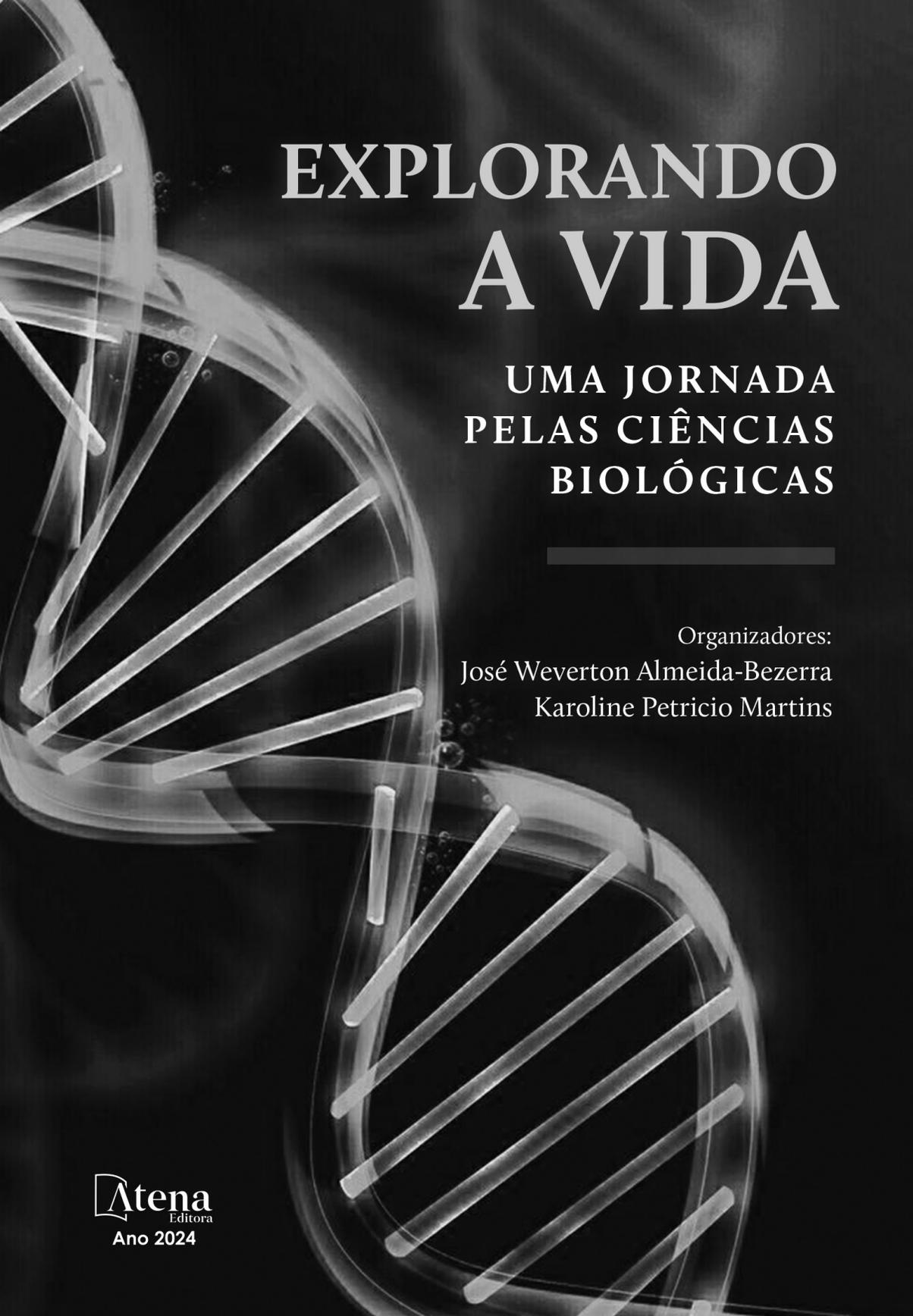


EXPLORANDO A VIDA

UMA JORNADA
PELAS CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Organizadores:
José Weverton Almeida-Bezerra
Karoline Petricio Martins



EXPLORANDO A VIDA

UMA JORNADA
PELAS CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Organizadores:
José Weverton Almeida-Bezerra
Karoline Petricio Martins

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Ellen Andressa Kubisty

Luiza Alves Batista

Nataly Evilin Gayde

Thamires Camili Gayde

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2024 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2024 Os autores

Copyright da edição © 2024 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. Bruno Edson Chaves – Universidade Estadual do Ceará
 Profª Drª Camila Pereira – Universidade Estadual de Londrina
 Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
 Prof. Dr. Cláudio José de Souza – Universidade Federal Fluminense
 Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
 Profª Drª Danyelle Andrade Mota – Universidade Tiradentes
 Prof. Dr. Davi Oliveira Bizerril – Universidade de Fortaleza
 Profª Drª. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
 Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
 Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
 Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
 Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
 Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
 Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
 Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Guillermo Alberto López – Instituto Federal da Bahia
 Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
 Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
 Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr
 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
 Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Kelly Lopes de Araujo Appel – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
 Profª Drª Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá
 Profª Drª Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá
 Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Luciana Martins Zuliani – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
 Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
 Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

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

Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Max da Silva Ferreira – Universidade do Grande Rio

Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

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

Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Renato Faria da Gama – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará

Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Taísa Ceratti Treptow – Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Thais Fernanda Tortorelli Zarili – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade Federal de Itajubá

Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Explorando a vida: uma jornada pelas ciências biológicas

Diagramação: Thamires Camili Gayde
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: José Weverton Almeida-Bezerra
Karoline Petricio Martins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
E96	<p>Explorando a vida: uma jornada pelas ciências biológicas / Organizadores José Weverton Almeida-Bezerra, Karoline Petricio Martins. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-2571-7 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.717241705</p> <p>1. Ciências biológicas. I. Almeida-Bezerra, José Weverton (Organizador). II. Martins, Karoline Petricio (Organizadora). III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 570</p>
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

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

É com grande entusiasmo que trazemos hoje uma apresentação do livro “Ciências da Saúde: Bem-Estar Integral e Qualidade de Vida”. Este compêndio é uma verdadeira jornada através dos avanços, desafios e perspectivas atuais e futuras no campo da saúde, oferecendo uma visão abrangente e integrativa de diversos temas relevantes para o bem-estar humano.

Desde uma análise profunda sobre o manejo da compulsão alimentar até os avanços na compreensão e tratamento de condições dermatológicas complexas, como a dermatite liquenoide, os capítulos deste livro oferecem perspectivas atuais e futuras sobre questões de relevância para a saúde pública. Além disso, exploram temas emergentes, como os impactos da poluição ambiental na saúde respiratória e estratégias de prevenção de doenças infecciosas em contextos urbanos densamente povoados, ampliando ainda mais o escopo e a utilidade desta obra.

Além disso, temas como a avaliação de riscos nutricionais em hospitais de pequeno porte, o papel das plantas medicinais na comunidade e os efeitos positivos de programas de navegação para pacientes com câncer de mama são discutidos em detalhes, evidenciando a interdisciplinaridade e a abordagem holística necessárias na promoção da saúde.

A obra também destaca desafios contemporâneos, como o delirium em pacientes idosos, a medicalização da vida e seus impactos na infância, além de abordar estratégias educacionais inovadoras para a melhoria da saúde pós-COVID-19. Por meio de análises aprofundadas e casos ilustrativos, o livro oferece uma visão abrangente desses temas complexos, estimulando debates fundamentais para o avanço da prática clínica e da saúde pública.

Com uma mistura de análises epidemiológicas, estudos de casos e reflexões sobre práticas clínicas, este livro representa uma contribuição valiosa para profissionais da saúde, pesquisadores e estudantes interessados em promover o bem-estar integral e a qualidade de vida em suas comunidades. Além disso, serve como um guia abrangente para aqueles que buscam entender melhor os desafios e oportunidades no campo da saúde pública e da medicina comunitária, fornecendo insights práticos e teóricos que podem informar intervenções futuras.

Que esta obra seja uma fonte de inspiração para desencadear novas abordagens, promover pesquisas inovadoras e influenciar políticas de saúde que se comprometam com a constante melhoria do cuidado tanto a nível individual quanto comunitário. Que ela estimule a colaboração entre profissionais da saúde, pesquisadores e formuladores de políticas, visando a criação de intervenções mais eficazes e inclusivas, que atendam às necessidades específicas das pessoas e comunidades. Que suas ideias alimentem o diálogo e a reflexão, impulsionando uma mudança positiva e sustentável no campo da saúde.

José Weverton Almeida-Bezerra
Karoline Petricio Martins

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISIS FUNCIONAL DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA EN LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS	
Azucena González-Horta	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417051	
CAPÍTULO 2	17
APICULTURA NA AMAZÔNIA LEGAL: PRODUÇÃO DE GELEIA REAL EM ARAGUAÍNA-TO	
Kayke Almeida Gloria	
Rômulo Augusto Guedes Rizzardo	
José Hugo de Oliveira Filho	
Rianna Bueno Rosário	
Letícia Liandra de Souza Barbosa	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417052	
CAPÍTULO 3	23
ATLAS DE HEMATOLOGIA VIRTUAL: UM GUIA PRÁTICO	
Gustavo Carvalho de Castro	
Paulo Murillo Neufeld	
Marcos Kneip Fleury	
José Firmino Nogueira Neto	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417053	
CAPÍTULO 4	34
AVALIAÇÃO DE MODELO DIDÁTICO SOBRE A HERANÇA DA ANEMIA FALCIFORME NO ENSINO DE GENÉTICA	
Franciane de Moura Nunes	
Leomá Albuquerque Matos	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417054	
CAPÍTULO 5	53
BREVE INTRODUCCIÓN A LA FICOFLOTA DE CUATRO SITIOS CON LITORAL COSTERO EN EL CARIBE SUR DE COSTA RICA	
Ruben Cabrera	
Jhoana Díaz-Larrea	
Ricardo Cruz-Aviña	
Laura G. Núñez García	
Gabriela Vázquez Silva	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417055	
CAPÍTULO 6	61
PLANTAS MEDICINAIS: CONHECIMENTO ETNOBOTÂNICO DA COMUNIDADE BARREIROS, SALITRE-CE	
Sílvia Maria Batista	
Janete de Souza Bezerra	

Francisca Neciana Leite Cavalcante
 Maria Aparecida Barbosa Ferreira Gonçalves
 Josefa Joélia Bernardo dos Santos
 Ademair Maia Filho
 Maria Eliana Vieira Figueroa
 Jailson Renato de Lima Silva
 Amanda Maria Tavares Moreira
 Damiana Gonçalves de Sousa Freitas
 José Weverton Almeida-Bezerra
 Rafael Pereira da Cruz

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417056>

CAPÍTULO 772

DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR EXTRACTION AND PURIFICATION OF PLANT PROTEINS

M.O. Hernández-Jiménez
 M.E. Guatemala-Cisneros
 J.D.A. Loa
 N.G. Rojas-Avelizapa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417057>

CAPÍTULO 885

EFFECTO DE LAS ZONAS DE VIDA Y LA ALTURA RELATIVA EN LA DENSIDAD ANHIDRA DE *SWIETENIA MAHAGONI* ROXB Y *SWIETENIA MACROPHYLLA* JACQ. PLANTADAS EN LA SIERRA, REPÚBLICA DOMINICANA

Santiago W. Bueno-López
 Luis Rene Caraballo Rojas
 Juan G. Torres

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417058>

CAPÍTULO 9 102

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *PELTOPHORUM DUBIUM* ((SPRENG.) TAUB.) SOB ESTRESSE HÍDRICO

Luiz Fernando Rodrigues de Almeida
 Tiago Reis Dutra
 Marília Dutra Massad

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7172417059>

CAPÍTULO 10..... 108

MÉTODO DE PROVAS BIOQUÍMICAS PARA BACTÉRIAS GRAM POSITIVO DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS* E *ENTEROCOCCUS*

Franky Willa Ferreira de Abreu
 Ernane Gerre Pereira Bastos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.71724170510>

CAPÍTULO 11 115**PERFIL ANTIOXIDANTE DA LUTEÍNA E ANÁLISE DE VISUALIZAÇÃO**

Antonia Joana Darque Silva Campos

Carlos Alonso Leite dos Santos

Luciene Ferreira de Lima

José Weverton Almeida-Bezerra

Jácia Santos Oliveira Ramos

Janaína Esmeraldo Rocha

Marcos Aurélio Figueirêdo dos Santos

Ademar Maia Filho

Murilo Felipe Felício

Adrielle Rodrigues Costa

Antônia Eliene Duarte

Luiz Marivando Barros

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.71724170511>**SOBRE OS ORGANIZADORES 127****ÍNDICE REMISSIVO 128**

ANÁLISIS FUNCIONAL DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA EN LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS

Data de aceite: 02/05/2024

Azucena González-Horta

Facultad de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Ciencias Genómicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria San
Nicolás de los Garza, México
ORCID: 0000-0002-8222-2111

RESUMEN: La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo común originado por la muerte celular dentro de la *substancia nigra pars compacta*. Se caracteriza por la presencia de agregados intracelulares proteicos compuestos principalmente por la alfa-sinucleína. Aunque los mecanismos moleculares por los cuales esta proteína contribuye a la toxicidad neuronal todavía se desconocen, se ha sugerido que los intermediarios oligoméricos son citotóxicos y permeabilizan las membranas celulares posiblemente a través de complejos que forman un poro en la bicapa; sin embargo, este mecanismo es altamente controversial. Así pues, es necesario identificar el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización de membranas para entender la interacción entre oligómeros y lípidos y poder estimar la relevancia biológica de este proceso. En

este trabajo se evaluó por espectroscopía de fluorescencia la liberación de contenidos acuosos originados por oligómeros de alfa-sinucleína desde vesículas fosfolipídicas de distinta composición mediante el método ANTS/DPX. Los resultados muestran que la disrupción de membranas solo ocurre en presencia de lípidos aniónicos y también por parámetros de empaquetamiento lipídico, lo que sugiere que la accesibilidad a la región hidrofóbica de las vesículas modula la interacción lípido-oligómero.

PALABRAS-CLAVE: alfa-sinucleína* interacción lípido-oligómero* permeabilización

FUNCTIONAL ANALYSIS OF OLIGOMERIC ALPHA-SYNUCLEIN IN MEMBRANE PERMEABILIZATION

SUMMARY: Parkinson's disease is a common neurodegenerative disorder marked by increased cell death within the substantia nigra pars compacta. It is characterized by the presence of intracellular aggregates composed primarily of the protein alpha-synuclein. How the aggregation of alpha-synuclein is related to neuronal degeneration is an important unresolved question. Oligomeric intermediates have been found to be more

toxic to cells than monomeric or fibrillar forms of the protein. A possible mechanism by which oligomers could be toxic is through the disruption and permeabilization of cellular membranes. The proposed disruption mechanism is the formation of pore-like structures within the lipid bilayer although this mechanism is still highly controversial. To identify the mechanism through which membrane permeabilization is facilitated and to estimate the biological relevance of this process, it is crucial to have a greater knowledge of the lipid-oligomer interaction. The membrane disruptive effect of Alpha-synuclein oligomers on lipid vesicles of different headgroup composition using the ANTS/DPX assay was evaluated in this work. It was shown that membrane permeabilization is mainly determined by the presence of negatively charged lipids and also by lipid packing parameters, suggesting that the accessibility to the bilayer hydrocarbon core modulates oligomer-membrane interaction.

