidade de água do ambiente, levando de igual forma à separação da mistura. Ou seja, o aumento do teor de biodiesel não colaborou para aumentar o tempo de estabilidade da mistura.

Medidas adicionais para mitigar a presença de água no combustível (um fator crítico para a vida útil do motor) como: adição de aditivos para coalescência, instalação de respiradouros dessecantes e especial atenção às boas práticas de armazenamento e manuseio devem ser implementadas.

## AGRADECIMENTOS

UFRJ, CNPq, CAPES, FAPERJ.

## REFERÊNCIAS

ANP. **Etanol**. 2019. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/etanol>.

ANP BRASIL. Resolução ANP número 45, de 26 de agosto de 2014. Dispõe sobre a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializ. **Diário Oficial da União**, [S. l.], 2014.

ANP BRASIL. BRASIL. Resolução ANP número 764, de 20 de dezembro de 2018. Estabelece as especificações dos combustíveis de referência utilizados nos ensaios de avaliação de consumo de combustível e de emissões veiculares para a homologação de veículos automotores novo. **Diário Oficial da União**, [S. l.], 2018.

ARMAS, O.; GÓMEZ, A.; MATA, C.; RAMOS, A. Particle size distributions from a city bus fuelled with ethanol–biodiesel–diesel fuel blends. **Fuel**, [S. l.], v. 111, p. 393–400, 2013. DOI: 10.1016/j.fuel.2013.03.036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001623611300224X>.

BAKEAS, Evangelos; KARAVLAKIS, Georgios; STOURNAS, Stamoulis. Biodiesel emissions profile in modern diesel vehicles. Part 1: Effect of biodiesel origin on the criteria emissions. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 409, n. 9, p. 1670–1676, 2011. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969711000611>.

CAMPI A. R, Et al. **Patente: Aditivo para melhorar as propriedades de combustível automotivo**., Depósito de Patente Brasileira-PI9903413-1, 1999. a.

CAMPI A. R, Et al. **Patente: Mistura alcoólica solúvel em óleo diesel**, Depósito de Patente Brasileira-PI9903414-0., 1999. b.

CRUZ, Y. R. **Combustíveis alternativos: mistura de etanol anidro ao óleo diesel para motores de ciclo diesel com sistema de injeção de bomba rotativa**. 2019. UFRJ, [S. l.], 2019.

IRSHAD AHMED. **Patente: Diesel fuel composition**, US Patent 6, 306, 184., 2003.

MITCHELL, Ken. “Diesel Fuel Lubricity – Base Fuel Effects”. **SAE Transactions (2001):** ., [S. l.], v. 110, p. 37–1128, 2001. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/44742720>.

ONU. **ONU, Conheça os novos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU**. 2005. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/conheca-os-novos-17-objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel-da-onu/>. Acesso em: 19 set. 2021.

SILVA, Electo; VIEIRA, Rubenildo; MARTINEZ, Juan; HAIKAL, Marco; ROCHA, Mateus; VILASBOAS, Cristina. Gaseificação e pirólise para conversão da biomassa em eletricidade e biocombustíveis. **Biocombustíveis - Volume 1**, [S. l.], p. 1200, 2012.

STACHOWIAK, G. W.; BATCHELOR, A. W. **Engineering Tribology**. 3. ed. Inglaterra: Engineering Tribology, 2005.

TRUJILLO G. **Manual del seminário “Machinery Lubrication & Oil Analysis”**. 1. ed. León.

## EFICIÊNCIA DE INSETICIDAS EM TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJOEIRO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL

Data de aceite: 10/01/2022

### Stella Mendes Pio Oliveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO  
<http://lattes.cnpq.br/3970812588084775>,

### Guilherme Mendes Pio Oliveira

Universidade Estadual de Londrina – UEL, Departamento de Pós-graduação de Agronomia, Campus de Londrina Londrina-PR  
<http://lattes.cnpq.br/3021305688583345>

### Luana Ranieri Massucato

Universidade Estadual de Londrina – UEL, Departamento de Pós-graduação de Agronomia, Campus de Londrina Londrina-PR  
<http://lattes.cnpq.br/8998362843162768>

**RESUMO:** O tratamento de sementes é uma ferramenta fundamental para estabelecer um excelente estande inicial e máxima proteção contra ataques de pragas na cultura do feijão, pois, trata-se de uma cultura que abrange diversos artrópodes que comprometem sua produtividade durante seu ciclo de desenvolvimento. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficiência dos inseticidas no controle de pragas, durante desenvolvimento inicial do feijoeiro. O trabalho foi conduzido na fazenda experimental da (UFGD), localizada em Dourados-MS, conduzida durante a 3ª safra do feijão, sendo utilizada a cultivar IPR Curió. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados

(DBC), com 4 repetições e 5 tratamentos, totalizando 20 parcelas. O dimensionamento da parcela foi de 5 m de comprimento e 2,25 m de largura e fileiras espaçadas a 0,45 m entre si. Os tratamentos com inseticidas (g i.a. ha<sup>-1</sup>) foram: 1- Tiametoxan (70); 2- Clorraniliprole (62,4); 3- Ciantraniliprole (120); 4- Imidacloprid+Tiodicarb (150+450); 5- Testemunha (água). Os tratamentos não apresentaram diferença significativa quando avaliaram os parâmetros vegetativos, altura de plantas, níveis de desfolhas, massa seca e verde da parte aérea, assim como a germinação. Na 1ª avaliação, os inseticidas apresentaram controle de *B. tabaci*, na 2ª avaliação Clorraniliprole e Ciantraniliprole apresentaram melhor controle de *D. speciosa*, e na 3ª avaliação não houve diferenças para a incidência de pragas. Os componentes vegetativos não foram influenciados, permanecendo iguais a testemunha em todos os tratamentos. Os inseticidas Tiametoxan, Clorraniliprole, Ciantraniliprole, Imidacloprid+Tiodicarb foram mais eficientes no controle da população de *Bemisia tabaci* e *Diabrotica speciosa*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle químico; pragas; *Diabrotica speciosa*.

### EFFICIENCY OF INSECTICIDES IN TREATMENT OF COMMON BEAN SEEDS IN EARLY DEVELOPMENT

**ABSTRACT:** Seed treatment is a fundamental tool to establish an excellent initial crop stand and maximum protection against pest attacks in bean culture because it is a crop that includes several arthropods that compromise its productivity during its development cycle. The present work

was developed with the objective of evaluating the efficiency of insecticides in pest control during initial development of common bean. The work was carried out at the Experimental Farm (UFGD), located in Dourados-MS, conducted during the 3<sup>rd</sup> crop of beans, using the cultivar IPR Curió. The experimental design was randomized blocks (DBC), with 4 replicates and 5 treatments, totaling 20 plots. The plot size was 5m long and 2.25m wide and rows spaced 0.45m apart. The treatments with insecticides (g i.a. ha<sup>-1</sup>) were: 1-Thiamethoxan (70); 2-Chlorantraniliprole (62,4); 3-Cyantraniliprole (120); 4- Imidacloprid + Thiodicarb (150+450); 5- Witness (water). The treatments did not present significant difference when they evaluated the vegetative parameters, plant height, defoliation levels, dry mass and shoot green, as well as germination. In the 1<sup>st</sup> evaluation, the insecticides presented control of *B. tabaci*, in the 2<sup>nd</sup> evaluation Chlorantraniliprole and Ciantraniliprole presented better control of *D. speciosa*, and in the 3<sup>rd</sup> evaluation there were no differences for the incidence of pests. The vegetative components were not influenced, remaining equal to the control in all the treatments. The insecticides Tiametoxan, Chlorantraniliprole, Cyantraniprole, Imidacloprid + Thiodicarb were more efficient in controlling the population of *Bemisia tabaci* and *Diabrotica speciosa*.

**KEYWORDS:** Chemical control; Pests; *Diabrotica speciosa*.

## INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta pertencente à família Fabaceae, sendo uma das principais culturas cultivadas em larga escala no Brasil. Sua importância excede o aspecto econômico, por sua relevância enquanto fator de segurança alimentar e nutricional e sua grande importância cultural na culinária de diversos países e culturas (BARBOSA & GONZAGA, 2012).

A estimativa para a safra 2016/17 é que a área plantada com feijão no Brasil alcance de 3.093,800 ha<sup>-1</sup> com produtividade média estimada em 1,076 kg ha<sup>-1</sup> e produção de 3,327,800 toneladas (CONAB, 2017).

A produção apresenta certa sazonalidade que se traduz em três safras não muito bem definidas no tempo. A 1<sup>a</sup> safra ou “safra das águas” (também chamada de “safra do Sul e Sudeste”) é colhida durante novembro a março, com maior atividade em dezembro; sua semeadura é realizada entre agosto e outubro, estendendo-se até novembro e dezembro. A 2<sup>a</sup> safra ou “safra da seca” ou “safrinha” (também chamada de “safra do Nordeste e Sudeste”) é colhida durante abril a julho, nesse caso, a semeadura é realizada entre janeiro e abril. A 3<sup>a</sup> safra também é conhecida como “safra de outono-inverno”, “safra do Sudeste” e “safra irrigada”; a semeadura é realizada a partir de maio, com a colheita entre agosto e outubro (BARBOSA & GONZAGA, 2012).

Atualmente, a maioria dos problemas fitossanitários do feijoeiro é causado por insetos, ocorrendo mais de 15 espécies consideradas pragas por todo o Brasil. Diante dessa problemática, pesquisas envolvendo produtos químicos com aplicação via sementes ou foliar tem se tornado uma prática comum, destacando-se o uso de fungicidas, inseticidas, inoculantes, hormônios (LANA et al., 2009).