KEYWORDS: alpha-synuclein * lipid-oligomer interaction * leakage

ANÁLISE FUNCIONAL DOS OLIGÔMEROS DE ALFA-SINUCLÉINA NA PERMEABILIDADE DAS MEMBRANAS

RESUMO: A doença de Parkinson é uma condição neuro-degenerativa comum que se origina na morte celular dentro da substância nigra pars compacta. é caracterizada pela presença de agregados intracelulares protéicos compostos especialmente pela alfa-sinucleína. Mesmo que se desconheça os mecanismos moleculares por onde essa proteína contribui para toxicidade neuronal, existe uma possibilidade de que os intermediários oligoméricos sejam citotóxicos, e permeabilizam as membranas celulares possivelmente através de complexos que formam um poro na capa dupla, entretanto, este mecanismo gera muita controvérsia. Sendo assim, é necessário identificar o mecanismo responsável pela permeabilidade das membranas para entender a interação entre os oligômeros e os lipídios, e para ter uma estimativa da relevância biológica deste processo. Neste trabalho, analisamos através de espectroscopia de fluorescência, a liberação dos conteúdos aquoso originados por oligômeros de alfa-sinucleína a partir das vesículas fosfolídicas de composição diferente através do método ANTS/DPX. Os resultados mostraram que a ruptura de membranas ocorrerá somente diante da presença de lipídios aniônicos, e também pelos parâmetros de empacotamento lipídico, e isso sugere que a acessibilidade à região hidrofóbica das vesículas faz a modulação da interação lípidio-oligômero

PALAVRAS-CHAVE: alfa-sinucleína * interação lípidio-oligômero * permeabilização

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la edad que afecta entre 1-2% de la población de alrededor de 65 años de edad. A nivel fisiológico, la causa de la enfermedad es la severa pérdida de neuronas dopaminérgicas especialmente en la *substancia nigra pars compacta* (1). El origen de la muerte de las células dopaminérgicas se desconoce, sin embargo, estudios bioquímicos, histológicos y genéticos han implicado a una proteína neuronal, la alfa-sinucleína, en la patogénesis de esta enfermedad ya que es el componente principal de los agregados intracelulares proteicos

conocidos como cuerpos y neuritas de Lewy característicos en los pacientes con Parkinson (2)(3). Además, descubrimientos genéticos relacionan el padecimiento temprano de esta enfermedad con la triplicación del gen que codifica para la alfa-sinucleína y a 3 mutaciones puntuales del mismo gen (A30P, E46K, A53T) (4). Por eso se ha sugerido que el desarrollo de la enfermedad de Parkinson está asociado con la formación de especies mal plegadas de alfa-sinucleína que disparan la formación de fibras amiloides y originan finalmente, depósitos fibrilares que interfieren severamente con el buen funcionamiento de estructuras membranosas y procesos celulares 5. Ya sea de origen esporádico o genético, la enfermedad de Parkinson no solo se asocia con la presencia de alfa-sinucleína sino que también está implicado su estado conformacional. Mientras que la proteína soluble se caracteriza por tener una estructura desplegada *in vitro* (6) es la forma agregada (fibras amiloides) la que se encuentra en los cuerpos y neuritas de Lewy (4)(7). Las especies protofibrilares (oligoméricas) se han implicado como los agentes patogénicos, dado que las especies mutantes presentes en el Parkinson familiar originan mayores tasas de oligomerización sin que se incremente la formación de fibras amiloides (8). Son estas características las que categorizan a la enfermedad de Parkinson como una enfermedad de mal plegamiento proteico. A pesar de la falta de estructura secundaria, la proteína de 140 aminoácidos y 14.5 kDa de masa molecular, puede dividirse en tres diferentes regiones con distintas propiedades y funciones (9)(10).

- I. el segmento N-terminal anfipático (comprende los residuos 1-70) que contiene 7 dominios de repeticiones imperfectas de 11 residuos (XKTKEGVXXXX) y que es muy similar al dominio α -helicoidal de unión a membrana de las apolipoproteínas,
- II. la región central hidrofóbica (residuos 71-82) también conocida como NAC (de las siglas en inglés *non-Abeta component of Alzheimer amyloid*) y que se cree es la región responsable de la agregación proteica y de la formación de fibras amiloides y finalmente,
- III. la región C terminal (residuos 83-140) que tiene un fuerte carácter ácido debido a sus 15 carboxilos, lo que impide la asociación de este segmento de la proteína con lípidos.

Aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de la proteína forman hélices anfipáticas al unirse con membranas, esta habilidad parece estar relacionada con su función fisiológica. Debido a su alta concentración en las terminales presinápticas y a su asociación con las vesículas sinápticas, se ha sugerido que la alfa-sinucleína está implicada tanto en el reciclaje de dichas vesículas como en la regulación de las transmisiones sinápticas (11)(12). Aunque la pérdida de función debido a la agregación puede desempeñar un papel en la toxicidad de esta proteína, son las formas oligoméricas y prefibrilares las que se consideran las especies tóxicas con respecto a la muerte neuronal y a la progresión de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, todavía se desconoce el proceso mediante el cual los oligómeros originan la muerte celular. Uno de los mecanismos más aceptados para explicar la neurotoxicidad de la alfa-sinucleína es la permeabilización de las membranas

celulares que originan los oligómeros proteicos (13)(14). Sin embargo, todavía no está claro por cuál mecanismo pierde integridad la membrana. Por un lado, los oligómeros de alfa-sinucleína pueden integrarse en la membrana y formar poros a través de los cuales se pueden permear moléculas pequeñas (13) (15) y por otro, es concebible que las interacciones entre los oligómeros proteicos y la bicapa fosfolipídica desestabilicen el empaquetamiento lipídico y que por tanto se pierda la integridad (16). Con el fin de tener un mayor entendimiento del proceso de interacción entre la alfa-sinucleína y modelos de membrana y poder identificar el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización, en el presente trabajo se analizó el efecto de los oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilización de membranas fosfolipídicas de distinta composición mediante espectroscopía de fluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los lípidos empleados para la preparación de vesículas fosfolipídicas fueron: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DOPG), 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) y colesterol (Chol) obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc. La alfa-sinucleína humana se obtuvo de Sigma-Aldrich. Para los ensayos de liberación de contenidos de vesículas lipídicas se utilizaron las sondas fluorescentes de ácido 8-aminonaf-talen-1,2,6-trisulfónico (ANTS) y bromuro de *p*-xilen-bis-piridino (DPX) que fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Los solventes orgánicos cloroformo y metanol fueron de calidad HPLC y se obtuvieron de J.T. Baker. Los geles cromatográficos Superdex 200 y Sephadex G-75 procedieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y procedieron de J. T. Baker.

PREPARACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA

Para inducir la formación de las protofibras, se incubó la alfa-sinucleína humana (Sigma-Aldrich) en agua MilliQ a una concentración de 350 μ M en un *termomixer* Eppendorf por 18 horas a temperatura ambiente a 1250 rpm seguido de 2 horas a 37 °C sin agitación para posteriormente filtrarlo a través de un filtro de 0,2 μ m (Corning) con el fin de remover los agregados fibrilares. La separación de la forma oligomérica y monomérica de la proteína se llevó a cabo mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 (GE), usando 10 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl como eluyente. Las fracciones correspondientes a los oligómeros se identificaron mediante espectro de absorción UV, para después juntarlas y concentrarlas usando un concentrador Vivaspin (Startorius) con un corte de separación de 10 kDa de peso molecular. La concentración de proteínas se determinó por Bradford.

PREPARACIÓN DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES

La obtención de vesículas multilamelares se llevó a cabo por el método de evaporación-hidratación. Para ello, se mezclaron en un tubo de ensayo las cantidades adecuadas de lípido a partir de soluciones madre en cloroformo/metanol (2:1 v/v). Posteriormente, las muestras se secaron primero bajo flujo de nitrógeno y después en vacío durante al menos 3 horas con el fin de eliminar las trazas de disolvente orgánico. La película seca de lípido formada se rehidrató posteriormente en tampón HEPES 50 mM pH 7,0, NaCl 30 mM incubando las muestras durante 2 h a 25 °C, temperatura superior a la de transición de fase de los lípidos empleados, y se agitó vigorosamente a intervalos de 10 min. Para preparar vesículas unilamelares de tamaño definido, las suspensiones obtenidas por el método de evaporación-hidratación se pasaron 10 veces a través de un mini-extrusor de alta presión (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL, EE.UU.) equipado con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y termostatzado a la misma temperatura a la que se hidrataron los lípidos, obteniendo de esta forma una suspensión homogénea de vesículas unilamelares grandes (LUV's) de unos 100 nm de tamaño medio.

PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS ENCAPSULANDO ANTS/DPX

Las diferentes composiciones lipídicas se prepararon mezclando la cantidad apropiada de lípido en cloroformo/metanol (2:1 v/v). Para preparar las vesículas unilamelares grandes que encapsulen el fluoróforo y el quenchedor, se secaron 3 mg de lípido bajo flujo suave de N₂ y después en vacío durante al menos 2 h. La película seca de lípido se rehidrató con 1 mL de *buffer* Hepes 50 mM pH 7, NaCl 30 mM que contenía ANTS (8-aminonaftaleno-ácido-1,3,6-trisulfónico) 12,5 mM y DPX (N,N'-p-xileno-bis-piridino de bromuro) 45 mM y se incubó durante por 2 h a 25 °C con agitación a intervalos de 10 min. Las LUV's se prepararon por extrusión como se indicó anteriormente encapsulando la sonda y el quenchedor. Para remover la sonda que no fue encapsulada, se utilizó una cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-75 usando Hepes 10 mM pH 7,0 NaCl 150 mM como eluyente. El proceso cromatográfico se siguió monitorizando la absorbancia de las fracciones a 249 nm y 353 nm, longitudes de onda de los máximos de absorción del quenchedor y del fluoróforo, DPX y ANTS, respectivamente. Las fracciones correspondientes a las vesículas que contenían sonda y desactivador coencapsulados se reunieron y se determinó la concentración de fosfolípido mediante cuantificación de fósforo.

CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La cantidad de fosfolípido en las muestras lipídicas se determinó mediante la valoración de fósforo según el método descrito por Rouser *et al.* (17), para lo cual se secaron las muestras a analizar para posteriormente añadir ácido perclórico al 70% (0,45 mL) e incubarlas en baño de arena a 260 °C durante 30 min con el fin de conseguir la mineralización del fósforo. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar los tubos y se añadieron 0,5 mL de molibdato amónico (2,5% p/v), 0,5 mL de ácido ascórbico (10% p/v) y 3,5 mL de agua bidestilada por muestra, incubándose éstas durante 7 min en baño de agua hirviendo. La reacción cromogénica se detuvo colocando los tubos en hielo para posteriormente medir la absorbancia del producto coloreado que se forma en presencia de fósforo a 820 nm en un espectrofotómetro marca Phenix modelo UV1800PC. Para conocer la cantidad de fosfolípido en cada muestra, la absorbancia obtenida se interpoló en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de concentración conocida de fosfato inorgánico (KH₂PO₄ 0,05 mg/mL).

LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS (LEAKAGE)

La capacidad de los oligómeros de alfa-sinucleína para provocar la pérdida de contenidos acuosos de vesículas lipídicas se analizó mediante el método ANTS/DPX descrito por Ellens *et al.* (18). El ensayo de *leakage* se realizó colocando 1,2 mL de la suspensión de vesículas que contenían ANTS/DPX a una concentración final de fosfolípido 20 mM en la cubeta del espectrofluorímetro (LS45 Perkin Elmer). La composición de las vesículas que se emplearon fueron: POPG, DOPG, POPC:DOPG (1:1 relación molar) y POPC:POPG (1:1). La liberación del ANTS de las vesículas se siguió monitorizando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm, a una longitud de onda de excitación de 353 nm. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y se realizaron por duplicado. El experimento finalizó con la adición de una alícuota de Triton X-100 (0,5% concentración final) que proporcionó la fluorescencia correspondiente al 100% de liberación como referencia. El porcentaje de *leakage* se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Leakage} = [F(1) - F(0)] / [F(100) - F(0)] \times 100$$

donde F(0) es la medida inicial de fluorescencia, F(1) es la emisión de fluorescencia máxima obtenida después de inyectar los oligómeros de alfa-sinucleína y F(100) es la fluorescencia obtenida en presencia de 0,5% de Triton X-100.

RESULTADOS

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLÉINA

Uno de los retos en la evaluación de la interacción de los oligómeros de alfa-sinucleína y fosfolípidos es precisamente la producción de las especies oligoméricas, ya que su purificación generalmente no resulta en la obtención de una sola población homogénea sino que se producen varios agregados proteicos de diferente tamaño y con un bajo rendimiento. En la Figura 1 se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación de oligómeros obtenidos para la realización de este trabajo. La alfa-sinucleína eluye en 3 picos correspondientes a las especies oligomérica (fracciones 20 a 23), dimérica (fracciones 40 a 44) y monomérica (fracciones 47 a 59). Se ha reportado que la formación *in vitro* de oligómeros de alfa-sinucleína mediante este procedimiento nunca excede el 5% del total de la proteína en solución ni siquiera incrementando el tiempo de incubación, debido a que una vez alcanzada la concentración crítica, las protofibrillas comienzan a desaparecer dando lugar a la formación de fibras amiloides (19). Una vez identificado el pico correspondiente a los oligómeros proteicos, estas fracciones se colectaron para posteriormente calcular su concentración mediante la medida de absorbancia a 275 nm. Los valores obtenidos oscilaron entre 12-15 mM, rendimiento que concuerda con lo reportado en la literatura.

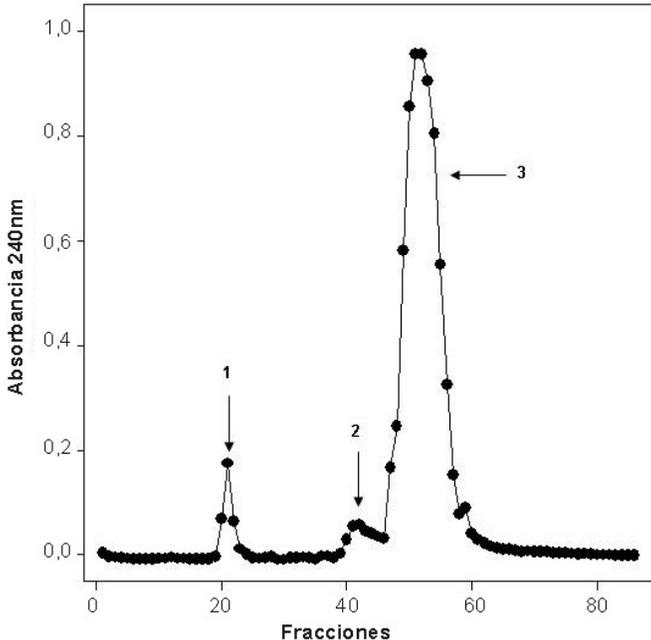


Figura 1. Cromatografía de exclusión molecular para la purificación de oligómeros de alfa-sinucleína. La cromatografía se realizó en una columna Superdex 200, el cromatograma muestra la separación entre la forma oligomérica (1), dimérica (2) y monomérica (3) de la proteína a partir de una solución stock (300 mM) en buffer Hepes 10 mM pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM.

ENCAPSULACIÓN DE SONDAS FLUORESCENTES EN LIPOSOMAS DE DISTINTAS ESPECIES FOSFOLIPÍDICAS

Para evaluar la interacción de los oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilización de vesículas, se prepararon liposomas de distintas especies fosfolipídicas que contenían ANTS como fluoróforo y DPX como quenchedor. La Figura 2 muestra un ejemplo representativo de la purificación de estos liposomas y como puede observarse, las sondas encapsuladas en vesículas fosfolipídicas se separan fácilmente de las sondas libres gracias a la gran diferencia de tamaño existente entre esas especies moleculares. Una vez identificado el pico correspondiente a los liposomas marcados, se colectaron esas fracciones y se realizó su cuantificación mediante el método de Rouser *et al.* descrito en la metodología. Los fosfolípidos empleados para la preparación de cada una de las vesículas utilizadas en este trabajo (POPC, POPG, DOPG y colesterol) permiten tener un sistema modelo bien definido de las vesículas sinápticas posibilitando identificar las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen en la unión entre los oligómeros de alfa-sinucleína y los lípidos. Se ha reportado que las membranas de las vesículas sinápticas contienen 40,9% de colesterol, 24,6% de fosfatidilcolina (PC), 12% fosfatidiletanolamina (PE), 11,5% de esfingomielina (SM), 7,3% de fosfatidilserina (PS) y 3,7% de fosfatidilinositol (PI) [20-22]. Las colas de acilo de ácido palmítico y oleico se eligieron para simular la asimetría y monoinsaturación de los lípidos fisiológicos mientras que la cabeza zwitteriónica de PC es la más común encontrada *in vivo*.

EFFECTO DE LOS OLIGÓMEROS DE ALFA-SINUCLEÍNA EN LA LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS DE VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS

Se ha reportado que la permeabilización de membranas por oligómeros de alfa-sinucleína depende de la composición de la cabeza lipídica; sin embargo, los datos son contradictorios. Algunos grupos de investigación reportan una fuerte unión de la proteína con vesículas unilamelares grandes formadas por fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos (23)(24) así como a dominios lipídicos tipo *rafts* (25)(26) mientras que otros grupos reportan que la proteína no se une a fosfolípidos neutros y sí a vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) compuestas por fosfolípidos aniónicos. Por lo que, para evaluar esta especificidad se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUVs) con diferente composición lipídica empleando tanto lípidos aniónicos (POPG y DOPG) como zwitteriónicos (POPC). La incubación de LUVs preparadas de POPC con oligómeros de alfa-sinucleína no produjo liberación de los contenidos de estos liposomas lo cual era de esperarse dado que la proteína, debido a su carácter catiónico a pH 7, sólo se une débilmente a estas vesículas (Fig. 3).

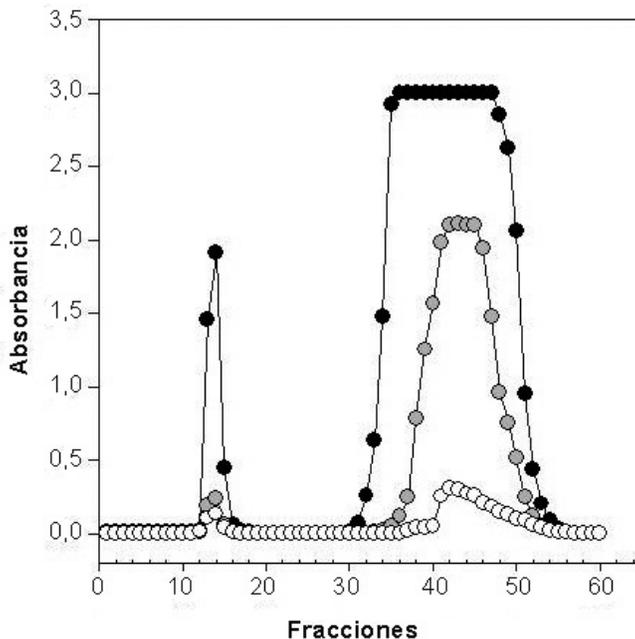


Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular de la purificación de liposomas de POPG encapsulando una solución ANTS 12,5 mM, DPX 45 mM. Las vesículas se prepararon por extrusión utilizando membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm. El proceso de elución fue monitoreado a 259 nm para el ANTS (negro) 353 nm para el DPX (gris) y 400 nm para las vesículas (blanco). El primer pico corresponde a las sondas encapsuladas y el segundo a la sonda libre.

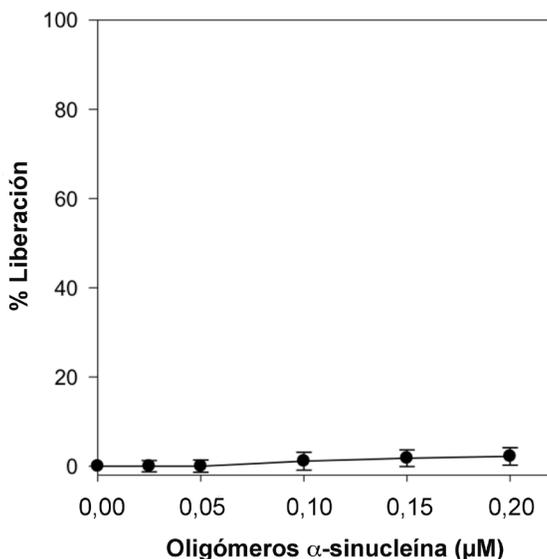


Figura 3. Liberación de contenidos acuosos desde vesículas de POPC. Se muestra el efecto de la concentración de oligómeros de alfa-sinucleína sobre la permeabilidad de membranas. El porcentaje de liberación está expresado como el porcentaje de la pérdida de contenido acuoso máxima, obtenida al añadir Triton X-100 (concentración final 0,5% v/v). Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

Por el contrario, pudo observarse una fuerte disrupción de las vesículas preparadas con lípidos negativos (POPG, DOPG). La Figura 4 muestra cómo los oligómeros de alfa-sinucleína producen una liberación prácticamente instantánea del contenido de vesículas de DOPG y POPG. Esta liberación de contenidos acuosos resultó ser dependiente de la concentración de oligómeros en el medio, en lo que se refiere tanto a la extensión final de liberación como a la velocidad a la que se alcanza el máximo. Para el caso de vesículas formadas por DOPG, el 50% de liberación de las LUVs se alcanzó a una concentración en torno a 0,05 mM mientras que para las vesículas de POPG este mismo porcentaje de liberación se alcanzó empleando una mayor concentración de oligómeros (~0,1 mM), lo que sugiere un efecto relativamente selectivo por la DOPG sobre la interacción lípido/oligómero y sus consecuencias en cuanto a la alteración de las propiedades de permeabilidad de las membranas. Ahora bien, dado que las bicapas lipídicas que contienen exclusivamente lípidos aniónicos tienen una elevada densidad de carga y no reflejan la situación presente en una membrana celular, se analizó también la permeabilización inducida por los oligómeros de alfa-sinucleína sobre bicapas lipídicas con una densidad de carga menor, es decir, LUVs que contenían 50% de POPC y 50% de un lípido aniónico (mol:mol). En la Figura 5 se muestra el efecto de la relación oligómero/lípido sobre la permeabilidad inducida por oligómeros de alfa-sinucleína desde las diferentes vesículas fosfolipídicas empleadas. Puede observarse claramente cómo la presencia de POPC en las membranas inhibe la capacidad de los oligómeros para permeabilizar las vesículas, alcanzándose a la máxima concentración de oligómeros empleada tan solo el 40% de liberación para el caso de POPC:DOPG y el 3% para los liposomas formados por POPC:POPG. Los resultados de este experimento muestran claramente que para que ocurra la permeabilización de las membranas por oligómeros de alfa-sinucleína las interacciones electrostáticas juegan un papel importante.

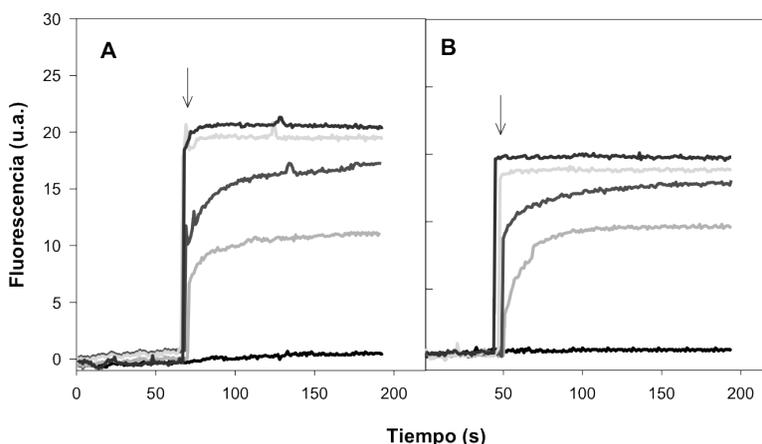


Figura 4. Cinéticas de liberación de contenidos acuosos desde vesículas de DOPG (A) y POPG (B). La liberación es inducida por la presencia de oligómeros de alfa-sinucleína a concentraciones de 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 y 0,2 mM (del negro al gris oscuro) a 25 °C. La concentración de lípido utilizada por ensayo fue de 20 mM. El leakage se siguió monitoreando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 353 nm.

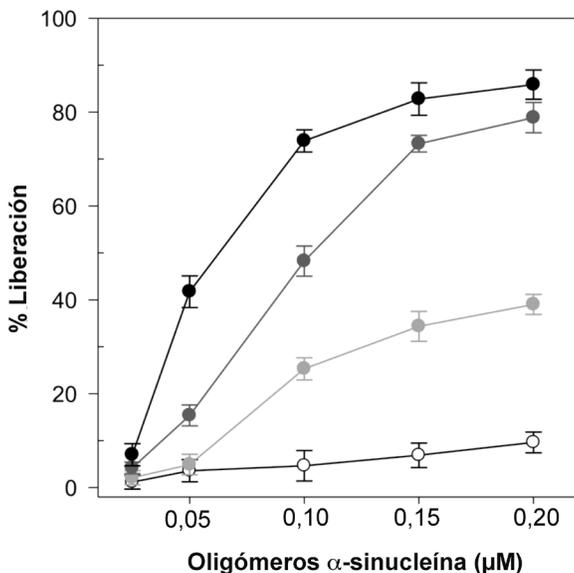


Figura 5. Efecto de la relación oligómero/lípido en la liberación de contenidos acuosos desde diferentes vesículas fosfolípídicas. La concentración de lípido utilizada por ensayo fue de 20 mM siendo la composición de las vesículas: POPC:POPG (blanco), POPC:DOPG (gris claro), POPG (gris oscuro) y DOPG (negro). Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

Experimentos realizados por otros autores empleando vesículas unilamelares gigantes (GUVs) como modelo de membranas (15) sugieren que aunque la carga negativa es suficiente para favorecer la unión de la alfa-sinucleína, para que ocurra la permeabilización es necesario la des-estabilización de la bicapa lipídica. Así pues para evaluar esta hipótesis se prepararon LUVs en las cuales el empaquetamiento lipídico en la bicapa se viese afectado de alguna manera ya sea por el número de insaturaciones en la cadena de acilo de los fosfolípidos o por la presencia de colesterol en las vesículas. Al incrementar el grado de insaturación en las vesículas mediante el empleo de DOPG, se disminuye el grado de orden las cadenas aciladas permitiendo una mayor separación entre las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que resulta en una bicapa más delgada que favorece la interacción de los oligómeros con la región hidrocarbonada. La Figura 6 muestra la influencia del grado de orden de vesículas preparadas a partir de especies de fosfatidilglicerol con un grado de orden ascendente (DOPG, POPG, POPG:Chol 70:30). Puede observarse cómo el incremento en el orden de las membranas disminuye la permeabilización inducida por los oligómeros de alfa-sinucleína alcanzándose a la máxima concentración de oligómeros empleada tan solo un 61% para liposomas compuestos por POPG:Col, un 78% para LUVs de POPG y un 85% para DOPG. Estos resultados sugieren que no solo las interacciones electrostáticas son importantes en la interacción lípido/oligómero sino que para que la permeabilización ocurra, también es necesario que los oligómeros tengan acceso al corazón hidrocarbonado de la membrana.

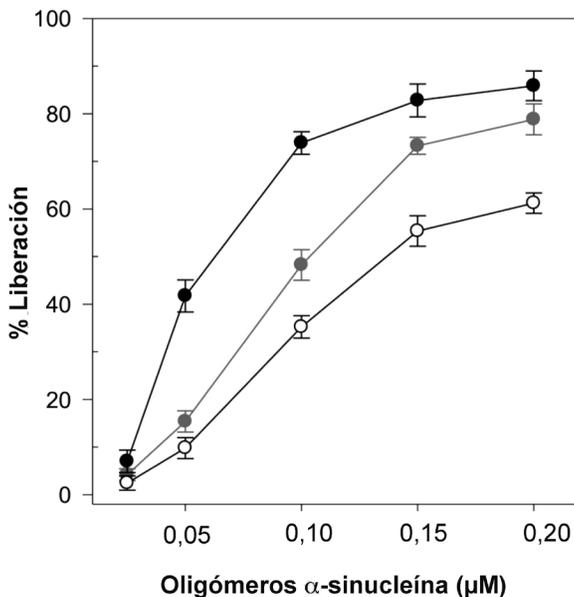


Figura 6. Influencia del grado de orden de vesículas lipídicas de PG sobre la permeabilización inducida por oligómeros de alfa- sinucleína. La concentración de lípido empleado por ensayo fue de 20 mM. Las barras de error muestran la desviación estándar tras promediar dos medidas realizadas en experimentos independientes.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aunque la relevancia fisiológica de las interacciones entre la alfa-sinucleína y las membranas lipídicas está ampliamente reconocida, muchos de los factores que afectan estas interacciones no se comprenden en su totalidad debido principalmente, a que la composición de la membrana plasmática es demasiado compleja para identificar directamente las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen la unión entre la alfa-sinucleína y las vesículas, es por esto que ha sido necesario emplear un sistema modelo bien definido para su estudio. Desde hace años se han desarrollado varios métodos biofísicos que permiten estabilizar, aislar y caracterizar los diferentes intermediarios protofibrilares en la vía de formación de amiloides. Se ha propuesto que los oligómeros prefibrilares de esta proteína, a diferencia de las fibrillas maduras, representan la especie tóxica en la enfermedad de Parkinson (27) debido a que la disrupción membranal que causan las especies oligoméricas es considerada como un mecanismo de citotoxicidad probable. Algunos estudios realizados en modelos celulares muestran que la citotoxicidad parece estar asociada al contenido de lámina-beta mientras que, oligómeros con una elevada fracción en dominios alfa-helicoidales parecen ser benignos (28)(29). Utilizando diferentes protocolos, *in vitro*, ha sido posible sintetizar y purificar especies oligoméricas con diferente citotoxicidad, estructura secundaria y morfología, observándose mediante AFM y EM oligómeros esféricos con un diámetro mayor a 30 nm y alturas que oscilan entre 2 y 10 nm (30)(31). Hasta ahora, la detección *in vivo* de oligómeros de alfa-sinucleína solo había

sido posible empleando métodos bioquímicos indirectos en modelos hemiparkinsonianos de ratas y no fue hasta el año pasado cuando se desarrolló un modelo animal que permite detectar y realizar el seguimiento de la formación de los oligómeros de alfa-sinucleína *ex vivo* e *in vivo* (32). En dichos experimentos se observa claramente la aparición de agregados proteicos característicos de los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy presentes en pacientes con Parkinson. El protocolo que se siguió en esta investigación para la preparación de los oligómeros de alfa-sinucleína fue el propuesto por van Rooijen *et al.* (13), el cual permite la obtención reproducible de especies oligoméricas de entre 6-11nm de diámetro, predominantemente con estructura lámina-beta y con capacidad para interactuar con vesículas lipídicas. Los resultados obtenidos en este trabajo proveen información sobre la contribución de la cabeza polar y el estado de fase de los fosfolípidos sobre la permeabilización de vesículas. Estos resultados muestran claramente que la incubación de liposomas de POPC con oligómeros de alfa-sinucleína no origina permeabilización de membranas, lo que descarta que la membrana plasmática de la mayoría de las células sea un blanco para la permeabilización por dichos oligómeros. Por el contrario, se observó que los oligómeros pueden permeabilizar vesículas de POPG y DOPG de una manera dependiente de la concentración. Las cinéticas mostraron que la permeabilización ocurre directamente después de la adición de los oligómeros y que se completa en tan solo unos minutos, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas parecen ser determinantes en mediar la permeabilización de membranas. Esta unión podría explicarse debido al hecho de que a pH neutro, el segmento N-terminal de la región de la proteína contiene muchos residuos cargados positivamente (33)(34), sin embargo, parece poco favorable energéticamente que exista una clara separación de carga en los oligómeros de alfa-sinucleína tal y como ocurre en el monómero proteico; no obstante, puede pensarse que en los oligómeros, el segmento N-terminal se encuentra disponible para la unión con las vesículas lipídicas. En el trabajo de investigación realizado por Villar se identificó mediante el empleo de espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido, que el corazón de las fibras oligoméricas de alfa-sinucleína está conformado por 5 hojas beta, mientras que los segmentos N- y C- terminales presentan una conformación flexible (35). Las primeras 3 hojas beta tienen una longitud de 6-8 residuos y las otras dos una longitud de 9-13 residuos. Así pues, dado este acomodo estructural puede decirse que el papel que desempeñan las interacciones electrostáticas en la permeabilización de membranas por los oligómeros de alfa-sinucleína parece ser algo más complejo. En experimentos realizados por otro grupo de investigación utilizando como sonda indicadora calceína (36), se observaron porcentajes de liberación muy similares a los obtenidos en este trabajo a partir del mismo tipo de vesículas fosfolipídicas, lo que permite expresar que la encapsulación de las sondas ANTS y DPX presenta otra alternativa válida para la evaluación de la liberación de contenidos acuosos desde vesículas en este sistema modelo. Ahora bien, además de las interacciones electrostáticas, los resultados mostraron que otro de los parámetros que tiene influencia sobre la disrupción de membranas es el empaquetamiento lipídico ya que pudo observarse que las vesículas más densamente empaquetadas son más resistentes

a la permeabilización, sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas contribuyen también a la unión lípido-oligómero, dejando más accesibles a la disrupción, bicapas con una mayor fluidez en su interior. Los datos biofísicos que aquí se presentan solo proporcionan indicios de cómo es que podrían interactuar las especies oligoméricas de esta proteína con los componentes celulares, ya que no es tan sencillo trasladar estos resultados al efecto que pudieran tener los oligómeros *in vivo* debido principalmente a que las membranas biológicas reales son mucho más heterogéneas y contienen dominios distintos que facilitarían las interacciones oligómero-membrana. Sin embargo, la dependencia en las propiedades físicas de la membrana proporciona información relevante sobre el mecanismo por el cual ocurre la permeabilización originada por oligómeros de alfa-sinucleína. Además del mecanismo de poro propuesto por Volles *et al.* (23), el “adelgazamiento” de la bicapa se ha propuesto recientemente como un posible modo de acción. Por tanto, en base a los resultados obtenidos se puede concluir que la adsorción de los compuestos oligoméricos en la superficie de la membrana probablemente causa un aumento en el espaciamiento promedio de la cabeza polar de los fosfolípidos y que, por tanto, se tenga un efecto de adelgazamiento de la bicapa con lo cual se incrementa la permeabilidad al disminuir el espesor de la barrera hidrofóbica.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece el apoyo financiero otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León a través del Programa ProACTI clave 177-MCS-2023 para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Scott TR, Netsky MG. The pathology of Parkinson's syndrome: a critical review. *Int J Neurol* 1961; 2: 51-60.
2. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's Disease *Pathophys* 2005; 28: 55-84.
3. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 2007; 103: 17-37.
4. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Fibrils formed *in vitro* from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochem* 2000; 39: 2552-63.
5. Stöckl MT, van Rooijen D, Mireille MAE, Classens V, Subramaniam V. Structural and functional insights into alpha-synuclein-lipid interaction. *Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Diseases*, 1st. Ed. Albany (NY): Wiley-VCH; 2011. p. 33-53.
6. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochem* 1996; 35: 13709-15.