Nesse contexto, o tratamento de sementes com inseticidas é uma das formas de reduzir perdas ocasionadas pela ação de diversos insetos-pragas que comprometem as partes subterrâneas das plantas novas, desde a sua germinação. Porém, inseticidas que são recomendados para o tratamento de sementes diferencia-se dos aplicados na parte área da planta, por causa da sua ação sistêmica (BARROS, 2001).

Portanto, para uma melhor eficiência no tratamento de sementes é importante que seja levado em consideração as informações sobre o produto, tais como, espectro de ação, toxicologia, efeitos fitotóxicos e compatibilidade com outros produtos (TOLEDO & MARCOS FILHO 1977).

Devido a diversidade e o aumento de pragas, o emprego de inseticidas está cada vez mais abundante nas lavouras de feijoeiro, tornando uma prática constante, no qual implica alto custo de produção, além de dificultar o controle das pragas (EMBRAPA, 2001). Enfim, estudo desse cunho, é de fundamental importância para subsidiar estratégias a fins de obter ganhos na produtividade do feijoeiro. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência dos tratamentos de sementes no controle de insetos/pragas, usando diferentes inseticidas no tratamento de sementes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no período de maio a agosto de 2017, na Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados-MS, situado geograficamente no Centro Oeste do Brasil, na Região sul do Estado do Mato Grosso do Sul. O local situa-se em latitude de 22 ° 14 ' 08 " S, longitude de 54 ° 59 ' 13 " Aw e altitude de 434 m.

O clima de Dourados é classificado como Aw, segundo a classificação de Köppen (Alvarez et al., 2013), que significa presença de verões quentes e invernos secos, com temperatura média anual de 22.6 °C, precipitação média anual de 1.413,1 mm.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo vermelho distroférico típico, de textura muito argilosa (SANTOS et al., 2013).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC) constituídos com 5 tratamentos e 4 repetições, totalizando 20 parcelas. Os tratamentos empregados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tratamentos	Dose g i.a./100 kg de sementes
Tiametoxan	70
Clorantriliprole	62,4
Ciantraniliprole	120
Imicloprid+Tiodicarb	150+450
Testemunha	Água

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no controle de insetos/pragas.

O experimento foi realizado em uma área experimental que vem sendo manejada a alguns anos, com a implantação de diferentes culturas na área. O experimento foi composto por 20 unidades experimentais, cada uma com 5 linhas de 5 m de comprimento e 2,25 m de largura, sendo espaçadas à 0,45 m entre linhas, totalizando uma área de 11,25 m<sup>2</sup> por unidade experimental.

A cultivar em estudo é IPR Curió que se destaca pela precocidade, chegando à fase de maturação fisiológica em aproximadamente 70 dias. Seu potencial produtivo alcança mais de 3,8 toneladas por hectare. É um material que apresenta resistência ao Vírus do Mosaico Comum, Oídio e Ferrugem, é moderadamente resistente ao Crestamento Bacteriano Comum, Murcha de *Curtobacterium* e Murcha de *Fusarium*. A semeadura foi realizada no dia 29 de maio de 2017, de forma manual, semeando 12 sementes m<sup>-1</sup> linear com uma população de 266,666 plantas ha<sup>-1</sup>. Anteriormente, foi realizada adubação de base em todos os tratamentos com a aplicação de 300 kg ha<sup>-1</sup>, do formulado NPK 08-20-20, com base na interpretação da análise química do solo.

No preparo do tratamento de sementes foi utilizado uma seringa dosadora para dosar o volume (mL) do produto e 0,5 kg de sementes de feijão para cada tratamento (Figura 1), sendo adicionadas em sacos plásticos transparentes (15 x 20 cm). Em seguida aplicando-se os produtos contidos nas seringas na borda interior superior do saco plástico formando um anel desta calda viscosa, evitando o contato direto com as sementes. O saco foi atado contendo ar, e de forma manual foi realizado a agitação por cerca de 3-5 min, a fim de homogeneizar o contato do produto sobre as sementes.

Durante o pré-plantio e ao longo do desenvolvimento, a cultura foi mantida irrigada com intervalo de 2 dias. Durante essa fase, foram realizadas capinas manuais visando o controle de plantas daninhas. Posteriormente, 30 dias após a emergência (DAE) foi realizada adubação de cobertura à base de ureia (45% de Nitrogênio) na dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> de N.

**Teste de germinação:** O teste de germinação foi realizado conforme as regras para análise de sementes (RAS) (Brasil, 2009). Em bandejas plásticas contendo uma camada uniforme de areia umedecida, foram semeadas 25 sementes com aproximadamente 1 cm de profundidade, sendo 4 repetições para cada tratamento. No intuito de simular situação a campo, as bandejas foram mantidas em temperatura ambiente, 25 - 30° C. A primeira

contagem da germinação foi realizada conjuntamente com o teste de germinação, através do registro da porcentagem de plântulas normais verificada na primeira contagem do teste, que foi efetuada no quinto dia após a emergência e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

**Incidência de pragas:** Foram realizadas 3 avaliações semanais 30 dias após a emergência, sendo feita a contagem e o monitoramento da incidência de insetos-pragas nos folíolos da terceira folha da emergência até o estágio de 3-4 folhas trifolioladas, amostrando 2 metros nas linhas centrais de plantio, com o auxílio placa branca de plástico. Foram realizadas a identificação das pragas e a contagem de insetos nas plantas.

Especialmente para mosca branca, a amostragem foi realizada em 2 metros da parcela útil nas partes superior e inferior das folhas onde o inseto estava em repouso. Pelo fato de a mosca branca ser transmissora do Vírus do Mosaico Dourado do Feijão (VMDF), não existe nível de controle estabelecido para essa praga, e o seu manejo deve ser realizado de acordo com a época de plantio do feijoeiro.

**Componentes vegetativos:** O nível de desfolha e a altura de plantas foram avaliadas 38 DAE, sendo, o nível de desfolha avaliado visualmente e a altura de plantas medindo-se 5 plantas por tratamentos com o objetivo de verificar o efeito da desfolha nos tratamentos.

No início do florescimento, quando as plantas estavam com 44 DAE, foram coletadas plantas para obtenção da massa verde e seca da parte aérea. Coletou-se 5 plantas ao acaso dentro da parcela útil, com o auxílio de uma pá de ponta que possibilitava remover uma porção do solo. Em laboratório, a parte aérea teve a massa aferida com o uso de uma balança analítica. Após a pesagem, o material foi encaminhado para uma estufa com temperatura constante de 60 °C por 24 h.

Após a obtenção dos resultados, os dados foram submetidos à análise de variância e o teste de normalidade utilizando o software Assisat 7.7. E as médias comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros vegetativos

Verificou-se que os componentes vegetativos (altura de planta, níveis de desfolhas, massa seca e verde da parte aérea), juntamente com a germinação não foram afetados significativamente, permanecendo sem diferenças em relação a testemunha em todos os tratamentos (Figura 1, 2, 3).

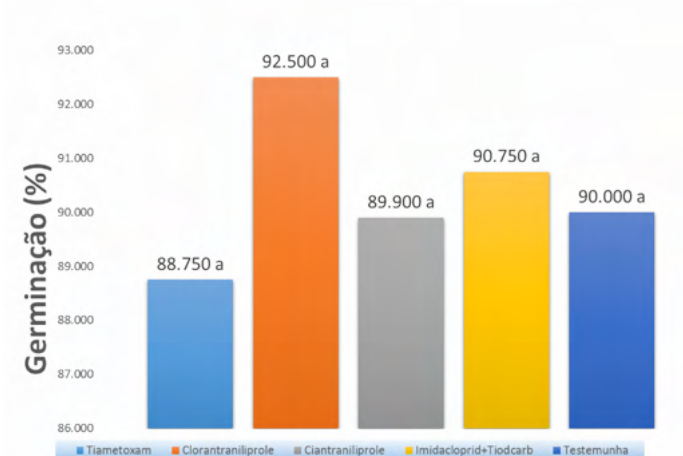


Figura 1. Porcentagem de germinação de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A porcentagem de germinação apresentou índice de germinação acima de 85% em todos os tratamentos. Visto que, os produtos possuem ação inseticida, e não contribui de forma isoladamente para a germinação no processo de tratamento de sementes. Assim, para o estabelecimento de uma lavoura é primordial a utilização de sementes de qualidade ou com alto vigor e germinação, sua ineficiência origina lavouras com baixa produtividade e baixa população de plantas (EVANGELISTA et al., 2015). Geralmente, os testes de germinação de sementes em relação a emergência a campo são superestimados, já que inclui no resultado sementes com vigor insuficiente para emergir em condições subótimas ou desfavoráveis, como normalmente ocorre no campo. Já em função do tamanho das sementes, as sementes maiores, são as mais bem nutridas durante seu desenvolvimento e que normalmente possuem embriões bem formados e com maiores quantidades de reservas, logo, as sementes maiores apresentam maior poder germinativo em torno de 90% em relação as sementes menores (BOTELHO et al., 2010).

Por outro lado, afim de estabelecer um plano de controle de pragas é necessário obter informações relativa à resposta de cada cultivar do feijoeiro à perda de área foliar, altura de plantas em diferentes níveis de desfolha e épocas de desenvolvimento (Figura 2, 3).

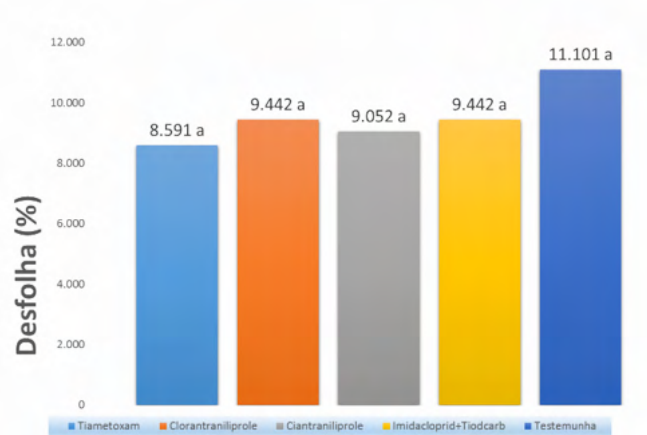


Figura 2. Níveis de desfolha visual em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Silva et al. (2003), avaliando o consumo de desfolhas de forma isolada no desenvolvimento do feijoeiro aos 10, 17, 24, 31 e 38 dias, observaram níveis de desfolha em torno de 25%, 50% e 75% em comparação a testemunha, não interferindo na altura de plantas. Os mesmos autores sugerem que esses danos são causados por algum estresse, uma vez que, a planta que sofre 50 a 75% de desfolha, acarreta perdas de produtividade. Em contrapartida, o presente estudo obteve resultados divergentes, apresentando níveis de desfolha inferiores a 12% em todos os tratamentos, não tendo influência sobre altura de plantas, e consequentemente, não houve diferenças significativas na massa seca e verde da parte área (Tabela 1).



Figura 3. Altura de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Com o emprego dos inseticidas no tratamento de sementes da cultivar IPR Curió, a altura das plantas não se diferenciou da testemunha, havendo uma tendência de maior aumento de alturas de plantas com o tratamento Clorantraniliprole. No entanto, Salgado et al (2011), constataram diferenças significativas de plantas de feijão quando estava avaliando genótipos de diferentes cultivares com sementes tratadas com inseticidas, mas dentro da mesma cultivar não foi constatada diferenças na altura de plantas. Labinas (2002), realizando trabalhos com tratamento de sementes, não encontrou diferenças significativas quando avaliaram a altura de plantas de feijão aos 21 (DAE), o que demonstra conformidade com os resultados obtidos neste trabalho, e que os produtos químicos não interferiram neste parâmetro.

Tratamentos	Massa Fresca (g planta <sup>-1</sup> )	Massa Seca (g planta <sup>-1</sup> )
Tiametoxam	0.082 a	0.015 a
Clorantraniliprole	0.073 a	0.014 a
Ciantraniliprole	0.078 a	0.014 a
Imidacloprid+Tiodcarb	0.074 a	0.013 a
Testemunha	0.063 a	0.012 a
CV (%)	36.83	26.51

Tabela 1. Produção de massa fresca e massa seca da parte aérea, nos diferentes tratamentos com inseticidas.

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O uso de inseticidas no tratamento de semente pode interferir na emergência e no desenvolvimento de sementes no campo. Pois, nem sempre traz benefícios à qualidade fisiológica e muitas vezes podem se tornar tóxicos dependendo do tipo e da dose utilizada (AVELAR et al., 2011). Segundo Oliveira et al. (2015), em sementes de feijão não há relatos sobre o efeito de Tiametoxam e Imidacloprid + Tiodicarb sobre o potencial produtivo da planta. No entanto, em estudo de Pereira (2010) foi constatado que o Tiametoxan proporcionou aumento de área foliar, massa seca da parte aérea e aumento da atividade do nitrato redutase em folhas, e quando realizada a pulverização com esse produto houve o aumento na atividade do nitrato redutase e da fenilalanina amônio liase.

### Ocorrência de pragas

Os níveis de ocorrência de pragas/insetos no experimento, foram relativamente baixos, no entanto, foi possível verificar diferenças no controle, especialmente para mosca branca, vaquinhas e inimigos naturais (Tabela 2, 3 e 4). Na primeira avaliação foram encontradas *Diabrotica speciosa*, *Empoasca kraemeri*, *Lagria villosa*, *Agrotis ipsilon*, *Bemisia tabaci* e inimigos naturais (Tabela 2).

Sendo observadas diferenças significativas somente para *Bemisia tabaci* e inimigos naturais, onde os tratamentos com os ingredientes ativos (Tiametoxan, Clorantraniliprole, Ciantraniliprole, Imidacloprid + Tiodicarb), reduziram significativamente os números de insetos pragas em todos os tratamentos, diferindo apenas da testemunha que se manteve com a população em torno de 30 % a mais sobre as parcelas que receberam o tratamento de sementes.

Tratamentos	<i>Diabrotica speciosa</i>	<i>Lagria villosa</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>	<i>Empoasca kraeumeri</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	I. N.*
Tiametoxan	2.750 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a	1.000 b	0.750 b
Clorantraniliprole	3.250 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a	1.000 b	1.000 b
Ciantraniliprole	3.000 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a	1.000 b	0.500 b
Imidacloprid+Tiodicarb	3.250 a	0.500 a	0.750 a	0.500 a	2.000 b	1.000 b
Testemunha	4.250 a	0.750 a	0.750 a	1.000 a	4.250 a	2.750 a
CV (%)	23.47	40.66	54.86	43.03	43.58	59.41

Tabela 2. Número médio de ocorrência de insetos amostrados durante a 1ª avaliação no feijoeiro sobre diferentes tratamentos, em Dourados, MS; 28 de junho de 2017.

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

\*I.N. = Inimigo Natural

Com relação a segunda avaliação, foram contabilizadas a presença de *Diabrotica speciosa*, *Empoasca kraeumeri*, *Liriomyza* spp., *Frankliniella* sp., *Bemisia tabaci* e inimigos naturais (Tabela 3).

Tratamentos	<i>Diabrotica speciosa</i>	<i>Empoasca kraeumeri</i>	<i>Liriomyza spp</i>	<i>Frankliniella</i> sp.	<i>Bemisia tabaci</i>	I. N.*
Tiametoxan	4.250 a	0.750 a	1.250 a	1.500 a	4.750 a	0.750 a
Clorantraniliprole	1.000 b	0.500 a	0.500 a	0.500 a	4.000 a	0.500 a
Ciantraniliprole	0.750 b	0.500 a	0.500 a	2.000 a	3.250 a	1.000 a
Imidacloprid+Tiodicarb	2.750 ab	0.500 a	0.500 a	1.500 a	4.750 a	0.500 a
Testemunha	5.000 a	1.250 a	1.250 a	1.250 a	6.750 a	1.750 a
CV (%)	52.38	93.13	102.70	76.50	64.42	81.78

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

\*I.N. = Inimigo Natural

Tabela 3. Número médio de ocorrência de insetos amostrados durante a 2ª avaliação no feijoeiro sobre diferentes tratamentos, em Dourados, MS; 05 de julho de 2017.

Foram encontradas diferenças significativas apenas para *D. speciosa*, onde o tratamento de sementes foi realizado com os ingredientes ativos (Clorantraniliprole e

Ciantraniliprole), apresentando uma eficiência de controle de 60%, reduzindo significamente a população comparado com a testemunha.

Na terceira avaliação observou-se efeitos somente sobre a população de inimigos naturais (Tabela 4). Apesar dos tratamentos serem semelhante a testemunha, houve uma expressiva redução de inimigos naturais nas parcelas onde o tratamento de sementes se deu pelos ingredientes ativos (Tiametoxan, Clorantraniliprole). Em análise, considerado a evolução da quantidade de pragas na área, pode –se observar que, na medida que, o tratamento de sementes iria perdendo sua eficácia, houve aumentos na população de *Bemisia tabaci* e *Diabrotica speciosa* nas três avaliações.

Tratamentos	<i>Diabrotica speciosa</i>	<i>Empoasca kraemeri</i>	<i>Liriomyza spp</i>	<i>Frankliniella sp.</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	I.N.*
Tiametoxan	4.000 a	1.000 a	0.750 a	0.500 a	5.000 a	1.000 b
Clorantraniliprole	3.000 a	1.000 a	0.500 a	0.750 a	5.750 a	0.500 b
Ciantraniliprole	2.500 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a	4.750 a	2.000 ab
Imidacloprid+Tiodcarb	2.500 a	1.000 a	0.500 a	1.000 a	6.750 a	3.250 a
Testemunha	4.500 a	0.750 a	1.250 a	1.500 a	8.250 a	2.000 ab
CV(%)	58.29	52.61	93.13	67.92	41.58	46.66

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem se entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

\*I.N. = Inimigo Natural

Tabela 4. Número médio de ocorrência de insetos amostrados durante a 3ª avaliação no feijoeiro sobre diferentes tratamentos, em Dourados, MS; 11 de julho de 2017.

Já Labinas (2002), estudando o efeito de inseticidas na população de pragas do feijoeiro, constatou que aos 28 DAE não houve diferenças entre os tratamentos, devido à grande redução dos insetos na cultura, entretanto, o mesmo fato ocorreu durante a condução deste experimento, no qual a incidência foi muito baixa em todos os tratamentos. Assim, é necessário estudo com maiores níveis populacionais a fim de detectar o nível de dano econômico e com isso determinar o nível de controle para as pragas na cultura do feijoeiro.

## CONCLUSÃO

Os componentes vegetativos, juntamente com a porcentagem de germinação não foram influenciados, permanecendo iguais a testemunha em todos os tratamentos.

Já as avaliações referentes as populações de pragas/insetos, foram afetadas pelo controle. Os inseticidas Tiametoxan, Clorantraniliprole, Ciantraniliprole, Imidacloprid + Tiodicarb foram mais eficientes no controle da população de *Bemisia tabaci* e *Diabrotica speciosa*. Por outro lado, na primeira e terceira avaliação as populações de inimigos naturais também foram afetadas, reduzindo-o significativamente em todos os tratamentos.



## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C. L.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES, G.; LEONARDO, J.; SPAROVEK G. Köppen's climate classification map of Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- AVELAR, S. A. G.; BAUDET, L.; PESKE, S. T.; LUDWING, M. P.; RIGO, G. A.; CRIZEL, R. L.; OLIVEIRA, O. Armazenamento de sementes de soja tratadas com fungicida, inseticida e micronutriente e recobertas com polímeros líquido e em pó. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1719-1725, 2011.
- BARBOSA, F.R. & GONZAGA, A.C.O. 2012. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão. 247p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 272).
- BARROS, R. G.; YOKOYAMA, M.; COSTA, J. L. da S. Compatibilidade do inseticida Thiamethoxam com fungicidas utilizados no tratamento de sementes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p.153-157, jul./dez. 2001.
- BOTELHO, F. J. E.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E.; ELOI, T. D. A.; BALIZA, D. P. Desempenho fisiológico de sementes de feijão colhidas em diferentes períodos do desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 900-907, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2015), disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_05\\_12\\_10\\_37\\_57\\_boletim\\_graos\\_mai\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_12_10_37_57_boletim_graos_mai_2017.pdf) Acesso em: 20 de mai. 2017.
- EMBRAPA. Manejo Integrado de Pragas do Feijoeiro <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/192814/1/circ46.pdf>
- EVANGELISTA, M. L. A.; DE LIMA JÚNIOR, A. F.; DE OLIVEIRA, I. P.; DE SOUZA BRITO, G.; DA SILVA, M. C.; DA COSTA, F. R. Avaliação do tempo de germinação de diferentes variedades de feijão carioca cultivada na região do CENTRO-OESTE DO BRASIL. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 5, 2015.
- HERBES, D.H.; THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C.; PIVA, C.A. & ABREU, L. 2008. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology** 33:153-156.
- LANA, A. M. Q., GUZUEN, C. F.; BONOTTO, I.; TREVISAN, L. R. Aplicação de reguladores de crescimento na cultura do feijoeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.
- LABINAS, A. M. **Controle de pragas na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e avaliação econômica**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MARINGONI, A.C. & CAMARA, R.C. 2006. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective medium. **Brazilian Journal of Microbiology**. 37:451-455.

MENDES DE OLIVEIRA, L.; BRAGA SCHUCH, L. O.; DE LUCENA ALCÂNTARA BRUNO, R.; TEICHERT PESKE, S. Qualidade de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos químicos e armazenadas em condições controladas e não controladas de temperatura e umidade. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, 2015.

PEREIRA, M. A. **Tiametoxam em plantas de cana-deaçúcar, feijoeiro, soja, laranja e café: parâmetros de desenvolvimento e aspectos bioquímicos**. Tese (Doutorado em Ciência) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SALGADO, F. H. M.; FIDELIZ, R. R.; CARVALHO, G. L. de; SANTOS, G. R. dos; CANCELLIER, E. L.; SILVA, G. F. Comportamento de genótipos de Feijão, no período da entressafra, no sul do estado de Tocantins. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 52-58, Jan./Feb. 2011.

SANTOS, H. G. DOS.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. DOS.; OLIVEIRA, V. A. DE.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. DE.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. DE. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

TOLEDO, F.F. & FILHO, J. M. 1977. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. Agronômica Ceres, São Paulo. 224p.

# CAPÍTULO 21

## ANÁLISE DA APLICAÇÃO DO JOGO DIDÁTICO “ECOLOGIA NO LABIRINTO” PARA OS ALUNOS DO ENSINO MÉDIO

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 08/11/2021

### Milena Resende Nascimento

Instituto Federal do Triângulo Mineiro - IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/7082972203762708>

### Mariana Fideles Ferreira

Instituto Federal do Triângulo Mineiro - IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/1977963013075345>

### Francielli Felix da Silva Isaias

Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/7966735772918937>

### Mayra Luzia da Cruz e Souza

Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/9525355482555119>

### Frederico Miranda

Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/5202933866735766>

### Polyanna Miranda Alves

Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/2421784475442376>

### Polyane Ribeiro Machado

Escola Estadual Nossa Senhora da Abadia  
Uberaba – Minas Gerais  
<http://lattes.cnpq.br/8597062189132795>

**RESUMO:** Diante das mudanças adquiridas com o ensino remoto, os jogos didáticos têm se mostrado adequado, para promover um desempenho dos alunos. O jogo “Ecologia no Labirinto” foi aplicado aos alunos do 1º ano do Ensino Médio de uma escola pública e que teve como objetivo geral obter um maior desempenho escolar com os jogos *online* nas plataformas digitais. Em um questionário feito pela plataforma *Google Forms* que tinham perguntas, como por exemplo, se os alunos tinham gostado do jogo, desenvolvido na plataforma *WordWall*; percebemos que o resultado do jogo foi satisfatório, pois boa parte dos alunos respondeu que gostaram do jogo e que este contribuiu para o seu aprendizado. Conclui-se então que o jogo didático “Ecologia no Labirinto” obteve uma resposta significativa para um melhor desempenho dos estudos destes alunos. Contudo, é necessário que os professores abordem com mais frequência os jogos didáticos para seus alunos, como forma de revisão de conteúdo, além de promover uma aula mais dinâmica, interativa e lúdica entre os alunos, contribuindo assim com um ensino aprendizado mais significativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Jogo Didático, Ecologia, Ensino-Aprendizado.

### ANALYS OF THE APPLICATION OF THE DIDACTIC GAME “ECOLOGIA IN THE LABYRINTH” TO HIGH SCHOOL STUDENTS

**ABSTRACT:** Faced with the changes acquired with remote teaching, the didactic games have proved adequate, to promote a performance of the students. The game “Ecology in the Labyrinth”

was applied to students of 1<sup>o</sup>; high school year of a public school and had as its general objective to obtain a higher school performance with online games on digital platforms. In a questionnaire made by the platform Google Forms that had questions, as for example, if the students had liked the game, developed on the platform Wordwall; We realized that the result of the game was satisfactory, because most of the students answered that they liked the game and that it contributed to their learning. It is concluded that the didactic game “Ecology in the Labyrinth” got a significant response to a better performance of the studies of these students. However, it is necessary for teachers to approach didactic games more frequently for their students, as a form of content review, in addition to promoting a more dynamic, interactive and playful class among students, thus contributing to a more significant learning teaching.

**KEYWORDS:** Didactic Game, Ecology, Teaching-Learning.

## 1 | INTRODUÇÃO

Diante das mudanças adquiridas com o ensino remoto, os jogos didáticos têm se mostrado uma alternativa acessível com resultados promissores.

Mediante as mais variadas adversidades do ensino é necessário a adequação, a fim de promover um melhor desempenho dos alunos, que por sua vez são estimulados com ferramentas que já fazem parte da sua vivência fora do ambiente escolar.

O jogo “Ecologia no labirinto” foi aplicado aos alunos do 1<sup>o</sup> ano do Ensino Médio de uma escola pública e teve como objetivo geral obter um maior desempenho escolar com os jogos *online* nas plataformas digitais e assim, realizar uma revisão de conteúdo de maneira animada, proporcionando aos alunos um maior interesse pela matéria e a metodologia desenvolvida.

## 2 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando-se em consideração as respostas do questionário elaborado no *Google Forms*, o qual continha perguntas, como por exemplo: se obtiveram dificuldades ao responder as questões; se teriam gostado; se a aplicação do jogo teria os ajudado a estudar o conteúdo etc., sobre o jogo “Ecologia no Labirinto” desenvolvido na plataforma *Wordwall*, percebemos que o resultado do questionário foi satisfatório de forma geral, pois boa parte dos alunos responderam que gostaram da aplicação do jogo, e que o jogo contribuiu para o aprendizado e que se sentiram mais estimulados em aprender o conteúdo.



Figura 1. Jogo “Ecologia no Labirinto”

Você acha que os jogos online podem contribuir para o seu aprendizado no conteúdo de Biologia?

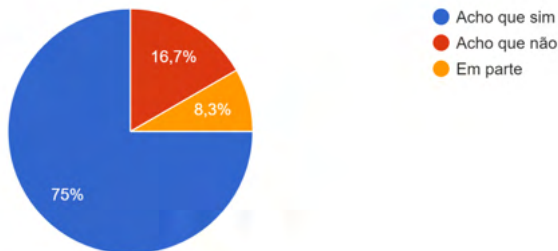


Figura 2. Resposta de uma pergunta do questionário.

### 3 | CONCLUSÕES

Conclui-se então que a aplicação do jogo didático “Ecologia no Labirinto” obteve uma resposta significativa para um melhor desempenho dos estudos destes alunos. Contudo, é necessário que os professores abordem com mais frequência os jogos didáticos para os seus alunos, sobre os conteúdos ministrados dentro da sala de aula. Pois assim, os alunos podem observar as suas dificuldades e posteriormente, retirar as suas dúvidas; obter uma maior fixação do conteúdo; e se sentirem mais motivados em aprender o conteúdo ministrado. Os jogos didáticos, além de ser uma forma utilizada para a revisão de conteúdo, também promove uma aula mais dinâmica, interativa e lúdica entre os alunos, além de se obter uma maior aproximação entre professor e aluno, contribuindo assim com um ensino-

aprendizado mais significativo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFTM e a CAPES por proporcionar a visão prática da docência, aos alunos do 1º ano do Ensino Médio que propuseram um pouco do seu tempo para jogar e responder o questionário sobre o jogo.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, LIANE CASTRO de. ARTIGO - **JOGOS COMO RECURSOS DIDÁTICOS NA ALFABETIZAÇÃO: O QUE DIZEM E FAZEM AS PROFESSORAS**. *Educ. rev.*, Belo Horizonte , v. 36, e220532, 2020 .