7. Chiti F, Dobson CM. Protein, misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 333-66.
8. Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e1867.
9. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2003; 278: 15313-8.
10. Bonini NM, Giasson BI. Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell* 2005; 123: 359-61.
11. Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Liu C. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *J Neurosci* 2007; 145: 539-55.
12. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neu* 2011; 42: 242-8.
13. van Rooijen BD, Claessens MM, Subramaniam V. Lipid bilayer disruption by oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 1271-8.
14. van Rooijen BD, Claessens MMAE, Subramaniam V. Membrane permeabilization by oligomeric alpha-synuclein: In search of the mechanism. *PLoS ONE* 2010; 5: e0014292.
15. Stöckl MT, Fischer P, Hermann V. Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *J Mol Biol* 2008; 375: 1394-404.
16. Stöckl MT, Zijlstra N, Subramaniam V. Alpha-synuclein oligomer: an amyloid pore? *Mol Neurobiol* 2013; 47: 613-21.
17. Rouser G, Siakotos AN, Fleischer AS. Quantitative analysis of phospholipids by TLC and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1966; 1: 85-6.
18. Ellens H, Bentz J, Szoka FC. H⁺ and Ca²⁺ induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochem* 1985; 24: 3099-106.
19. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, *et al.* Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 2002; 322: 1089-102.
20. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke E. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006; 127: 831-46.
21. Trexler AJ, Rhoades E. Alpha-synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. *Biochem* 2009; 48: 2304-6.
22. Deutsch JW, Kelly RB. Lipids of synaptic vesicles: relevance to the mechanism of membrane fusion. *Biochem* 1981; 20: 378-85.

23. Volles MJ, Lansbury PT. Vesicle permeabilization by pro- tofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochem* 2002; 41: 4595-602.
24. Zhu M, Li J, Lou A, Fink. The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability and fibril formation. *J Biol Chem* 2003; 278: 40186-97.
25. Fortin DL, Trayer MD, Nakamura K, Kubo S. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* 2004; 24: 6715-23.
26. Rhoades E, Ramlall TF, Eliezer D. Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2006; 90: 4692-700.
27. Winner B, Jappelli R, Samir K, Maji PA, Desplats A, Boyer L, *et al.* *In vivo* demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *PNAS* 2011; 108: 4194-9.
28. Ehrnhoefer DEGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 558-66.
29. Bieschke J. EGCG remodels alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 7710-5.
30. Denzer KM. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 2007; 27: 9220-332.
31. Kim HY, Cho MY, Kumar A, Maier E, Becker S, Lashuel HA, Xweckstetter M. Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17482-9.
32. Dimant H, Kalia S, Kalia L, Zhu L, Kibuu L, Ebrahimi-Fakhari D, *et al.* Direct detection of alpha-synuclein oligomers *in vivo*. *Acta Neurophatol Commmun* 2013; 1: 6-11.
33. Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. Alpha-synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; 26: 211-33.
34. Eliezer D, Kutluay E, Busell R, Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 2001; 307: 1061-73.
35. Vilar M, Chou H, Lührs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, *et al.* The fold of alpha-synuclein fibrils. *PNAS* 2008; 105: 8637-42.
36. van Rooijen BD, Claessens MM, Subramaniam V. Lipid bilayer disruption by oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 1271-8.

APICULTURA NA AMAZÔNIA LEGAL: PRODUÇÃO DE GELEIA REAL EM ARAGUAÍNA-TO

Data de submissão: 31/10/2023

Data de aceite: 02/05/2024

Kayke Almeida Gloria

Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA). Araguaína – Tocantins
<https://lattes.cnpq.br/7974174890085876>

Rômulo Augusto Guedes Rizzardo

Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA). Araguaína – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/8220832219694583>

José Hugo de Oliveira Filho

Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA). Araguaína – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/6340999342910290>

Rianna Bueno Rosário

Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA). Araguaína – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/9782430259319545>

Letícia Liandra de Souza Barbosa

Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA). Araguaína – Tocantins
<https://lattes.cnpq.br/4722771757876974>

RESUMO: Este experimento objetivou avaliar a produção de geleia real em enxames de abelhas da espécie *Apis mellifera* em ambiente de transição Cerrado Amazônia, de forma quantitativa, visando o desenvolvimento da apicultura na região. O método utilizado para avaliar foi o de colmeia recria orfanada. A avaliação teve a duração de dois meses. Com a análise dos dados, notou-se uma média de produção de geleia real nos meses de maio e junho, sendo 1,12g e 0,45g, respectivamente, havendo a necessidade de mudança na metodologia e manejo na realização do trabalho. Com tudo, a partir desse estudo, concluiu-se que resultados obtidos comprovam a possibilidade de produção de geleia real no estado do Tocantins.

PALAVRAS-CHAVE: Abelha melífera africanizada, *Apis mellifera*, geleia real, Cerrado

BEEKEEPING IN THE LEGAL AMAZON: ROYAL JELLY PRODUCTION IN ARAGUAÍNA, TO

ABSTRACT: This experiment aimed to evaluate the production of royal jelly in swarms of bees of the *Apis mellifera* species in a transitional environment in the Cerrado Amazonia, in a quantitative way, aiming at the development of beekeeping in the region. The method used to evaluate was orphaned recreated hives. The evaluation lasted two months. With the analysis of the data, an average production of royal jelly was noted in the months of May and June, being 1.12g and 0.45g, respectively, with a need to change the methodology and management when carrying out the work. However, from this study, it was concluded that the results obtained prove the possibility of producing royal jelly in the state of Tocantins.

KEYWORDS: Africanized honeybee, *Apis mellifera*, royal jelly, Cerrado.

INTRODUÇÃO

Predominantemente explorada de forma amadora e como fonte de renda complementar, a criação de abelhas é dependente da flora local e necessita que os recursos naturais sejam preservados, atendendo sobremaneira os três requisitos da sustentabilidade: econômico, por gerar renda para os produtores rurais; social, porque utiliza a mão de obra familiar, fixando o homem ao campo e diminuindo a migração para a zona urbana. Ecológico, por não desmatar, estimulando a restituição da vegetação nativa a fim de suprir o requerimento de manutenção e produção das abelhas (Wiese, 2005).

Na região Norte de modo geral, a agricultura familiar apresenta grande importância na base produtiva, dentre as principais atividades agrícolas, a apicultura representa uma parcela ainda incipiente, mas com potencial de desenvolvimento. Além do mel, é possível produzir de forma racional outros produtos como: pólen, geleia real, cera, própolis e apitoxina se utilizada de forma organizada e com tecnologias adequadas (Wiese, 1995).

Para o desenvolvimento e produção das abelhas melíferas é necessário um manejo adequado para tornar as colônias fortes a fim de que, as mesmas, cheguem ao período de floradas fortes e produtivas. Apesar do desenvolvimento das técnicas e manejo, é comum mesmo no período de floradas a perda de colônias, sendo ainda mais significativo no período de escassez de alimento, fato geralmente observado na apicultura brasileira e que se apresenta de forma marcante nesta região do país (Ramalho-Sousa et al., 2017).

Outro fator que influencia na produtividade das abelhas, certamente é o bioma ao qual a atividade está inserida. O Brasil de dimensões continentais possui diversos biomas que são propícios a atividade apícola com alta produtividade. O Cerrado já está configurado como uma região apta à apicultura, sendo frequente a ocorrência da abelha melífera africanizada, produzindo mel e atuando na polinização de diversas espécies de plantas nativas, garantindo a perpetuação das espécies (Mendonça et al., 2008; Abadio Finco et al., 2010). Para o ecótono Cerrado Amazônia, trabalhos recentes apontam a dificuldade de manutenção das abelhas no período chuvoso do ano, porém, demonstram a possibilidade

de produção na época de baixa pluviosidade (Rosa et al., 2014; Sousa et al., 2014; Tavares et al., 2014; Ramalho-Sousa et al., 2017). Dentre os produtos das abelhas, a geleia real tem alcançado interesses em todo o mundo, devido a sua importância na alimentação das abelhas e utilização como suplemento alimentar para os humanos. Suas propriedades terapêuticas apresentam-se associadas a longevidade, vida saudável e tratamento de muitas doenças, sendo utilizada como complemento alimentar e componente de cosméticos (Martos et al., 2008; Toledo et al., 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em área de Amazônia Legal, no apiário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) - Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), município de Araguaína, região Norte do Tocantins, 07°11'28" de Latitude Sul, e 48°12'26" de Longitude Oeste, distante 400 km da capital, Palmas.

Para a execução do trabalho de pesquisa foi necessário a preparação e adaptação das colônias para a coleta, dando continuidade ao trabalho iniciado no ano de 2021, para que o ensaio de produção de geleia real fosse realizado durante o período da safra apícola 2022/2023, entre os meses de agosto de 2022 a agosto de 2023.

Foi utilizado o método de Recria Orfanada, descrito por Silveira Neto (2011), e adaptado por Silveira Neto et al., (2020). Uma colmeia é utilizada como colmeia recria destinada a produção de geleia real, em conjunto com a colmeia recria, são escolhidas no apiário quatro colmeias para servir de suporte.

No método descrito, a colmeia recria tem a rainha retirada (orfanada). Esse manejo suspende a postura e como consequência ocorre redução da população e diminuição do feromônio da rainha (Winston, 1991), provocando um aumento no estímulo a criação de realeiras pela colônia. Esse manejo necessita de reposição de quadros com crias originados nas colmeias de suporte, em diversas fases de desenvolvimento, para manter o nível populacional elevado.

Com a colmeia recria montada, é retirado um quadro central e substituído por quadro porta cúpula composto por duas réguas transversais de madeira onde foram fixadas 20 cúpulas confeccionadas de cera natural.

Das colmeias de apoio, foram retirados quadros contendo crias novas de aproximadamente um a dois dias de vida. Este material foi transportado para um local destinado a transferência das larvas para as cúpulas com o auxílio de agulha de enxertia, lâmpada e base. A transferência consiste na retirada da larva de dentro do alvéolo junto com uma pequena quantidade de geleia real e acondicionada na cúpula. Após esse processo o quadro é reintroduzido na colmeia recria. Transcorrido o período de 48 horas, o quadro foi retirado e levado ao laboratório para a coleta da geleia produzida. O material coletado foi pesado em balança analítica, com precisão de 0,001g. A pesagem foi realizada de forma

individual de cada régua do quadro retirado. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos, devidamente identificadas e congeladas para posterior análise bromatológica.

Todo processo de enxertia é repetido com a reintrodução da enxertia para acúmulo novamente de geleia, tendo uma frequência de 3 vezes por semana nos meses de maio e julho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho conduzido foi uma continuidade do projeto de 2021/2022, mesmo com os resultados obtidos, foram necessários alguns ajustes no apiário e no manejo para melhorar a produção de geleia real, como por exemplo, a redução do horário de 72h para 48h, na tentativa ampliar a produção. Segundo os dados obtidos e descritos na tabela 1, no mês de maio, dentre as 8 datas possíveis de enxertia foram observadas coletas em apenas 4 períodos com um peso total de amostras de 4,50g/coleta e média de 1,12g, no mês de julho com 11 datas possíveis para coletas, só foi obtido sucesso em 7 datas distintas com produção total de 3,12g/coleta e média de 0,45g. Esses valores não apresentam diferença significativa em termos de comparação de médias ($p < 0,05$).

Mesmo com a uniformidade no manejo das colmeias, percebe-se que a variação de produção e rendimento entre elas, estando no mesmo local do início do estudo. Essas variações podem estar associadas a tecnologia, genética, manejo e experiência prática (Martinez e Soares 2012). Os valores de média no mês de maio apresentam peso semelhante aqueles encontrados na literatura (MOURO E TOLEDO, 2005; GARCIA E NOGUEIRA-COUTO 2005). Para o mês de julho, no entanto, foi observado uma redução nos valores, confirmando uma variação na produção de geleia real para abelhas melíferas africanizadas com médias de 1,8 a 7,96 g/coleta.

Observando a variável bioma, Silveira Neto (2011) em região de semi-árido obteve média de 0,1641g no estado do Ceara e Queiroz (2001) obteve média de 0,118g no agreste pernambucano, valores estes, inferiores aos do ecótono Cerrado Amazonia, encontrados neste experimento.

Os diferentes biomas brasileiros também interferem de forma significativa nas atividades, levando em consideração os curtos períodos produtivos ao longo do ano, a exemplo dos quatro meses na região da caatinga e seis meses no cerrado e/ou transição Cerrado Amazônia, longos períodos de precipitações pluviométricas, bem como a variação mensal da oferta de pólen e néctar, são fatores relevantes e que devem ser considerados no momento do planejamento desta atividade apícola (QUEIROZ et al., 2001; RAMALHO-SOUZA e al., 2017).

Data	Régua 1	Régua 2	Total
Maio			
Dia 15	0,41	1,35	1,76
Dia 17	0,00	0,25	0,25
Dia 19	0,33	0,62	0,95
Dia 22	0,64	0,89	1,53
Dia 24	0,00	0,00	
Dia 26	0,00	0,00	
Dia 29	0,00	0,00	
Dia 31	0,00	0,00	
Média*	0,17	0,39	1,12
Total			4,50
Julho			
Dia 3	0,00	0,00	
Dia 5	0,13	0,00	0,13
Dia 7	1,11	0,37	1,48
Dia 10	0,12	0,11	0,23
Dia 12	0,22	0,34	0,56
Dia 14	0,15	0,13	0,29
Dia 17	0,00	0,00	
Dia 19	0,12	0,13	0,25
Dia 21	0,19	0,00	0,19
Dia 24	0,00	0,00	
Dia 26	0,00	0,00	
Média *	0,18	0,10	0,45
Total			3,12

*(p > 0,05)

Tabela 1 – Ensaio sobre produção de geleia real, em gramas, em colônias de abelhas melíferas africanizadas submetidas a introdução de quadro porta cúpula por 48h, localizadas em região de transição Cerrado Amazônica. Araguaína, TO. 2023

Os resultados obtidos comprovam a possibilidade de produção de geleia real no estado do Tocantins.

Com as variações de resultados obtidos nas produções nos dois períodos de estudo, demonstram a necessidade de ajustar a metodologia e manejo para obter resultados mais significativos.

REFERÊNCIAS

MARTOS, M. V.; NAVAJAS, Y. R.; LÓPEZ, J. F.; ÁLVAREZ, J. A. P. Funcional properties of honey, propolis and royal jelly. **Journal of food science**, 73 (9): 117-124p, 2008.

MENDONÇA, K. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellífera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, v.38, p.1748-1753, 2008.

QUEIROZ, M.L; BARBOSA, S.B.P; AZEVEDO, M. Produção de geleia real e desenvolvimento da larva de abelhas *Apis mellífera*, na região Semi-Árida de Pernambuco. **Rev. Bras. Zootec.** Vol.30 n.2 Viçosa Mar./Abr. 2001

RAMALHO-SOUSA, D.S.; TAVARES, D.H.S.; ROSA, F.L.; SOUSA, L.F.; RIZZARDO, R.A.G. Dinâmica populacional de colônias de *Apis mellífera* durante o período chuvoso na região de Araguaína. **Revista Desafios**, Palmas, v.03, n. Especial, 2016 (suplemento). 2017

ROSA, F.L.; SILVA, A.L.; SILVA, A.O.DA; SOARES, C.A.V.; SOUSA, L.F.; RIZZARDO, R.A.G. Sazonalidade da produção de pólen apícola em área de ecótono Cerrado Amazônia, no município de Araguaína, TO. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 24, Vitória, ES. **Anais... XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia**, 2014.

SILVEIRA NETO, AA et al. Influência do tempo de manejo em colmeias recria para a produção de geleia real. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 900-906, jul./set. 2020

SILVEIRA NETO, AA. Avaliação de quatro métodos de produção de geleia real e rainhas de *Apis mellífera* no estado do Ceará. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SOUZA, D.S.R.; TAVARES, D.H.S.; ROSA, F.L.; BEZERRA, L.S.; SOUSA, L.F.; RIZZARDO, R.A.G. Dinâmica da produção de pólen por abelhas melíferas em área de Ecótono Cerrado Amazônia. In: **Anais**, Congresso Brasileiro de Apicultura, 20. CONBRAPI 2014. Belém – PA. 2014.

TAVARES, D.H.S.; ROSA, F.L.; SOUSA, D.S.R.; SOUSA, L.F.; RIZZARDO, R.A.G. Dinâmica da produção de mel por abelhas melíferas em área de Ecótono Cerrado Amazônia. In:... **Anais**, Congresso Brasileiro de Apicultura, 20. CONBRAPI 2014. Belém – PA. 2014.

WIESE, H. **Apicultura. 2. ed.** – Guaíba: Agrolivros, 2005. 378p.

WIESE, H. **Nova Apicultura. 9ª edição.** Guaíba Agropecuária. 1993. 439p.

WINSTON, M. **The Biology of the Honey Bee.** Harvard University Press. 1991. 294p.

ATLAS DE HEMATOLOGIA VIRTUAL: UM GUIA PRÁTICO

Data de aceite: 02/05/2024

Gustavo Carvalho de Castro

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/3499560190287090>

Paulo Murillo Neufeld

Faculdade de Farmácia – UFRJ
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/3352482909975466>

Marcos Kneip Fleury

Faculdade de Farmácia – UFRJ
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/2281362757604724>

José Firmino Nogueira Neto

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/2851039552809762>

tecnologias de informação e comunicação (TIC) expandiram o ensino online e proporcionaram um maior acesso ao ensino, sobretudo em situações especiais como a pandemia da COVID-19, momento em que houve uma grande aceleração do desenvolvimento destas ferramentas, popularizando e impulsionando o “ensino à distância” (EAD) de forma global. Este ambiente de ensino digital, também conhecido como *u-learning* (*ubiquitous learning*) ou “aprendizagem onipresente”, é desenvolvido para aplicativos de dispositivos móveis, o que proporciona facilidade ao acesso e flexibilidade de tempo, local e horário para a sua utilização. A elaboração do aplicativo “Atlas em Hematologia, um guia prático” visou proporcionar o aprimoramento técnico em citologia hematológica, considerando a dificuldade de estudantes e profissionais da área de análises clínicas, sobretudo daqueles que atuam nos laboratórios de hematologia, na prática de identificação, descrição e correlação laboratorial dos elementos celulares que são avaliadas no hemograma, um dos exames laboratoriais mais importantes e solicitados na prática clínica. Como resultado, foi elaborado um aplicativo no formato de um atlas digital com acesso gratuito através

RESUMO: Os atuais modelos de ensino têm utilizado diversas tecnologias no processo de aprendizagem e desenvolvimento técnico, incluindo as ferramentas de multimídia e metodologias ativas, que tornam essas atividades mais dinâmicas e atrativas. Esse dinamismo das tecnologias aplicadas ao ensino, sobretudo na área de saúde, contribui para o aprimoramento profissional e o aumento da qualidade dos serviços prestados à população. As novas

de dispositivos eletrônicos via internet, e constituído de um amplo acervo de imagens das principais alterações morfológicas de leucócitos, hemácias e plaquetas, além das descrições das principais características morfológicas celulares, como tamanho, cor, forma, inclusões, correlações clínicas e laboratoriais. Espera-se que este trabalho seja visto como incentivo e referência para a construção de novos aplicativos, não só na área de hematologia, como em todas as áreas da medicina.

PALAVRAS-CHAVE: Aplicativo – Hematologia – Ensino – Tecnologia

VIRTUAL HEMATOLOGY ATLAS: A PRACTICAL GUIDE

ABSTRACT: The current study models have used several technologies in the process of learning and technical development, including the multimedia tools and active methodologies that make these activities more dynamic and attractive. This dynamism of technologies applied to the study, especially in the health area, contributes to professional improvement and to increase the quality of services provided to the population. The new information and communication technologies (TIC) expanded the online teaching and provided a greater access to education, especially in special situations like the COVID-19 pandemic, when there was a great acceleration of development of these tools, popularizing and promoting distance learning (EAD) globally. This digital teaching environment, also known as u-learning (ubiquitous learning) or “omnipresent learning”, is developed for mobile device applications, which provides easy access and flexibility of time and place for its use. The elaboration of the application “Atlas em Hematologia, um guia prático” aimed to provide the technical improvement in hematological cytology, considering the difficulty of students and professionals in the clinical analysis area, especially those who work in hematology laboratories, in the practice of laboratory identification, description and correlation of cellular elements that are evaluated in the blood count, one of the most important and requested laboratory tests in clinical practice. As a result, an application was developed in the format of a digital atlas with free access through electronic devices via the internet, and constituted of a large collection of images of the main morphological alterations of leukocytes, red blood cells and platelets, in addition to the descriptions of the main cellular morphological characteristics, such as size, color, shape, inclusions, clinical and laboratory correlations. It is hoped that this work will be seen as an incentive and reference for the construction of new applications, not only in the area of hematology, but in all areas of medicine.

KEYWORDS: Application - Hematology – Teaching – Technology

INTRODUÇÃO

Os atuais modelos de ensino têm utilizado diversas tecnologias no processo de aprendizagem e desenvolvimento técnico. Esse dinamismo das tecnologias aplicadas ao ensino, contribui para o aprimoramento profissional e o aumento da qualidade dos serviços prestados à população (Salvador *et al*, 2018). As novas tecnologias de informação e comunicação (TIC) expandiram o ensino online e proporcionaram um maior acesso ao ensino, sobretudo na pandemia da COVID-19, momento em que houve uma aceleração do desenvolvimento destas ferramentas, popularizando e impulsionando o “ensino à distância”

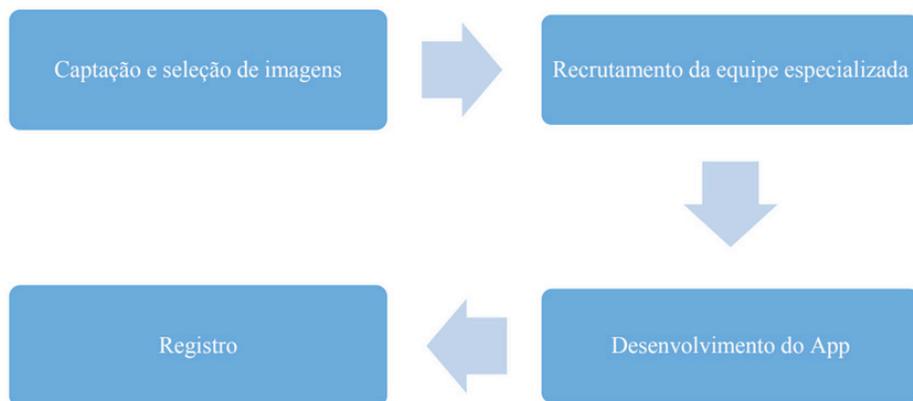
(EAD) de forma global (Valverde *et al*,2021), (Torres *et al*,). Este ambiente de ensino digital, também conhecido como *u-learning* (*ubiquitous learning*) ou “aprendizagem onipresente”, é desenvolvido para aplicativos de dispositivos móveis, proporcionando facilidade ao acesso e flexibilidade de tempo, local e horário para a sua utilização, além de promover interações entre estudantes e professores (Lima *et al*, 2020), (Pinto, 2020), (Samantha *et al*, 2017). O ensino digital tem sido uma modalidade de aprendizagem adequada e desejável para atender às novas demandas educacionais geradas pelas mudanças globais (Belloni, 2009). A elaboração do aplicativo “Atlas em Hematologia: um guia prático” visou proporcionar o aprimoramento técnico em citologia hematológica, considerando a dificuldade de estudantes e profissionais da área de análises clínicas, sobretudo daqueles que atuam nos laboratórios de hematologia, na prática de identificação, descrição em laudo e correlação laboratorial dos elementos celulares que são avaliadas no hemograma, um dos exames laboratoriais mais importantes e solicitados na prática clínica. O avanço tecnológico observado nos últimos anos sobre a automação em hematologia laboratorial não substitui, até o presente momento, a competência técnica e a necessidade da revisão dos resultados por um profissional qualificado. É indiscutível que os equipamentos podem realizar contagens e avaliar características morfológicas de modo muito preciso. Entretanto, quando nos deparamos com diferenças significativas nos resultados obtidos automática e manualmente como, por exemplo, o número de monócitos, a dúvida de como relatar o resultado se torna um problema bastante comum. Como interpretar estes resultados? Diferentemente dos livros de hematologia encontrados onde se pode pesquisar as mais diversas doenças e ter acesso ao diagnóstico laboratorial através das células encontradas, a proposta do app é promover o caminho inverso. A pesquisa será iniciada a partir de um resultado obtido ou uma célula encontrada que suscita dúvida no profissional e, desta forma, consulta - se o atlas para ter acesso às informações sobre a célula encontrada e/ou um dado obtido, e a associação com as condições clínicas pertinentes e maneira correta da descrição em laudo.

OBJETIVOS

Disponibilizar para comunidade de analistas clínicos dados técnicos científicos a partir das características morfológicas observadas, onde o usuário poderá, de forma rápida e prática, obter a identificação da célula encontrada, as possíveis correlações clínicas associadas a esta célula por meio de imagens contextualizadas, ilustrações e textos explicativos e desta forma, contribuir para o aperfeiçoamento técnico e prático em citologia hematológica.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido e executado no Laboratório de hematologia/SLA do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), em parceria com o Laboratório de hematologia/SPC do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) onde também exerço minhas atividades profissionais lotado como servidor em ambos. O fluxograma da produção de um aplicativo deve considerar a sua função, público-alvo e elaboração de um roteiro, levando em consideração a praticidade de utilização pelo usuário como mostrado na figura 1.



Legenda: Roteiro ilustrativo em forma de fluxograma de produção do aplicativoFonte: o autor

Figura 1: Fluxograma de produção do aplicativo

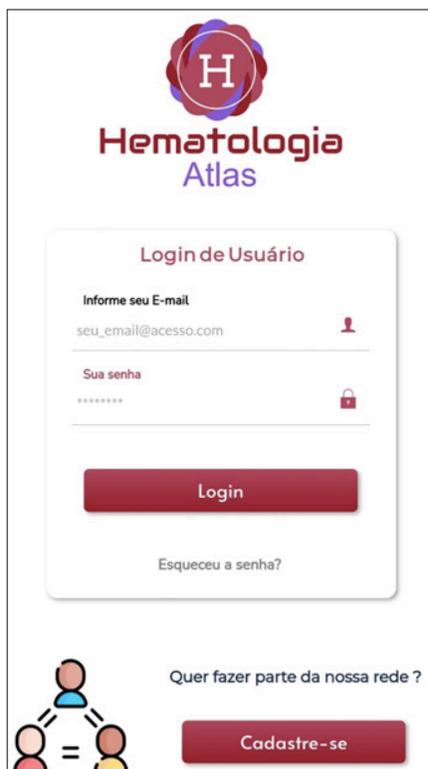
A captura das imagens das células hematológicas foi realizada através da utilização do equipamento CellaVision® DM9600, utilizado conforme o manual do fabricante disponível em *Instructions for Use Proficiency Software* (PM-11030-01) (cellavision-proficiency.com). A captura e utilização das imagens foram realizadas com a anuência e autorização da chefia imediata do serviço de Patologia Clínica. Foi utilizado também um smartphone do fabricante SAMSUNG, modelo S22 Galaxy Ultra para captura das imagens. A configuração utilizada no smartphone para captura das imagens foi F2,4 – 1/120s – 4,32mm – ISO 160 – Balanço de branco automático e sem flash e um microscópio NIKON E-200 utilizando objetiva de 100X e ocular de 20X. Foram coletadas aproximadamente 600 imagens que ficaram armazenadas e selecionadas posteriormente para confecção do app. Após a definição do nome, optou-se por um logotipo simples, e um padrão de cores leves e letra “H” no centro fazendo menção a Hematologia como mostra a figura 2.



Legenda: Logotipo do aplicativo, utilizado como identidade visual do aplicativo. Fonte: O autor
Figura 2: Logotipo do aplicativo

Para o desenvolvimento do aplicativo, foi utilizado o Bubble.io, uma plataforma de desenvolvimento que apresenta a criação de aplicativos e *softwares* de forma intuitiva. Após a programação, gerou-se o produto mínimo viável (MPV). E, assim, foi possível fazer o registro da propriedade intelectual do aplicativo na Câmara Brasileira do livro (CBL) sob o Número: 8dbf331795b5929069e2b5a3e425acbd91e074ce59f9ad44fe3413cf42e19405. Resultados

No primeiro acesso ao aplicativo baixado, o usuário fará seu cadastro no “login de usuário” fornecendo nome, e-mail, telefone, Estado, Cidade, profissão e criando uma senha de acesso, Como mostrado na figura 3.



Legenda: Tela onde o usuário efetua seu cadastro, faz login para acesso ao aplicativo e recupera senha.
Figura 3. Login de usuário. Fonte: O autor

Em seguida, o usuário entra na tela principal do aplicativo como dito na figura 4, onde, na parte superior, há um espaço reservado para textos e vídeos informativos de interesse de profissionais e estudantes de análises clínicas. Tem acesso também às categorias, onde o usuário encontra informações e imagens sobre as células a serem pesquisadas. Nesta tela ainda, pode-se encontrar informações do seu perfil cadastrado e também suporte para dúvidas e sugestões diretamente com o autor.



Legenda: Tela principal do aplicativo onde o usuário acessa as categorias celulares, suas informações cadastradas no perfil e suporte. Fonte: O autor

Figura 4. Tela principal

Entrando na aba “categorias”, o usuário é direcionado às opções de busca por categorias dos tipos celulares como mostra a figura 5.



Legenda: Aba de busca por categorias celulares contextualizadas

Figura 5. Categorias celulares. Fonte: O autor

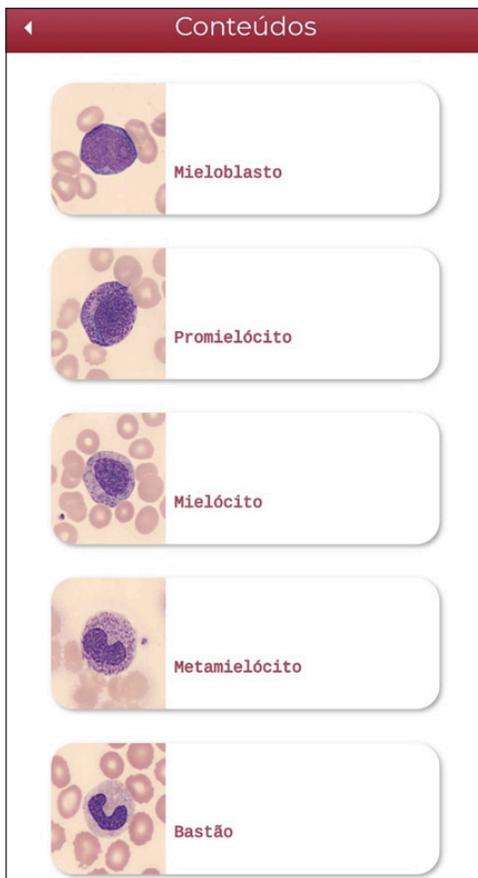
Em seguida o usuário pode optar pela linhagem celular a ser pesquisada e foi usado como exemplo o item “série branca” como mostra a figura 6.



Legenda: Tela onde o usuário começa a fazer busca por tipo celular de interesse

Figura 6. Introdução. Fonte: O autor

Nesta tela mostrada na Figura 6, foi usado como exemplo a aba “alterações leucocitárias” onde o usuário tem acesso a diversas opções de pesquisa sobre inúmeras alterações leucocitárias como mostra a tela de “conteúdos” na figura 7.

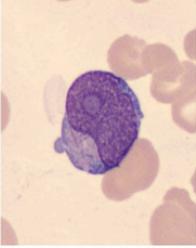
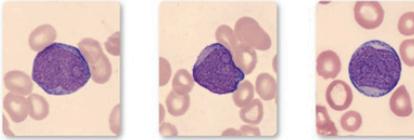


Legenda: Tela com opções de pesquisa disponível ao usuário contido no item “alterações leucocitárias”.

Figura 7. Tela de conteúdos. Fonte: O autor.

Na aba de conteúdos mostrada na figura 7, foi usado como exemplo a aba “Mieloblastos”. Nesta aba, “Análise sobre Mieloblasto”, o usuário tem acesso imagens desta célula onde é permitido inclusive ver com aumento (zoom) para observação e identificação de características morfofototintoriais. Tem acesso também a um “menu” de informações que segue o mesmo padrão para todas as células do aplicativo (Figuras 8a e 8b).

Análise sobre Mieloblasto

Categoria principal

Série Branca

Introdução

Alterações leucocitárias

Nome

Mieloblasto

Legenda: Tela “análise do mieloblasto”, ilustrações e informações sobre a célula pesquisada.

Figura 8a. Análise sobre mieloblasto Fonte: O autor

Descrição

Apresentação morfológica:
 células blásticas da maturação mielóide, apresentam um diâmetro de 12 - 20 µm com núcleo relativamente grande, redondo ou oval exibindo cromatina frouxa e delicada podendo exibir um ou mais nucléolos. O citoplasma possui alta relação como núcleo e é levemente basofílico, não há Sistema de Golgi visível e os grânulos podem estar presentes ou não.