FONTANA PIFFERO, Eliane de Lourdes et al. **Metodologias Ativas e o ensino de Biologia: desafios e possibilidades no novo Ensino Médio**. *Ensino & Pesquisa*, [S.l.], jul. 2020.

## AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM INDIVÍDUOS COM TALASSEMÍAS ALFA E BETA E CORRELAÇÃO COM A INCIDÊNCIA NO MUNICÍPIO DE ASSIS E REGIÃO

Data de aceite: 10/01/2022

### **Julia Amanda Rodrigues Fracasso**

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista  
Assis-SP, Brasil

### **Luiz Fernando Moraes-Silva**

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista  
Assis-SP, Brasil

### **Guilherme de Oliveira-Paes**

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista  
Assis-SP, Brasil

### **Luisa Taynara Silvério da Costa**

Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho  
Assis-SP, Brasil

### **Maria José Malagutti-Ferreira**

Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho  
Assis-SP, Brasil

### **Lucinéia dos Santos**

Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho  
Assis-SP, Brasil

### **Renata Aparecida de Camargo Bittencourt**

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista  
Assis-SP, Brasil

o levantamento de dados que demonstrem a incidência e prevalência grupo de talassemias na região de Assis/SP. Métodos: Foi realizado o levantamento da incidência de talassemia alfa (Tal- $\alpha$ ) e beta (Tal- $\beta$ ) nos últimos 10 anos (2009/2019), bem como a verificação da prevalência dos casos, sexo, idade e análise de eletroforese da hemoglobina, por meio da análise dos prontuários dos pacientes que apresentam Tal- $\alpha$  ou  $\beta$ . Resultados: Os prontuários para Tal  $\alpha$  e  $\beta$  foram 2,1% positivos ao total. Assim, o sexo feminino apresenta um total de 63,64% de  $\alpha$  e  $\beta$ , enquanto o sexo masculino 36,36%. Os casos de Tal- $\alpha$  e  $\beta$  em função da idade, Tal- $\alpha$  atinge pessoas com idade > 42 anos. Tal- $\beta$  atinge pessoas com idade > 21 anos. A eletroforese da hemoglobina, mostrou que cadeias alfas e betas apresentam alto índice entre 1,0/2,0 kD para Tal- $\alpha$ , sendo 67,5% dos 40 confirmados. Igualmente, das 15 confirmações de Tal- $\beta$ , tendo seu maior índice entre 2,1/3,1 kD, sendo de 46,67% e 5,4/6,4 kD, ambos com 13,33%. A cidade de Assis apresentou 61,82% dos casos, sendo 72,50% para  $\alpha$  e 33,33% para  $\beta$ . Destarte, de que para os casos de Tal- $\alpha$ , há uma correlação positiva fraca entre idade e número de casos, obtendo o  $r = 0,25593$  e para os casos de Tal- $\beta$  não há correlação entre a idade e o número de casos, obtendo o  $r = 0,08451$ . A frequência absoluta (FI) dos casos foram uniforme para Tal- $\alpha$  sendo que não houve repetição do número de casos, enquanto Tal- $\beta$  a FI dos casos tiveram repetições de casos. Conclusão: Em síntese, os dados obtidos através dos prontuários médicos foram satisfatórios e de grande valia para cidade de Assis e região, bem como, a confecção do

**RESUMO:** Objetivo: O presente trabalho efetuou

folheto informativo sobre talassemias e disponibilização ao SUS.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hematologia, Talassemias, Epidemiologia.

**ABSTRACT:** Objective - The present work carried out a survey of data demonstrating the incidence and prevalence of thalassemia in the Assis region. Methods - In this sense, the incidence of alpha thalassemia (Tal- $\alpha$ ) and beta thalassemia (Tal- $\beta$ ) in the last 10 years (2009/2019) was investigated, as well as the verification of the prevalence of cases, sex, age and analysis of hemoglobin electrophoresis, through the analysis of medical records of patients with Tal- $\alpha$  or Tal- $\beta$ . Results - In total, positive cases for Tal  $\alpha$  and  $\beta$  were 2.1%. In regarding the female sex has a total of 63.64% of  $\alpha$  and  $\beta$ , the male sex has 36.36%. Then, the cases of Tal- $\alpha$  and  $\beta$  as a function of age, Tal- $\alpha$  affects people over the age of 42 years. Tal- $\beta$  affects people over 21 years of age. Furthermore, hemoglobin electrophoresis showed that alpha and beta chains have a high index between 1.0/2.0 kD for Tal- $\alpha$ , with 67.5% of the 40 confirmed. Besides, of the 15 confirmations of Tal- $\beta$ , with its highest index between 2.1 / 3.1 kD, being 46.67% and 5.4 / 6.4 kD, both with 13.33%. The city of Assis presented 61.82% of the cases, 72.50% for Tal- $\alpha$  and 33.33% for Tal- $\beta$ . Briefly, for Tal- $\alpha$  cases, there's a weak positive correlation between age and number of cases, obtaining  $r = 0.2593$  and for Tal- $\beta$  cases there isn't correlation between age and number of cases, obtaining  $r = 0.08451$ . The absolute frequency (FI) of the cases was uniform for Tal- $\alpha$ , without repetition of the number of cases, while Tal- $\beta$  for FI of the cases had repetition of cases. Conclusions - Finally, the data obtained from medical records were satisfactory and of great value for the city of Assis and region, as well as the preparation of the information leaflet on thalassemia and availability to SUS.

**KEYWORDS:** Hematology, Thalassemias, Epidemiology.

## INTRODUÇÃO

A Hematologia é a especialidade médica que estuda as doenças que envolvem o sistema hematopoiético, ou seja, tecidos e órgãos responsáveis pela proliferação, maturação e destruição das células do sangue (hemácias, leucócitos e plaquetas). O tecido sanguíneo é composto por uma parte líquida (o plasma) e outra celular (hemácias, plaquetas e leucócitos). O plasma contém proteínas que desempenham a função de defesa do organismo, as hemácias transportam o oxigênio para todo o organismo e as plaquetas controlam sangramentos e os leucócitos combatem infecções<sup>1</sup>.

Deste modo, qualquer alteração pode levar a um diagnóstico clínico de alguma patologia. Por essa razão é muito comum médicos solicitarem hemogramas através de suspeitas de patologias hematológicas<sup>2</sup>. As doenças hematológicas podem ser classificadas como Anemias (autoimune, hemolíticas e megaloblásticas), Alterações de Coagulação: púrpuras e hemofilias, entre outras e Doenças proliferativas e infiltrativas: leucemias, linfomas e mielodisplasias<sup>2</sup>.

Destarte, às hemoglobinopatias são consideradas como uma das doenças genéticas mais comuns em todo o mundo, com prevalência de portadores heterozigotos de seus



principais tipos em aproximadamente 5% da população mundial. Devido à heterogeneidade clínica e genética dessas alterações genéticas é fundamental estabelecer a investigação laboratorial das diferentes formas de hemoglobinas variantes e de talassemias<sup>3</sup>.

Nesse contexto, hemoglobinas possuem padrão de herança definido geneticamente e que apresentam variações polimórficas características dentro de nossa população, na dependência dos grupos raciais que formam cada região. Às variantes das hemoglobinas ou talassemias, mais frequentes, no Brasil, são os tipos S e C e as talassemias alfa e beta, todas na forma heterozigota. As hemoglobinas anormais apresentam variações como Hb S, Hb C, Hb Instáveis entre outras as talassemias: alfa, beta, beta/delta, entre outras<sup>4</sup>.

Salienta-se que a complexidade molecular das hemoglobinopatias na grande maioria são: hemoglobinas instáveis descritas que devem a trocas de aminoácidos neutros, ex: prolina por treonina, tirosina por leucina, entre outros. Essas substituições de aminoácidos não causam alterações de cargas elétricas, portanto, não alteram o ponto isoelétrico da hemoglobina mutante. Por essa razão, dificilmente às hemoglobinas instáveis apresentam posições eletroforéticas ou cromatográficas diferentes da Hb A<sup>3</sup>.

Indubitavelmente, a Talassemia Alfa (Tal- $\alpha$ ) e Talassemia Beta (Tal- $\beta$ ) são um dos distúrbios hereditários mais comuns do mundo em desenvolvimento e está associada à anemia grave e dependência de transfusão ressalva alguns casos. O impacto da talassemia na saúde global tem aumentado como resultado da mobilidade humana e da migração nos últimos anos. Dependendo das mutações hereditárias, os pacientes com talassemia apresentam padrões distorcidos de hemoglobina (Hb) e índices de hemácias desviados, os quais podem ser usados para apoiar a identificação por ferramentas de diagnóstico<sup>5-6</sup>.

Diante desse panorama as suas manifestações clínicas a classificam-a como anemia, sendo considerada uma patologia hematológica, encontrada através do hemograma, sua etiologia é de cunho genético e geograficamente advindo de países tropicais e subtropicais, como também, a literatura descreve como uma vantagem evolutiva de seus portadores devido a exposição dos indivíduos a patologias como a malária no continente Africanos, por exemplo<sup>7</sup>.