Alterações laboratoriais correlacionadas:
 Os blastos podem estar presentes em pacientes com leucócitos aumentados, normais e até mesmo diminuídos. Às vezes a leucocitose com presença de blastos podem estar acompanhadas de anemia e plaquetopenia (triade leucêmica ou bicitopenia).

Descrição em laudo:
 Os blastos devem ser reportados apenas como blastos pois é impossível sua diferenciação em lâmina de sangue periférico, havendo a necessidade de exames complementares para sua identificação. Alguma característica morfológica presente que seja de importância diagnóstica deve ser descrita. A presença de 1% já indica malignidade, por isso é muito importante que os blastos sejam sempre quantificados quando presentes.

Correlações clínicas:
 Estas células devem estar presentes apenas na medula óssea, mas podem ser vistos na circulação periférica nas doenças mieloproliferativas como leucemias mielóides e síndromes mielodisplásicas.

Fechar

Legenda: Parte textual descritiva de informações contextualizadas como continuação da aba “Análise do mieloblasto. Fonte: O autor.

Figura 8b. Análise sobre mieloblasto

DISCUSSÃO

Monteiro, 2005 afirmou que o hemograma é um exame laboratorial de rotina para avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue periférico, sendo um dos exames mais solicitados para diagnósticos, avaliações clínicas e acompanhamentos de diversas doenças. Ryan, 2005 acrescentou que o hemograma é um coadjuvante útil em todos os setores da clínica. Arroyo, 2005 afirmou que mesmo com toda tecnologia da automação, a observação do analista clínico ao microscópio ainda é indispensável. O Atlas de Hematologia virtual foi desenvolvido para ser um recurso pedagógico digital não só no ensino da Hematologia como também para o analista clínico da bancada no seu dia a dia. Devido à facilidade de uso, pode ser utilizado durante a prática profissional, como ferramenta norteadora em alguma questão prática ou, ainda, como instrumento para a educação continuada, levando o laboratório até o aprendiz, onde quer que ele esteja. O presente trabalho concordou com Tamousauskas, 2011 que acrescentou ainda que o desenvolvimento de aplicativos ou material tecnológico com fins educacionais, constituem instrumento facilitador de aprendizado, já que não substituem o professor ou o livro-texto, mas são encarados como recurso complementar para enriquecer e favorecer o processo educativo e o conhecimento.

CONCLUSÃO

O aplicativo desenvolvido poderá contribuir para o aperfeiçoamento técnico dos profissionais e estudantes de análises clínicas, especificamente na área de citologia hematológica, de forma rápida, segura e prática, trazendo mais qualidade e fidelidade na identificação de células hematológicas, correlações clínicas e liberação correta de laudos. Espera-se, também, que este trabalho seja visto como incentivo e referência para a construção de novos aplicativos, não só na área de hematologia, como em todas as áreas da medicina. A existência deste recurso pedagógico objetivo, conciso e direcionado para a prática do dia a dia, pode facilitar o diálogo entre diferentes profissionais, como os de laboratório e médicos assistentes, facilitando a prática de ambos e, principalmente, beneficiando os pacientes. Ressalta-se ainda a importante relação entre saúde, aprendizado e tecnologia.

REFERÊNCIAS

Abensur S.I, Tamousauskas M.R.G. **Tecnologia da Informação e Comunicação na Formação Docente em Saúde: Relato de Experiência**. Revista Brasileira de Educação Médica. 2011. 35 (1):102-07.

Arroyo ME, Taberner MD, Garcia MMA, Orfao A. **Analytic performance of the Pentra 80 automated blood cell analyser for the evaluation for normal and pathologic WBCs**. Am J. Clean Phatol 2005. 123(2):206-14.

Belloni ML. **Educação a distância**. 5 ed. Autores Associados, 2009.

Lima C, Bastos RC, Varvakis G. **Digital Learning Platforms: An Integrative Review to Support Internationalization of Higher Education.** Educ Rev. 2020. 36:e232826.

Monteiro FG. **Comparação dos resultados de hemogramas do contador eletrônico ABX Pentra60 com a microscopia.** Universidade Federal do Rio grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 2005.

Pinto M, Leite C. **As tecnologias digitais nos percursos de sucesso acadêmico de estudantes não tradicionais do Ensino Superior.** Educ Pesqui. 2020. 46:e216818.

Ryan DH. **Automated Analysis of Blood Cels.** In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ & Silbertein LE eds. Hematology – Basic principles and practice 2 ed. New York: Churchill Livingstone. 1995. 2223-35.

Salvador PTCO, Mariz CMS, Vítor AF, Ferreira Jr MA, Júnior MAF, Fernandes MID, Martins JCA. **Validation of virtual learning object to support the teaching of nursing care systematization.** Rev Bras Enferm. 2018; 71(1):11-19.

Samantha AB, Cummins M, Davis A, Freeman A, Hall Giesinger C, Ananthanarayanan. **NMC horizon report: higher education** edition. 2017.

Torres, PL, Marriott, RCV, Matos, ELM. **Mediação pedagógica com o uso de mapas conceituais em ambiente virtual de aprendizagem.** In: Ens RT, Behrens, Vosgerau DSR. Trabalho do professor no espaço escolar. Curitiba: Champagnat, 2009.

Valverde-Berrocoso J, Fernández-Sánchez MR, Dominguez FIR, Sosa-Díaz MJ. **The educational integration of digital technologies preCovid-19: Lessons for teacher education.** Plos One. 2021. 16(8):e0256283.

AVALIAÇÃO DE MODELO DIDÁTICO SOBRE A HERANÇA DA ANEMIA FALCIFORME NO ENSINO DE GENÉTICA

Data de aceite: 02/05/2024

Franciane de Moura Nunes

Graduanda do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Piauí / Universidade Aberta do Brasil, Polo de Apoio Presencial de Buriti dos Lopes – PI

Leomá Albuquerque Matos

Professor do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, campus Ministro Petrônio Portella Centro de Educação Aberta e a Distância, Teresina-PI

RESUMO: As aulas teórico-práticas são importantes para o processo de ensino e aprendizagem, pois se complementam. Modelos didáticos feitos com materiais de baixo custo podem ser boas ferramentas para auxiliar a construção do conhecimento dos alunos. Este estudo objetivou avaliar a eficiência de uma ferramenta didática para o ensino de genética e os fatores de herança ligados a anemia falciforme com alunos do terceiro ano do ensino médio regular na cidade de Parnaíba-PI. Questionários (pré-teste) e (pós-teste) depois da exposição teórico-prática foram realizados. Os resultados revelaram a contribuição positiva do modelo no nível de acertos dos alunos,

de 51,6% (pré-teste) para 65,6% (pós-teste). O modelo didático é de grande importância para melhoria do aprendizado dos alunos, devendo ser aplicado de forma conjugada com aulas teóricas.

PALAVRAS-CHAVE: aprendizagem, atividade lúdica, biologia, hereditariedade

EVALUATION OF A TEACHING MODEL ON THE INHERITANCE OF SICKLE CELL ANEMIA IN GENETICS TEACHING

ABSTRACT: The theoretical-practical classes are important to the process of teaching and learning, because one complement each other. Didactic models made with inexpensive materials can be good tools to support the construction of student knowledge. This study aimed to evaluate the efficiency of an educational tool for the teaching of genetics and inheritance factors linked to sickle cell anemia with third-year students from regular high school in Parnaíba-PI. Questionnaires (pretest) and (posttest) after the theoretical-practical exposure were performed. The results revealed the model's positive contribution at the level of correct answers of students, 51.6% (pretest) to 65.6% (posttest). The

teaching model has a great importance for improving student learning and must be applied combined with theoretical classes.

KEYWORDS: learning, leisure activity, biology, heredity.

INTRODUÇÃO

A Genética é a área da Biologia que estuda a hereditariedade, intimamente ligada ao material genético mais conhecido como DNA, com foco principal nos genes; é através dela que podemos compreender, por exemplo o fato pelo qual os filhos se assemelham aos pais. A Genética é uma área fundamental para a Biologia, sendo importante para compreensão de diversas linhas de pensamentos relacionados ao estudo da vida. (JUSTINA *et al.* 2003).

O estudo de Genética tem grande importância ao despertar interesse nos alunos a partir de avanços tecnológicos e científicos, que podem ser aplicados de forma prática, contextualizada e prazerosa. (OLIVEIRA *et al.* 2010). O estudo das doenças genéticas, que trata de um tema relacionado a saúde humana, pode estimular com mais frequência a participação do aluno na sala de aula ao conciliar com seu senso comum (JUSTINA *et al.* 2006).

A anemia falciforme é uma doença hereditária não muito distante da realidade dos alunos, podendo ser usada como exemplo para contextualização de diversos conceitos no campo da genética de acordo Casagrande *et al.*(2006). A herança desta doença caracteriza-se pela deformação nas células do sangue (as hemácias), ficando em formato de foice e dificultando assim a passagem pelos vasos sanguíneos. A presença de uma diferente hemoglobina, chamada Siclênica ou simplesmente hemoglobina S substitui do ácido glutâmico na cadeia normal de proteínas das células do sangue, causando sérios problemas no transporte de oxigênio. (BEIGUELMAN, 2008).

Coimbra *et al.* (2010) e Moura *et al.* (2013) defendem que os próprios docentes de Biologia revelam ter dificuldade em compreender, acompanhar e mediar a aprendizagem de conteúdos com as últimas novidades científicas e tecnológicas, falta pré-requisitos. Os alunos na maioria das vezes estão submetidos a entender o assunto por meio do quadro e do pincel, da voz do professor, de listas de exercícios e de imagens ilustrativas no livro didático, falta dinâmica no conteúdo e como resultado, o processo de aprendizagem fica comprometido.

O ensino–aprendizagem não pode ficar apenas restrito em âmbito escolar, principalmente quando se trata de ciências, é necessário ultrapassar as dificuldades, outras propostas pedagógicas podem serem aplicadas, estudadas, metodologias diversificadas a favor do conhecimento científico do aluno e professor na construção da educação mediadora. Segundo os autores Vieira (2010) e Gomes *et al.* (2014), os modelos didáticos podem ser importantes ferramentas na hora de ensinar e aprender.

Na Genética, seguindo o pressuposto desta ciência, o professor ao repassar o assunto sobre herança genética da anemia falciforme tem a responsabilidade de explicar diversos conceitos que são importantes e auxiliaram na compreensão desta hereditariedade. Tais conceitos refere-se: genótipo, fenótipo, alelos, gene, dominância, recessividade, codominância, cruzamento, entre outros, que a princípio vem dos estudos realizados por Gregor Mendel, considerado o pai da Genética (BRANDÃO *et al.* 2009).

Gregor Mendel ao realizar os estudos com as ervilhas no final do século XIX, tinha o objetivo de provar a transmissão de características ao longo das gerações e conseguiu explicar formulando as leis sobre hereditariedade que são utilizados até hoje (NETTO, 2012). De acordo com Neves *et al.* (2014) um conteúdo complexo e descontextualizado pode desestimular o aluno na hora de aprender.

Ensinar genética é um desafio, fazer com que o aluno relacione a teoria e prática, a compreensão sobre os princípios básicos da hereditariedade sem que haja a simples 'decoreba' de conceitos, mas sua aplicabilidade em assuntos relevantes, como a herança de patologias observadas no cotidiano. A complexidade da genética pode fazer o aluno aprender muitas vezes de forma superficial, neste caso os professores precisam se preparar para motivar os discentes em sala de aula de forma lúdica, assim poderão vir a desenvolver seus próprios questionamentos sobre os conteúdos (SHULLER *et al.* 2013)

Para a Legislação de Diretrizes e Bases (LDB) de 1996 Art. 35, uma das finalidades do Ensino Médio, etapa final da educação básica, é a compreensão dos fundamentos científicos tecnológicos dos processos produtivos, relacionando a teoria com a prática, no ensino de cada disciplina. Os Parâmetros Curriculares Nacionais (BRASIL, 1998) embasam ainda, que deve ser dado um maior enfoque na experimentação.

Para Herman *et al.* (2013), entender genética envolve vários conceitos que na maioria das vezes são mesmo difícil de aprender, e na tentativa de facilitar o aprendizado dos alunos é importante a utilização de atividades dinâmicas que ajudem na compreensão dos conceitos entre as quais ferramentas e instrumentos inovadores.

Lima *et al.* (2012) enfatiza que ao aplicar um modelo didático, o professor estará incentivando a participação, a interatividade, o pensamento crítico do aluno, além de testar outras habilidades e propor uma forma alternativa de ensino facilitado que na maioria das vezes a escola não dispõe, fazendo cumprir o ofício de fazer os alunos assimilar o conteúdo abordado de forma real, participativa e representativa. O modelo concede ao aluno como o ativo no processo de construção de conhecimentos atribuídos ao professor a responsabilidade de criar situações que estimulem e facilitem sua aprendizagem como proposto por Querudino *et al.* (2011).

A pesquisa justifica-se na importância de auxiliar o processo de aprendizagem dos alunos no campo da genética por meio de atividades lúdicas como o modelo didático a um custo/benefício baixo e de fácil aplicação para que tornem capazes de assimilar conceitos básicos e possam aplicar no cotidiano. De acordo com Masini (2011) o conhecimento significativo é quando o aprendiz usufrui da capacidade de conectar e contextualizar as diversas informações que os cerca.

O presente trabalho tem a finalidade apresentar um referencial teórico, com estratégia principal coletar dados num estudo de caso sobre a herança da anemia falciforme ligado ao ensino de genética, a perspectiva é baseada em atividades lúdicas da revista Genética na Escola. Usando um teste estatístico e obedecendo sempre o nível de significância $p < 0,05$ em teste de hipóteses, a proposta é avaliar se a prática com modelo didático facilita o processo de aprendizagem dos alunos do 3º Ano do Ensino médio público de Parnaíba-PI.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada numa escola pública da rede estadual de ensino da cidade de Parnaíba- PI entre os meses de Agosto a Setembro do ano de 2015 por meio da aplicação de questionários em quatro turmas do 3º Ano do ensino médio de ensino regular, sendo duas do turno manhã e duas do turno tarde, total de 75 alunos.

Antes da coleta de dados a escola objeto de estudo autorizou formalmente a realização deste estudo, conforme formulário específico (Anexo A), assim como os alunos envolvidos na pesquisa foram perfeitamente esclarecidos sobre as necessidades e objetivos do trabalho, e concordaram participar, a partir de TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Os alunos menores de 18 anos participaram do estudo mediante a autorização prévia de seus pais ou responsáveis, também por TCLE.

Coleta de dados

Os dados foram obtidos a partir de questionários (o primeiro do tipo pré-teste e o segundo do tipo pós-teste) individuais, sobre a herança genética da anemia falciforme aplicados de forma individual para cada turma. A técnica utilizada para a coleta de dados dividiu-se em três etapas:

- Na primeira etapa –foi aplicado um questionário (pré-teste, Apêndice B) com o objetivo de diagnosticar o conhecimento prévio dos alunos sobre o conteúdo. possui ;
- Na segunda etapa – Exposição teórico/prática do assunto em duas aulas de 40 minutos cada, para a uma das turmas do turno manhã e outra do turno tarde, enquanto que as outras duas turmas que restaram foi apenas a aula teórica do assunto, tudo ministrado pela própria pesquisadora com apoio do(a) professor(a) de cada turma.
- Na terceira etapa – Depois da prática com o modelo didático, foi aplicado um segundo questionário (pós-teste, Apêndice C), de caráter avaliador enquanto que as turmas que tiveram apenas aula teórica tiveram um intervalo de dois dias para responderem o mesmo questionário com objetivo de avaliar o conhecimento dos alunos após o conteúdo.

Descrição do modelo didático

O modelo didático (Anexo B) foi uma proposta lúdica para que os alunos compreendessem melhor a herança da anemia falciforme, bem como alguns termos importantes no campo da genética. Foi realizado com materiais de baixo custo, inspirado em modelos estudados da Revista Genética na Escola, para este foram utilizados:

- 2 caixas de papel com tamanho de 20cm x 20cm
- 40 bolinhas de isopor
- 2 tintas de tecido azul e vermelha
- 1 tesoura
- 1 cola quente
- 30 cm de TNT preto

Em cada uma das caixas foram colocadas 20 bolinhas de isopor em duas cores distintas, do qual uma cor vermelha representaria o Alelo normal 'A' e a cor azul representaria o alelo mutante 'S'. Este modelo didático foi usado para os alunos sortearem o maior número de filhos possíveis de pais heterozigotos com característica normal, porém com capacidade de transmitir a doença. Assim cada caixa foi modelo representativo dos progenitores e cada genótipo sorteado os filhos deste casal.

Análise de dados

Os dados foram analisados quantitativamente por teste estatístico ANOVA com pós-Test t, considerando o nível de confiança de $p < 0,05$ para discorrer sobre o processo de aprendizado dos alunos. A partir do qual foram organizados em tabelas e gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 75 questionários sobre o conhecimento prévio dos alunos e 59 de caráter avaliador, totalizando 134 questionários nesta pesquisa (Tabela 01). Dentre os alunos que participaram, tinham idades de 16 a 24 anos, sendo 41,3% do sexo masculino e 58,7% do sexo feminino.

Turmas	(Questionário 1)	(Questionário 2)
Turma I	20	15
Turma controle I	22	13
Turma II	21	21
Turma controle II	12	10
TOTAL:	75	59
TOTAL GERAL DE AMOSTRAS:		134

Tabela 01: Relação das Turmas com as respectivas quantidades de questionários aplicados.

Houve desistência de 16 alunos durante a pesquisa, reduzindo a amostra do primeiro para o segundo questionário, pois os alunos foram informados por meio de TCLE sobre a total liberdade de participar ou não da pesquisa, podendo desistir em qualquer uma das fases sem nenhuma penalidade.

Diagnóstico do conhecimento inicial dos alunos

Os resultados do primeiro questionário (Apêndice B) mostrou que os alunos tinham conhecimento prévio do conteúdo de genética, porém insatisfatório quando se trata de alguns conceitos fundamentais da genética e sobre a anemia falciforme.

A análise geral do pré-teste mostrou que os alunos acertaram 51,6% com desvio padrão de 15,2%. Pode-se observar que nenhuma das turmas conseguiram alcançar uma média de 60% no primeiro questionário e observou-se também que existe diferença nas médias das turmas, quando comparadas entre si. A turma I (T1 – manhã) obteve a melhor percentual de acertos neste questionário, de 52,5% e a menor registrou-se na turma II (T2 - tarde) de 49,5%. Considerando a análise das turmas controles (TC1 - manhã) foi de 51,9% e (TC2 - tarde) foi de 51,6%.

Dos entrevistados por turno, observou-se que os alunos da tarde sentiram mais dificuldades com o teste em relação aos alunos do turno manhã(Gráfico 01).

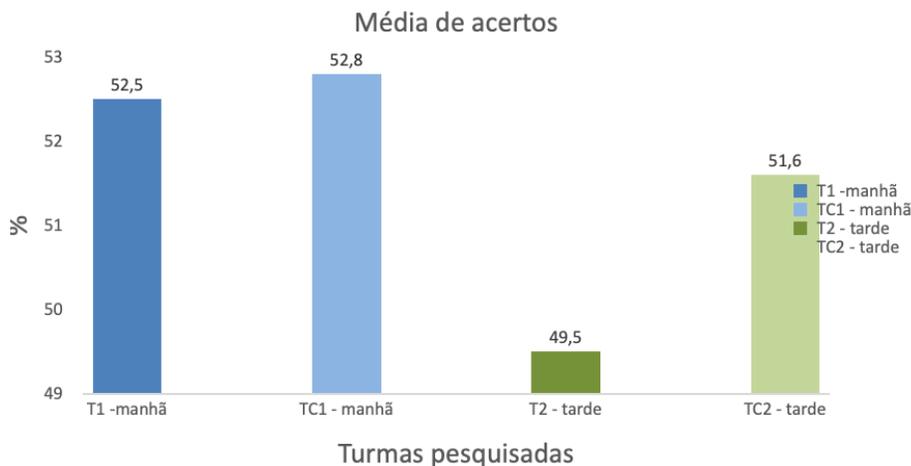


Gráfico 01: Média de acertos (%) do pré-teste em quatro turmas na cidade de Parnaíba-PI realizado entre os meses de Agosto e Setembro de 2015. T1= Turma I do turno manhã (com aula teórico/prática); TC1 = Turma controle I do turno manhã (com aula teórica); T2 = Turma II do turno tarde (com aula teórico/prática); TC2 = Turma controle II do turno tarde (com aula teórica).

Em relação as dez questões específicas dos 75 questionários respondidos, os alunos apresentaram uma variação de conhecimento quanto as perguntas. A tabela 02 mostra os resultados em (%) dos informantes da pesquisa para algumas questões do pré-teste. Na primeira questão 41,4 % julgaram verdadeira, onde dizia que a anemia falciforme não é

uma doença hereditária. Isso mostra que estes alunos sentiram dificuldades em diferenciar anemia falciforme de outro tipo de anemia muito mais comum na realidade dos alunos, a anemia nutricional adquirida pela deficiência do ferro ou ácido fólico no organismo.

Casagrande *et al.* (2006) defende que as doenças genéticas deveriam ser contextualizadas nas aulas de genética, não com o objetivo de informar os alunos sobre doenças comuns na sociedade, mas esclarecer sobre alguns conceitos que os alunos podem ter em relação a doenças genéticas. Segundo este mesmo autor, as pessoas devem ter conhecimento sobre doenças genéticas, já que este é um assunto tão comum na mídia hoje em dia e a escola deveria trabalhar esta questão com os alunos.

Quanto a caracterização dos alelos como formas alternativas de um gene 65,3% julgaram verdadeiro, mas apenas 41,3% afirmaram que a hemoglobina da doença falciforme é codificada pelo alelo mutante 'S'. Visto que, questões sobre alelos precisam ser exemplificadas e contextualizadas, pois a maioria dos alunos demonstraram nível de conhecimento suficiente para entenderem sobre a herança genéticas, porém ainda carentes de informações específicas.

As questões que os alunos tiveram um menor desempenho foram a 06 e a 10, em que 71,7% erraram ao afirmar que geração parental é a geração que finaliza um cruzamento, e apenas 21,3% diferenciaram corretamente o genótipo do fenótipo.

De acordo os estudos de Mendel geração parental diz respeito aos progenitores que inicia um cruzamento, o termo genótipo corresponde ao conjunto de genes de um organismo e fenótipo a característica mais o fator meio ambiente que exerce sob um organismo. Coimbra *et al.* (2010) em seu trabalho mostra que os alunos sentem dificuldades em lidar com alguns termos em genética e que uma das dificuldades maiores está relacionado a genótipo e fenótipo.

Questão	Verdadeiro (%)
A anemia falciforme não é uma doença hereditária.	41,4
Alelos são formas alternativas de um gene.	65,3
A hemoglobina normal da doença da anemia falciforme é codificada pelo alelo "A" e a hemoglobina mutante pelo alelo "S"	41,3
Geração Parental são os organismo que finaliza um experimento de cruzamento genético.	71,7
Genótipo e fenótipo são as características que podem ser observadas em um organismo.	78,7

Tabela 02: Resposta dos alunos em (%) para algumas questões do Pré-teste realizado numa escola da rede estadual de ensino da cidade de Parnaíba-PI.

Sobre as chances de uma criança cujo os pais são heterozigotos nascer com a doença anemia falciforme, os resultados surpreenderam em relação a todo questionário, pois foi registrado o melhor índice de acertos (72%). De acordo os professores, os alunos já estavam familiarizados com a primeira lei de Mendel, o que pode explicar uma associação com os cruzamentos feitos já em sala de aula entre indivíduos heterozigotos.

Sobre o conhecimento dos alunos sobre mutação, a porcentagem de acertos dos alunos foram 56% e 70,6%, questões 04 e 05 (Apêndice B) respectivamente. Observou-se que os alunos tinham a capacidade de saber o conceito de mutação relacionado a quinta questão, mas não sabiam onde a mutação da anemia falciforme de fato ocorreria correspondente a quarta questão.

Algumas questões mais complexas e um pouco mais contextualizadas foram abordadas com o objetivo de conhecer o nível prévio dos participantes, com exemplo indagações sobre o DNA ser toda informação genética de um ser vivo, mas não possui genes apenas 46,6% dos alunos acertaram. Outra questão foi sobre os pares de alelos do gene que caracterizava indivíduos normais, doentes e com traços falcêmicos obteve o mesmo índice de erros da questão anterior pelo fato da ambiguidade da questão ou por ser um pouco mais complexa quanto ao conteúdo.

Estes resultados podem ser explicados, a partir do trabalho de Moura *et al.* (2013) que faz uma breve reflexão literária acerca do ensino de biologia com enfoque na genética em escolas públicas brasileiras. Seus estudos apontam sobre a difícil compreensão dos alunos nesta área, talvez pela falta de contextualização em sala de aula próxima da realidade dos alunos, deixando claro que seria bom repensar maneiras de trabalhar este conteúdo.

Avaliação de aprendizagem após intervenção didática

Após a aula teórica e aplicação do modelo didático observou-se um desempenho positivo dos alunos em relação ao conteúdo de genética e a herança da anemia falciforme. Avaliou-se que tanto as turmas que tiveram a aula teórico/prática com o modelo didático, quanto as turmas que tiveram apenas aula teórica aumentaram a média na comparação entre os dois questionários.

A média geral dos setenta e cinco alunos que participaram do primeiro questionário (Q1) foi de 51,6%, já no segundo questionário (Q2) avançou para 65,6% numa amostra de cinquenta e nove participantes, considerando a análise de dados pelo teste de hipóteses ($p < 0,05$). Estes resultados foram satisfatórios, pois mostrou a eficiência do modelo didático em um estudo de caso sobre a herança da anemia falciforme, evidenciando sua aplicação de forma complementar a aula teórica. O gráfico 02 mostra sobre análise de comparação nos níveis de acertos (%) antes e depois da intervenção didática.

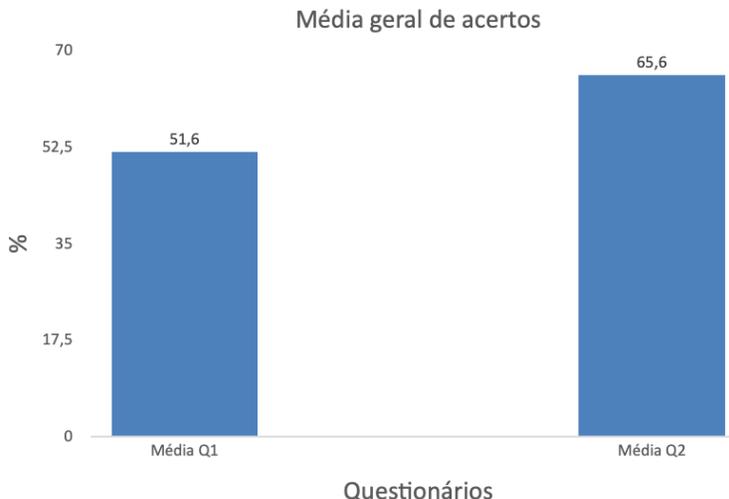


Gráfico 02: Quantidade de acertos (%) dos dois questionários (Q) aplicados com quatro turmas de 3º ano do ensino médio de uma escola pública de Parnaíba – PI. Q1 (primeiro questionário); Q2 (segundo questionário).

Quando comparado a média geral de cada turma entre o pré-teste e o pós-teste, ocorreu uma diferença entre as média de acertos (Gráfico 03). Das turmas da manhã, T1 teve um aumento na média de 15,5% de um questionário para o outro, já TC1 foi de 15,3%, uma diferença pequena, significa dizer que para os participantes da TC1, a aula teórica foi muito importante neste processo. Nas turmas da tarde, o avanço do processo de aprendizagem da T2 e TC2 foi de 14,7% e 11,45% respectivamente. Estes resultados reforça a ideia de Justina *et al.* (2006), que modelos didáticos são ferramentas muito importantes no processo de ensino aprendizagem, desde de que seja explicado o assunto anteriormente.

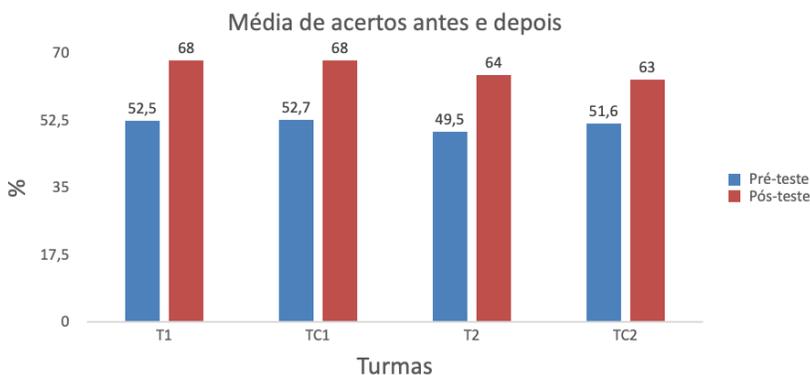


Gráfico 03: Média de acertos (%) entre o pré-teste e o pós-teste realizados em quatro turmas de 3º Ano do ensino médio de uma escola pública da cidade de Parnaíba – PI. T1 = Turma I do turno manhã (com aula teórico/ prática); TC1 = Turma controle I do turno manhã (com aula teórica); T2 = Turma II do turno tarde (com aula teórico/prática); TC2 = Turma controle II do turno tarde (com aula teórica).

Ao comparar as média de acertos entre as turmas que realizaram a aula teórico/prática com as turmas que realizaram apenas aula teórica percebeu-se que houve uma pequena diferença entre as mesmas na evolução de um questionário para o outro (Gráfico 04). Considerando o nível de confiança ($p < 0,05$) as turmas que realizaram aula teórico/prática obtiveram uma média geral de 51% no primeiro questionário de quarenta e um questionários respondidos e 66,1% no segundo questionário de trinta e seis questionários. Das turmas controles dos trinta e três pré-testes corrigidos, obtiveram uma média de 52,1% e de vinte e três pós-testes a média foi 65,7%. Visto que as ferramentas utilizadas foram muito importantes neste processo para todos os alunos, levando em conta a perda considerável da amostra na análise do pós-teste.

A cerca da estimulação do conhecimento científico no âmbito escolar, como relatado por Vieira (2010) é baseado principalmente na busca pelas informações corretas, para uma produtividade de atividades pedagógicas na estratégia de ensino e aprendizagem do aluno. Para Lima *et al.* (2012) o lúdico facilita aprendizagem dos alunos nos conteúdos de genética relatado em seu trabalho qualitativo a avaliação dos alunos do 3º ano do ensino médio numa escola da cidade de Bom Jesus-PI sobre uma atividade realizada com materiais de baixo custo na própria sala de aula.

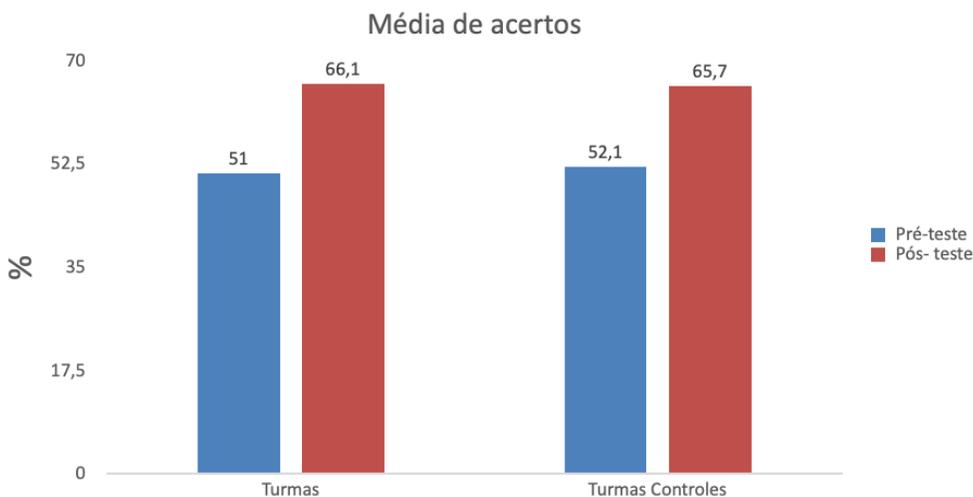


Gráfico 04: Média de acertos (%) entre as turmas que tiveram a prática com o modelo didático e as turmas que tiveram apenas aula teórica

Para a melhor visualização de resultados, quanto o índice de acertos nas questões, foram comparadas os resultados obtidos no pós-teste com as questões similares do pré-teste (Questionários em apêndices). Assegurando-se aos dados amostrais, pode-se dizer que a maioria dos alunos demonstraram uma melhor assimilação de conteúdo para as questões (01, 02, 04, 05, 07, 09 e 10) e uma menor assimilação para as perguntas (03, 06 e 08) do pós-teste (Apêndice C).

Na questão 01 perguntava se é verdade um indivíduo que possui dois alelos “S” tem a doença, esta foi comparada com a primeira questão do pré-teste de baixa complexidade. O nível de acertos da primeira questão sempre considerando os dados amostrais foi de 58,6% no Q1 para 79,6% no Q2. Das turmas pesquisadas, apenas TC2 – tarde não obteve resultado satisfatório para esta questão.