Deste modo, a Tal- $\alpha$  é herdada como um distúrbio autossômico recessivo caracterizado por uma anemia microcítica hipocrômica e um fenótipo clínico que varia de quase assintomática a uma anemia hemolítica letal. Na Tal- $\alpha$  ocorre por defeitos herdados na expressão dos genes do cromossomo 16. Há quatro categorias, de acordo com o nível de expressão dos genes; (1) uma forma assintomática ou portador silencioso, com perda de um único gene (-a /aa); (2) o traço alfa talassêmico, no qual há perda de dois genes alfa de um único cromossomo (--/aa) ou de um gene a de ambos os cromossomos (-a /-a); (3) a doença da hemoglobina H, na qual apenas um gene alfa é funcional (--/- a) e (4) a hidropsia fetal, caracterizada pela ausência dos quatro genes (--/--)<sup>8-10</sup>.

Já a Tal- $\beta$  ocorre quando há uma redução das cadeias beta da globina que se encontram estruturalmente normais. É causada por mutações heterogêneas que afetam

o locus da cadeia da beta-globina do cromossomo 11. Esses defeitos genéticos levam a reduções variáveis da beta-globina, variando de mínimo déficit, como ocorre na Tal- $\beta$  menor, até a ausência completa, como na Tal- $\beta$  maior. Destarte, a síntese da cadeia alfa é normal, resultante de os genes da alfa-globina não serem afetados, o que desenvolve um acúmulo de precursores eritróides, originados no excesso de alfa-globina não-pareada, a qual não é capaz de formar tetrâmeros viáveis, produzindo corpúsculos de inclusão que são responsáveis pela destruição intramedular extensa de precursores eritróides, sendo os causadores da eritropoiese ineficaz que caracterizam a Tal- $\beta$ <sup>11-13</sup>.

Haja vista, a presente pesquisa reuniu os dados sobre a expressividade desta patologia na região de Assis, Estado de São Paulo, bem como, um estudo epidemiológico para que se tenha o conhecimento do número de casos presentes dentre 10 anos (2009/2019). Em síntese, para que tenha-se informações que contemplem o estudo científico nacional, como também regional a cerca do perfil hematológico, através da eletroforese de hemácia como um importante exame ao diagnóstico e diferenciação de talassemias, por fim, é necessário que a população conheça exames hematológicos e possua mais contato com Unidades Básicas de Saúde (UBS), deste modo, a estratégia dessa pesquisa foi a entrega de folhetos informativos (Anexo 1 e 2) que gerem a universalização e acessibilidade de maneira didática a hematologia.

## METÓDOS

Foram incluídos todos os prontuários de pacientes que manifestaram a patologia e encontrados no banco de dados da Clínica Renascer dentre 10 anos (2009/2019) que obtiverem confirmação diagnóstica de Tal- $\alpha$  e Tal- $\beta$ . Deste modo, foram analisados 2.616 prontuários de ambos os sexos e idades, dentro desse total, 40 prontuários foram positivos para Tal- $\alpha$  e 15 prontuários confirmados para Tal- $\beta$ . Estes foram coletados através dos prontuários médicos arquivados no sistema da Clínica Renascer da cidade de Assis-São Paulo, juntamente com o termo de aceite do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Paulista-UNIP com o número de parecer final n° 4.423.315. Para fins estatísticos ao estudo fo programa Excel 2000, da Microsoft Corporation e os dados obtidos através dos prontuários foram analisados de forma quantitativa por métodos estatísticos embasados segundo MARTINS (2006)<sup>14</sup>; MARIANO (2006)<sup>15</sup>; LAPPONI (2005)<sup>16</sup>, como: distribuição de frequências, média, desvio padrão, correlação linear. Por fim, a estratégia dessa pesquisa foi a entrega de folhetos informativos (Anexo 1 e 2) que gerem a universalização e acessibilidade de maneira didática a hematologia.

## RESULTADOS

Segundo os dados obtidos no Gráfico 1, nota-se que entre 2011 e 2019, 2,1% dos

prontuários apresentaram casos de Tal- $\alpha$  e Tal- $\beta$ , sendo a média de 6,11 pessoas ao ano com desvio padrão DP = 3,62. Dos casos confirmados, o sexo feminino apresenta um total de 63,64% de alfa e Tal- $\beta$ , enquanto o sexo masculino 36,36%.

A Tal- $\alpha$  apresenta um total de 72,73% dos casos confirmados, apresentando uma média de 4,44 pessoas ao ano com desvio padrão de 3,50. Já a Tal- $\beta$  apresenta um total de 27,27%, apresentando uma média de 1,66 pessoas ao ano com desvio padrão de DP = 2. Analisando o número total de casos confirmados, a variância mostra que há uma dispersão relativamente alta sendo V = 13,11. Tal- $\alpha$  também possui uma alta dispersão V = 12,27 e Tal- $\beta$  apresenta uma dispersão relativamente baixa, sendo V = 4.

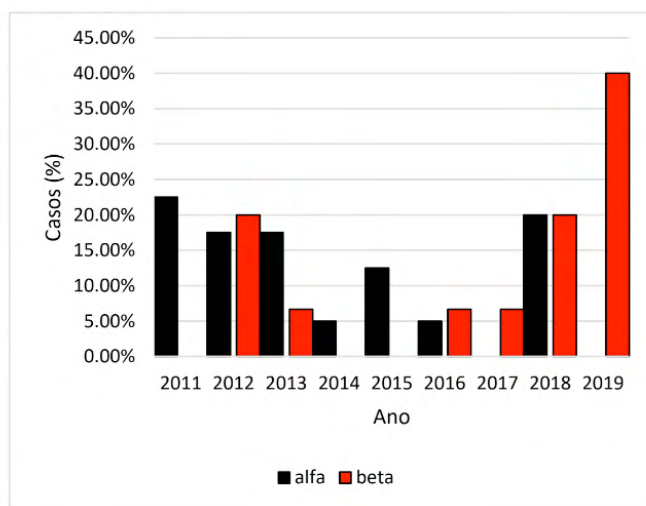


Gráfico 1 – Incidência de casos de Talassemia alfa e beta em dez anos na região de Assis-SP.

Deste modo, interpretando o Gráfico 2, a cidade da região onde foi realizada a pesquisa que apresentou mais casos confirmados de Tal- $\alpha$  e Tal- $\beta$  foi a cidade de Assis com 61,82% dos casos, sendo 72,50% para alfa e 33,33% para beta. A cidade de Platina foi a que apresentou o menor número de casos com 1,82% de Tal- $\alpha$  e Tal- $\beta$ , sendo que Tal- $\beta$  não houve nenhum caso e alfa apresentou 2,5%.

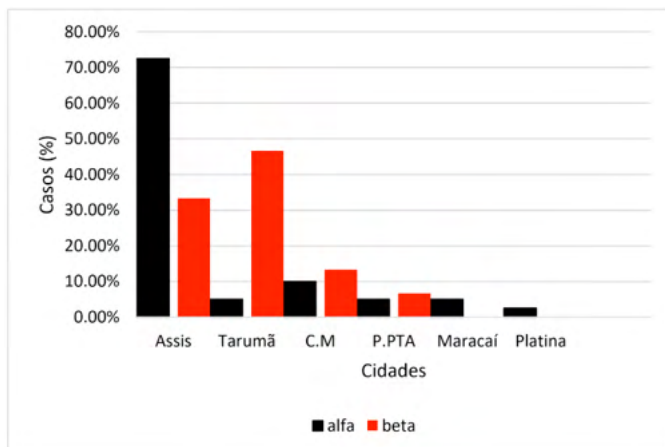


Gráfico 2 – Gráfico de número de casos de talassemia alfa e beta nas cidades na região de Assis-SP em dez anos.

Já em função do sexo, o Gráfico 3 demonstra que Tal- $\alpha$  apresenta um total de 62,5% para o sexo feminino e 37,5% para o masculino. Já a Tal- $\beta$  apresenta 66,67% para o sexo feminino e 33,33% para o masculino.

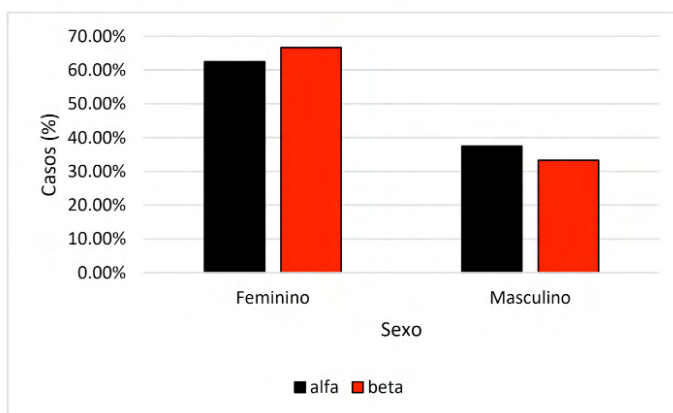


Gráfico 3 – Gráfico de Incidência de casos conforme o sexo dos portadores de Talassemia Alfa e beta em dez anos na região de Assis-SP.

O Gráfico 4, mostra os casos de Tal- $\alpha$  e Tal- $\beta$  em função da idade, Tal- $\alpha$  atinge mais pessoas com idade superior a 42 anos, sendo que dos 40 casos confirmados para Tal- $\alpha$ , 35% possuem idades entre 45 e 62 anos e 47,5% entre 63 e 83 anos.

Já para Tal- $\beta$  atinge mais pessoas com idade superior a 21 anos, sendo que dos 15 casos confirmados 33,33% entre 21 e 41 anos e 26,67% entre 42 e 83 anos.

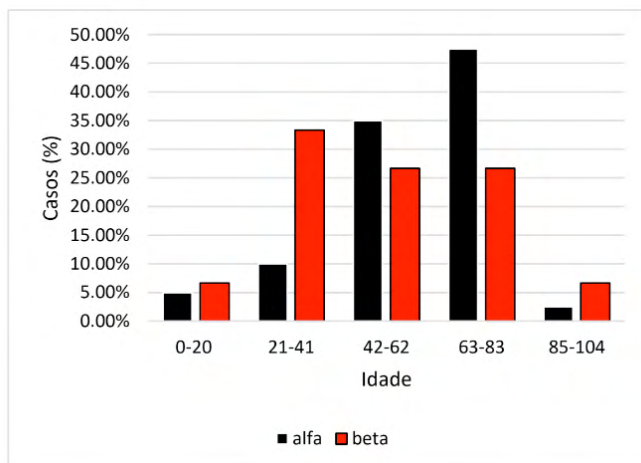


Gráfico 4 – Incidência de casos conforme a idade em anos dos portadores de Talassemia Alfa e beta em dez anos na região de Assis-SP

A Eletroforese da Hemácia e peso molecular das cadeias alfas e betas demonstrada no Gráfico 5, apresentou um alto índice entre 1,0 e 2,0 kD para alfa, sendo 67,5% dos 40 confirmados. Dos 15 confirmados para Tal- $\beta$ , seu maior índice entre 2,1-3,1 kD, sendo de 46,67%.

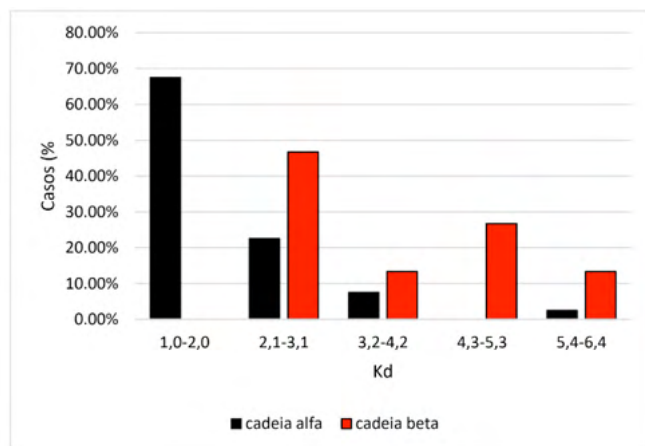


Gráfico 5 - Eletroforese de Hemácia e peso molecular das cadeias alfas e betas.

Pode-se representar graficamente a distribuição de frequência através de histogramas, onde é mostrado a frequência (repetições) de observações para cada valor da variável estudada<sup>15</sup>.

No Gráfico 6 mostra frequência absoluta (FI) dos casos foram uniforme para Tal- $\alpha$  sendo que não houve repetição do número de casos, enquanto no Gráfico 7 para Tal- $\beta$  a FI

dos casos tiveram repetições de caso

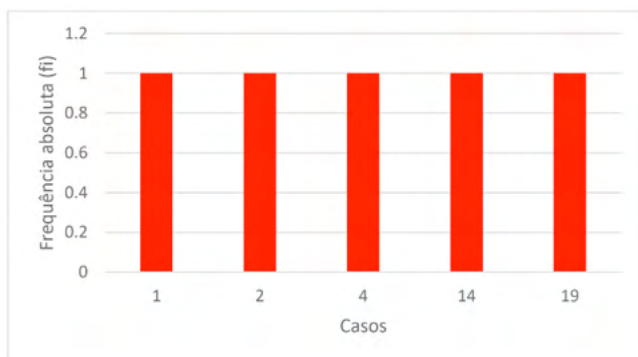


Gráfico 6 – Histograma Talassemia Alfa.

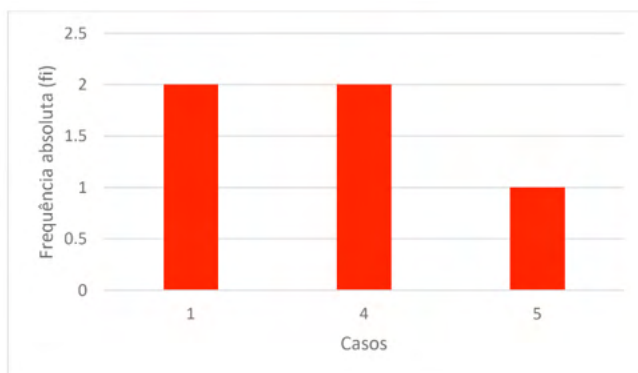


Gráfico 7 – Histograma Talassemia Beta.

A correlação indica o “grau de correspondência”, ou seja, o comportamento conjunto entre duas variáveis, onde a medida de associação é chamada de coeficiente de correlação de Pearson indicado por “ $r$ ”<sup>14</sup>. Com os dados estudados, chegou-se à conclusão de que para os casos de Tal- $\alpha$ , há uma correlação positiva fraca entre idade e número de casos, obtendo o coeficiente de correlação de Pearson  $r = 0,25593$ , observado no Gráfico 8. Analisando o diagrama de dispersão, nota-se um elevado número de casos entre os 62 e 83 anos de idade. Já para os casos de Tal- $\beta$  não há correlação entre a idade e o número de casos, obtendo o coeficiente de correlação de Pearson  $r = -0,08451$ , observado no gráfico 9.

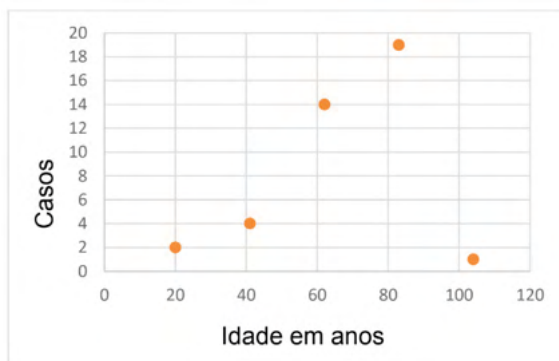


Gráfico 8 – Diagrama de Dispersão Talassemia Alfa.



Gráfico 9 – Diagrama de dispersão Talassemia Beta.

## DISCUSSÃO

Aproximadamente 5% da população mundial apresenta uma variação na parte alfa ou beta da molécula de hemoglobina, sendo classificadas com sintomáticas (nenhum sintoma), como também sintomática (sintomas leves, moderados e graves), deste modo, estatisticamente, 1,7% da população global apresenta sinais em decorrência das mutações genéticas<sup>17</sup>.

As talassemias afetam aproximadamente 4,4 em cada 10.000 nascidos vivos em todo o mundo, estima-se que mundialmente a expressividade de Tal- $\alpha$  é de 0-5% da população possua um traço de Tal- $\alpha$  40% da população pode ser um portador genético. Já a Talassemia beta: 0-3% da população é afetada por esta<sup>17</sup>.

De acordo com a Associação Brasileira de Talassemia<sup>18</sup>, entre 2013 e 2015 o número de pessoas diagnosticadas com as formas graves Talassemias foram de 593 pessoas, trazendo a essa pesquisa, no mesmo período, o número de pessoas diagnosticadas na área estudada (região de Assis) corresponde a aproximadamente 2,67% dos casos. O estudo feito pela Associação Brasileira de Talassemia ainda mostra que 60% dos casos de

talassemia beta grave foram evidenciados na região Sudeste. Os casos na região de Assis correspondem a 4,46% dos casos da região Sudeste.

Em 2010 no Estado de Ceará, na cidade de Fortaleza um Centro Universitário relatou 15 casos positivos para Tal- $\beta$ , no mesmo ano na região de Assis, houve a incidência de nenhum caso, sendo assim, a cidade de Fortaleza com uma expressividade 15x maior do que a cidade de Assis. Observa-se que a região nordestina possui um maior número de casos, a nível Brasil é significativa essa expressão<sup>19</sup>.

No ano de 2014, o Estado do Espírito Santo<sup>20</sup>, 14 casos foram confirmados também para Tal- $\alpha$ , já a região de Assis apresentou 2 casos confirmados para Tal- $\alpha$  no mesmo ano, assim, a expressividade da cidade de Aracruz, Estado do Espírito Santo é superior que de Assis, Estado de São Paulo.

Já no ano de 2018, segundo Ferris (2018)<sup>21</sup>, a cidade de Mirassol, Estado de São Paulo apresentou dentro do seu total de prontuários, 21 casos (18,9%) apresentaram resultado positivo para Tal- $\alpha$ , já na região de Assis, no ano de 2018, 8 (10%) casos foram positivos para talassemia alfa. Assim, no ano de 2018 é notável que foi maior a incidência de casos na cidade de Mirassol, Estado de São Paulo equiparado à Região de Assis, Estado de São Paulo.

Nesse contexto, nota-se que a incidência de Tal- $\alpha$  é superior a Tal- $\beta$ , bem como, o sexo feminino é o mais afetado e a idade de ambas variam. Há poucos estudos que relatem de fato incidências nos respectivos estados do Brasil, como também, não há fácil acesso de informações de incidência e prevalência recentes em banco de dados, tanto em sistemas públicos, quanto em revistas eletrônicas.

Por fim, mostrando uma carência de dados científicos. Deste modo, as talassemias são doenças raras e que devem ser mais estudadas, uma vez que acometem boa parcela da população. Observa-se que a eletroforese de hemácia foi primordial para diferenciação de Tal- $\alpha$  e Beta em todos os estudos presentes que demonstraram alterações hematológicas para às cadeias alfa e beta, diferentemente do presente estudo, não houve disponibilização dos pesos moleculares<sup>19-21</sup>.

## CONCLUSÃO

Em virtude do Brasil ser um país altamente miscigenado e sendo foco de migrações, o período colonial e imperial também marcou intensa heterogeneidade genética, principalmente no estado de São Paulo. Assim, sabe-se a importância da cidade de Assis e a sua região no período da República Café com Leite, uma vez que o Sudeste fora miscigenado com diversas etnias, sendo as Talassemias provenientes do Oriente e África. Atualmente, torna-se necessária a identificação de portadores de talassemia alfa e beta, uma vez que essa doença atinge estatisticamente boa parcela da população.

Indubitavelmente, os dados obtidos através dos prontuários médicos foram



satisfatórios e de grande valia para cidade de Assis e estão sendo diagnosticados corretamente pela técnica de biologia molecular de análise de Eletroforese de Hemácia. Porém, é necessário que a população conheça exames hematológicos e possua mais contato com Unidades Básicas de Saúde (UBS), deste modo, a estratégia dessa pesquisa foi a entrega de folhetos informativos (Anexo 1 e 2) que gerem a universalização e acessibilidade de maneira didática a hematologia.

## REFERÊNCIAS

1. Verrastro T, Lorenzi TF, Neto SW. Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos. Editora Atheneu. 2005. 18-83
2. Dotto, Colpo Rosane Fátima .Talassemias Alfa e Beta. Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul. Tese. 2005. Disponível em: <[https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto\\_Fatima\\_Rosane\\_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto_Fatima_Rosane_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em 20 de Março de 2019
3. Naoum Paulo Cesar, Bonini-Domingos Claudia R.. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29( 3 ): 226-228.
4. Leoneli Guilherme G., Imperial Rodrigo E., Marchi-Salvador Daniela P., Naoum Paulo C., Bonini-Domingos Cláudia R.. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2000; 22(3):396-403.
5. Camus SM, Gausserès B, Bonnin P, Loufrani L, Grimaud L, Charue D, De Moraes JA, Renard JM, Tedgui A, Boulanger CM, Tharaux PL, Blanc-Brude OP. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. Blood. 2012; 13;120(25):5050-8.
6. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T, Gafarova S, Abdulalimov E. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. Clin Chem Lab Med. 2018;57(2).-
7. Weatherall D. The molecular basis for phenotypic variability of the common thalassaemias. Mol Med Today. 1995;1(1):15-20.
8. Wagner Sandrine C., Silvestri Matheus C., Bittar Christina M., Friedrisch João R., Silla Lúcia M. R.. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27(1):37-42.
9. Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. Blood Cells Mol Dis. 2018;70:43-53.-
10. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010;5:13.
11. Silberstein, L, Anastasi J. Hematology: Basic Principles and Practice. 7. ed. Elsevier; 2007. 20-45.
12. Sonati Maria de Fátima, Costa Fernando Ferreira. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. J. Pediatr. (Rio J.) 2008; 84(4): S40-S51.

13. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*, 2010. 5-11.
14. Mariano, MV, Lauricella CM, Frugoli AD. *Estatística Indutiva*, 2006. 15-37.
15. Martins GA. *Estatística Geral e Aplicada*. 3ª ed. Editora Atlas, 2006. 80-102.
16. Laponi JC. *Estatística Usando Excel*. Editora Elsevier Brasil, 2005.
17. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England), 385(9963), 117–171.
18. 1.2,7 milhões de brasileiros são portadores do traço talassêmico. Associação Brasileira de Talassemia. 2018. Disponível em: <<https://www.abrasta.org.br/noticias/27-milhoes-de-brasileiros-sao-portadores-do-traco-talassemico/>>. Acesso em 6 de Setembro de 2019
19. Rocha, Lilliane & Martins, Michelle & Gonçalves, Romélia. (2010). Distribution of  $\beta$ -thalassemia mutations in Fortaleza, Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 46. 437-441.
20. Almeida, TRG. Incidência de talassemia alfa em pacientes com índices eritrocitários abaixo da normalidade na cidade de Aracruz-ES. Aracruz – Espírito Santo. Tese. 2018. Disponível em: <[http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/bibliotecadigital/hematologia/serie\\_vermelha/talasseмииs/9.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/bibliotecadigital/hematologia/serie_vermelha/talasseмииs/9.pdf)>.
21. Ferris DCA. Levantamento Dos Casos De Talassemia Em Pacientes Do Município De Mirassol, SP. Período 02/01/2018 À 20/11/2018. São José Do Rio Preto – São Paulo. Tese. 2018. Disponível em: <[http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/bibliotecadigital/hematologia/serie\\_vermelha/talasseмииs/12.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/bibliotecadigital/hematologia/serie_vermelha/talasseмииs/12.pdf)>.

# Hemograma

## Função

ANALISAR INFORMAÇÕES SOBRE O TIPO E QUANTIDADE DE ELEMENTOS DO SANGUE, COMO:

- GLÓBULOS VERMELHOS
- GLÓBULOS BRANCOS
- PLAQUETAS

## Doenças Hematológicas

ANEMIAS  
TALASSEMIAS  
LEUCEMIAS  
PROBLEMAS NA COAGULAÇÃO

## Onde?

NO POSTO DE SAÚDE VOCÊ DEVERÁ AGENDAR A CONSULTA COM O CLÍNICO GERAL E SOLICITÁ-LO COMO UM EXAME PREVENTIVO.

## Quando Solicitar?

-O SUS OFERECE GRATUITAMENTE  
-CONSULTA DE ROTINA.

# Cuide da sua Saúde!



Fracasso, J  
Bittencourt, R

# Talassemia Alfa & Beta

## O que é?

Através da migração se faz presente no território brasileiro.

São um grupo de doenças hereditárias que passa dos pais para os filhos caracterizada pela alteração dos glóbulos vermelhos levando a anemia.



## Sintomas

**Talassemia Alfa:** Portadores a grande maioria assintomáticos e anemia leve. Alguns casos são graves.

**Talassemia Beta:** Anemia grave  
Fadiga, falta de ar, palidez  
feridas na pele e aumento do baço

## Cuide da sua Saúde!



Fracasso. J  
Bittencourt. CAR

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

**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) e 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 docente no Instituto Federal do Acre -IFAC.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Acetólise 228, 229, 232, 233

Antibiosis 76, 78, 81, 83, 85, 86

Antifungal activity 76, 79, 80, 83, 84, 85, 90, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 175, 176, 177, 179, 180, 181

### B

Benzofenona 207, 209, 213, 214, 219, 224, 225, 226

Biodiesel 149, 150, 154, 162, 163, 251, 252, 253, 256, 258, 260, 261, 262, 263

### C

Câncer 108, 109, 112, 113, 212

Características reprodutivas 183, 185, 199

Células planctônicas 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73

Clínica ampliada 114, 115, 116, 122, 123, 124

Combustíveis 154, 251, 252, 262, 263, 264

Covid-19 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65

### D

Diabrotica speciosa 265, 266, 273, 274

Dislexia 139, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 148

Drogadição 39, 42, 44, 52

Drogas 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 126, 209, 210

Drosophila 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206

### E

Electromagnetic fields 93, 94, 95, 103, 104, 105, 106

Enfermedades genéticas 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 13

Epermatozoide 95, 184, 186, 187, 189, 196, 197

Etanol 109, 149, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 188, 251, 252, 253, 254, 256, 257, 260, 261, 262, 263, 264

Eugenesia 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10

### F

Fatores de virulência 66, 67, 69

Fusarium graminearum 76, 77, 78, 86, 88, 89, 90, 92, 175, 178

## G

Genética 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 44, 93, 202, 283, 290, 291

Genetics 7, 11, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 106, 201, 202, 203, 205

## H

Hibisco 228, 229, 231, 235

*Hibiscus rosa-sinensis* L. 228

## I

Ingeniería genética 1, 7, 8, 9, 10

Inseticida 270, 275

Interdisciplinaridade 114, 117, 118, 121, 126

Intervenção fonoaudiológica 139, 141, 142, 143, 144, 145, 146

## J

Jukart 109

## K

K562 108, 109, 112

## L

*Lactobacillus* 164, 165, 166, 175, 176, 178, 179, 180, 181

Leucemia 109

Levantamento taxonômico 237, 242, 247

Linfoma 109

Lipídios 149, 151, 152, 154, 155, 158, 159, 160, 161, 162, 163

## M

Madurez sexual 127, 129, 131

Marcadores moleculares 15, 16, 18, 20, 21, 27, 28, 29, 33

Medidas eletrofisiológicas 139, 142

Microalga 149, 150, 151, 152, 156, 159, 160, 161, 163, 215

Micronuclei 94, 95, 97, 98, 101, 104

Mycotoxin 77, 78, 87, 89, 90, 92, 165, 166, 176, 177, 179, 180, 181

## O

Octocrileno 207, 209, 213, 216, 217, 219

Óxido nítrico 67, 70, 72

## **P**

Pez león 127, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137

Poluentes 207, 208, 209, 210, 211, 212, 215, 217, 218, 219, 220, 222, 223, 227

Pragas 26, 27, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 272, 273, 274, 275

Professors 34, 35, 37

Pterois volitans 127, 128, 133, 134, 138

## **R**

Reforma psiquiátrica 114, 115, 116, 117, 118, 122, 124, 125

Rio São Francisco 236, 238, 241, 242, 248, 249

## **S**

Saccharomyces cerevisiae 76, 77, 78, 86, 87, 88, 89, 92, 178

Sars-Cov-2 54, 55, 61

Scenedesmus 149, 150, 151, 152, 155, 156, 159, 160, 163

Sequenciamento 14, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28

## **T**

Tiazacridínico 107, 109, 110, 111

## **V**

Vacinação 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 64









2

# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Gênese na formação multidisciplinar

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)





  
Atena  
Editora  
Ano 2022



2

# CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Gênese na formação multidisciplinar

-  [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)
-  [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

  
Ano 2022