Para as questões 02 e 06 do pós-teste estavam relacionadas a conhecimentos de alelos aplicados a herança genética da doença. Seus resultados foram comparados com as questões 03 e 07 do primeiro questionário. A segunda questão contextualizava dizendo que alelos são aos pares, porque um vem do pai e outro da mãe, a média de acertos foi de 65,3% no pré-teste para 93,3% no pós-teste. Pode-se afirmar que o modelo didático favoreceu essa visualização, quando retirava-se de modo aleatório um alelo de cada caixa representativa, ressaltando que as turmas que realizaram a prática superaram as turmas controles. Quanto a sexta questão os alunos da T1- manhã e da TC2 - tarde mostraram um menor desempenho em relação a sétima questão do pré-teste. No geral, apenas 28,8% julgaram falso sobre os pares de alelos AA serem normais e AA; AS serem doentes para anemia falciforme. Mostra que a maioria dos entrevistados levaram em consideração que o genótipo AS é um indivíduo doente o que não é verdade, pois o indivíduo heterozigoto neste caso apresenta-se normal com capacidade de transmitir a doença.

Das questões que tiveram um menor desempenho no primeiro questionário, a segunda com apenas 28,3% (tabela 02) média de acertos, no segundo questionário na pergunta 09 foi significativo em todas as turmas, passando do dobro 62,7% o índice de acertos em relação ao pré-teste, onde era falso dizer que a geração parental e representada pela letra P e também a todos descendentes deste cruzamento, visto que existe a geração parental (G.P) e as gerações filiais ou geração dos filhos de um determinado cruzamento. Sobre a pergunta que teve o menor desempenho no pré-teste com 21,3% passou para 62,7% acerca de conhecimentos sobre fenótipo na pergunta 05 do pós-teste. A aprendizagem nestas duas questões mostrou significância de resultados após o conteúdo para todas as turmas avaliadas.

Sobre a nona questão que surpreendeu no pré-teste com seu resultado, o avanço de média foi de 72,5% para 74,5%, correspondente a questão 07 do pós-teste, caracterizada pela contextualização de todo o conteúdo nesta pesquisa. Onde resumia o assunto questionando se numa geração de pais heterozigotos poderia nascer filhos normais, doentes e com traços falcêmicos, Uma vez sorteado um alelo de cada caixa, tinha-se o genótipo do filho, de modo que sucessivas vezes saíam filhos com diferentes genótipos e características por vez distintas, isso foi o que chamou atenção da maioria dos alunos na hora de interpretar esta questão.

Com relação a conhecimentos relacionado a mutação, estavam as perguntas 03 e 08. Na pergunta 03 dizia que a alteração de uma única base nitrogenada pode provocar alterações nas características de um organismo. Apresentaram conhecimento sobre

mutação, DNA, genes, passando da média de 60%, porém quando comparada a terceira questão no pré-teste os alunos ficaram abaixo da média. No que correspondia a questão 08 aos tipos de cromossomos na espécie humana (autossomo ou sexual) mostraram um menor entendimento, a média foi de 52,5% no pós-teste, talvez a forma como foi explicado o conteúdo e metodologia de ensino com o modelo didático não favoreceu para estas questões.

Acerca do que estava descrito na questão 04 do pós-teste, os alunos foram de 46,6% na questão mais simples no pré-teste para 59% no segundo questionário, mas somente TC2 – tarde não obteve resultados satisfatórios. Enquanto que a décima questão assumiu papel de avaliar se os alunos estavam entendendo que existem heterozigotos e homozigotos para anemia falciforme, que teve um aumento significativo na média de todos os alunos comparado com a pergunta bem mais contextualizada e confusa para os alunos no pré-teste. A média no segundo questionário foi de 46,6% para 86,4%.

A pesquisa revelou que ao aplicar um modelo didático foi necessário tomar alguns cuidados nesta prática, uma vez que eles atuam como representações esquemáticas do conteúdo conforme Justina *et al.* (2006). Neste caso foi importante observar o conhecimento prévio dos alunos na finalidade de observar se o conteúdo estava de acordo e passíveis de questionamentos. Outro cuidado importante foi acerca do vocabulário científico na realização teórico/prático, principalmente porque o modelo didático é apenas uma analogia representativa do que está sendo estudado e que precisa ser explicado de forma correta para fixação do conteúdo.

As atividades lúdicas servem para aprimorar o ensino-aprendizagem e que podem ser usadas principalmente em assuntos difíceis de assimilar como a genética como já enfatizado por alguns autores. Os resultados mostraram de acordo com as ideias de Oliveira *et al.* (2010) que pode ser possível ensinar genética de maneira dinâmica e contextualizada a partir de temas atuais na escola, utilizando de recursos de fácil acesso, Já que o modelo usado neste trabalho favoreceu o aprendizado dos alunos.

Vários autores da literatura brasileira mostraram resultados positivos quanto avaliação de atividades lúdicas em sala de aula. Querudino *et al.* (2011) em seu trabalho feito com 40 alunos matriculados no ensino médio da cidade São José dos Campos na Paraíba, analisou sobre eficiência de um jogo de cartas no ensino de genética, seus resultados foram de 51,7% no primeiro questionário para 82,3% no segundo questionário. Outro trabalho que também obteve resultados significativos utilizando jogo de cartas foi Neves *et al.* (2014) que mostrou em sua análise 46% para o pré-teste e 63% no pós-teste sobre assunto de ecologia com 35 alunos do ensino médio na cidade Contagem do estado de Minas Gerais.

Durante este trabalho pode-se observar em como os alunos foram participativos durante a prática que complementa a atividade em sala de aula. Consta-se que por meio desta pesquisa uma atividade lúdica feita na própria sala de aula com alunos do 3º ano do ensino médio favoreceu o aprendizado dos alunos, comprovado pela comparação das médias entre os dois questionários.

Como em Lima *et al.* (2012) é importante trabalhar com atividades divertidas e prazerosas em relação abstração de conceitos em genética para facilitar o ensino e aprendizagem de forma significativa alunos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que os alunos conheciam o conteúdo embora com dificuldades para interpretar algumas questões. A estratégia de ensino teoria/prática foi de grande importância para melhorar o aprendizado dos alunos. Reforçando a hipótese de que as atividades lúdicas são eficientes quando aliadas a prévia exposição teórica do assunto. Pois a exposição teórica contextualiza e a atividade prática complementam o conhecimento, fortalecendo a eficácia do processo de ensino.

REFERÊNCIAS

BEIGUELMAN, B. **A interpretação genética da variabilidade humana**. Ribeirão Preto, SP. editora SBG, 2008. 152 p.

BRASIL. Secretaria da Educação Fundamental. **Parâmetros Curriculares Nacionais: Ciências Naturais**. Secretaria de Educação Fundamental. Brasília:MEC/SSEF,1998.

BRASIL. Secretaria da Educação Fundamental. **LDB: lei das diretrizes e bases da educação nacional**. Nº 9.394 de 20 de dezembro de 1996. Brasília, câmara dos deputados, 2006, p. 15.

BRANDÃO, G. O.; FERREIRA, B. M. O ensino de genética no nível médio a importância da contextualização dos experimentos de mendel para o raciocínio sobre os mecanismos da hereditariedade. **Filosofia e História da Biologia**, v. 4, p. 43 – 63, 2009.

CASAGRANDE, G. L.; MAESTRELLI, S. R. P. **A genética humana no livro didático de biologia**. Florianópolis, SC: ABDF, 2006. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

COIMBRA, C. C.; FREITAS, M. L. L. **O ensino de genética no ensino médio**. Brasília, DF: ABDF, 2010. Originalmente apresentado como trabalho de conclusão de curso, Universidade de Brasília, 2010.

GOMES, T. C.; SOARES, C. E. A. **Modelo didático como potencializador do processo do ensino-aprendizagem em biologia molecular**. Patos, PB: ABDF, 2014. Originalmente apresentado como trabalho de conclusão de curso Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

HERMANN, F. B.; ARAUJO, M. C. P. Os jogos didáticos no ensino de genética como estratégias partilhadas nos artigos da revista genética na escola. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE ENSINO DE BIOLOGIA, 6., 2013, Santo Ângelo. **Anais eletrônicos...** Santo Ângelo: EREBIO-SUL, 2013. Disponível em: <<http://santoangelo.uri.br/erebiosul2013/anais/>>

wpcontent/uploads/2013/07/poster/13461_290_Fabiana_Barrichello_Hermann.pdf>. Acesso em: 18. set. 2015

JUSTINA, L. A. D.; RIPPEL, J. L. Ensino de genética: representações da ciência da hereditariedade no nível médio. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISAS E CIÊNCIAS, 4. Bauru, SP. Novembro de 2003. **Anais...** Bauru, 2013 Disponível em: <<http://fep.if.usp.br/~profis/arquivos/ivenpec/Arquivos/Orais/ORAL076.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2015.

JUSTINA, L. A. D.; FERLA, M. R. **A utilização de modelos didáticos no ensino de genética – exemplo de representação de compactação do dna eucarioto.** Arq Mundi, Maringá, v. 10, n. 2, p 35-40, 2006

LIMA, G. J. N. P. et al. Aplicação de jogos didáticos no ensino de genética. In: FORUM INTERNACIONAL DE PEDAGOGIA. 4, 2012, Parnaíba, PI. Disponível em: <http://www.editorarealize.com.br/revistas/fiped/trabalhos/47cafa7e90d06ab5cf75114d5a970dcc_1996.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2015.

MASINI, E. F. S. Aprendizagem significativa: condições para ocorrência e lacunas que levam a comprometimentos. **Revista/Meaningful Learning Review.** v.1(1), p 16-24, 2011. Disponível em: <http://www.if.ufrgs.br/asr/artigos/Artigo_ID2/v1_n1_a2011.pdf>. Acesso em: 15 Ago. 2015.

MOURA, J. *et al.* Biologia/Genética: O ensino de biologia, com enfoque a genética, das escolas públicas no Brasil – breve relato e reflexão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 167-174, jul./dez. 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/13398/13912>>. Acesso em: 28 out. 2015.

NETTO, R. C. M. Dominante ou recessivo?. **Revista Genética na Escola.** São Paulo, v. 07, n. 2, p 28-33, 2012. Disponível em: <<http://www.flipsnack.com/Eveli/revista-genetica-na-escola-volume-7-numero-2-2012.html>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

NEVES, M. L. R. C.; SOARES, N. R. O jogo como estratégia pedagógica na construção de conceitos em ecologia no ensino médio. **Revista de Ensino de Biologia da Associação Brasileira de Ensino de biologia (SBenBio).** Niterói, n. 07, outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.sbenbio.org.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/11/R0474-1.pdf>>. Acesso em 18 nov. 2015.

OLIVEIRA, F. B.; SILVEIRA, R. M. U. O teste de DNA na sala de aula: é possível ensinar biologia a partir de temas atuais?. **Revista Genética na Escola.** São Paulo, v 01. p. 01- 05, 2010. Disponível em: <<http://www.flipsnack.com/Eveli/revista-genetica-na-escola-volume-5-numero-1-2010.html>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

QUERUDINO, A. L. V. G.; MITTMANN, J. Uma proposta lúdica para o ensino de genética e biologia molecular no ensino médio. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.inicep.g.univap.br/cd/INIC_2011/anais/arquivos/RE_0250_0514_01.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2015

REVISTA GENÉTICA NA ESCOLA. Edições da genética na escola, 2006 – 2015. Disponível em: <<http://www.geneticanaescola.com.br/#leicoes-antiores/cudb>>. Acesso em: 18 nov. 2015.

SHULLER, A.K.; DO SANTOS, E. K. **A genética nos livros escolares.** Porto Alegre, RS: 2013, Originalmente apresentado como trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

VIEIRA, V. Construindo saberes: aulas dinâmicas que associam conteúdos de genética à estratégias de ensino-aprendizagem. **Revista Práxis.** Volta Redonda, RJ. ano II, nº 3, p 59-60, janeiro de 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE ABERTA DO PIAUÍ - UAPI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓLO DE BURITI DOS LOPES

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do estudo: Avaliação do Modelo Didático sobre a Herança da Anemia Falciforme no Ensino de Genética

Pesquisador responsável: Franciane de Moura Nunes

Instituição/Departamento: Universidade Federal do Piauí – UFPI

Telefone para contato: (89) 94175621

Local da coleta de dados: _____

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado(a) a responder às perguntas deste questionário de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este questionário, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisador(es) deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decida a participar. Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: Identificar se o uso de um modelo didático no Ensino de Genética facilita o aprendizado dos alunos sobre a herança da anemia falciforme.

Procedimentos. Sua participação nesta pesquisa consistirá apenas no preenchimento deste questionário, respondendo às perguntas formuladas que abordam dados de identificação pessoal (3 questões) dados referentes ao conhecimento de genética adquirido pelos alunos na escola (10 questões).

Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, com benefício direto para você.

Riscos. O preenchimento deste questionário não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você.

Sigilo. As informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____
_____, estou de acordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Parnaíba – PI, ____/____/____.

Assinatura do Participante da Pesquisa ou Responsável Legal

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga

Centro de Convivência L09 e 10 - CEP: 64.049-550 - Teresina – PI, tel.: (86) 3215-5737 - email: cep.ufpi@ufpi.br web: www.ufpi.br/cep

APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CENTRO DE EDUCAÇÃO ABERTA E A DISTÂNCIA – CEAD
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Questionário Diagnóstico /Pré-teste

Assunto: A herança da Anemia Falciforme

Objetivo: identificar o conhecimento prévio dos alunos sobre a herança da anemia falciforme e alguns conceitos fundamentais da genética.

Perfil do Participante:

Idade?

_____anos

Sexo?

() masculino () feminino

Ano do ensino médio que você está?

() 1º ano () 2º ano () 3º ano

Para as questões a seguir, marque (V) para verdadeiro e (F) para falso.

1. (F) A anemia falciforme não é uma doença hereditária.
2. (F) O DNA é onde está toda a informação genética de um ser vivo, porém ele não possui genes.
3. (V) Alelos são formas alternativas de um gene.
4. (V) a doença falciforme é decorrente da mutação no cromossomo 11, do gene que codifica a proteína globina
5. (V) Mutação é a alteração que ocorre na sequências de bases nitrogenadas do DNA, assim ocorre a produção de novos alelos.
6. (F) Geração parental são os organismo que finaliza um experimento de cruzamento genético.
7. (V) A hemoglobina normal da doença falciforme é codificada pelo alelo " A" e a hemoglobina mutante é codificada pelo alelo " S".
8. (F) Os indivíduos homozigoto apresentam alelos" AA" e são normais, o indivíduos homozigotos "SS" que não tem anemia falciforme e os indivíduos que são heterozigóticos "AS" apresentam traços falcêmicos.
9. (V) Existem chances de uma criança, cujo os pais são heterozigoto nascer com a doença.
10. (F) genótipo e fenótipo são características que podem ser observadas em um organismo

APÊNDICE C



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CENTRO DE EDUCAÇÃO ABERTA E A DISTÂNCIA – CEAD
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Questionário Avaliador / Pós -Teste

Tema: A herança da Anemia Falciforme

Objetivo: identificar o conhecimento dos alunos após a aplicação do modelo didático sobre a herança da anemia falciforme e alguns conceitos fundamentais da genética.

Perfil do Participante:

Idade?

_____anos

Sexo?

() masculino () feminino

Ano do ensino médio que você está?

() 1º ano () 2º ano () 3º ano

Para as questões a seguir, marque (V) para verdadeiro e (F) para falso.

1. (V) Quando um indivíduo possui dois alelos S, quer dizer que este indivíduo tem anemia falciforme.
2. (V) alelos são aos pares, pois um vem do pai e o outro vem da mãe
3. (V) A alteração de uma base nitrogenada no DNA podem provocar alterações nas características do organismo
4. (F) Gene é a região do DNA que pode ser transcrita em uma molécula de RNA, mas não codifica uma proteína.
5. (V) Uma mesma característica pode apresentar duas ou mais variedades e cada uma dessas podem ser chamadas de fenótipo.
6. (F) Para a anemia falciforme os indivíduos com alelos AA tem aspecto saudável, com alelos AS e SS são doentes.
7. (V) Numa geração de filhos de pais heterozigotos podem sair filhos doentes, normais e ainda filhos com traços da doença.
8. (V) o cromossomo onde a mutação que caracteriza a anemia falciforme é um cromossomo autossômico.
9. (F) um cruzamento constitui da geração parental representada sempre pela letra P e os seus descendentes também.
10. (V) Na anemia falciforme os homozigotos são (AA e SS) e heterozigotos (AS).

ANEXOS

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE EDUCAÇÃO ABERTA E A DISTÂNCIA – CEAD

Rua Olavo Bilac, 1148 – Centro Sul

CEP 64.001-280 – Teresina PI

Site: www.cead.ufpi.br

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA ACADÊMICO-CIENTÍFICA

Através do presente instrumento, solicitamos do Gestor do _____, autorização para realização da pesquisa integrante do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do acadêmico(a) _____, orientado(a) pelo Prof^o(a) _____, tendo como título preliminar _____.

A coleta de dados será feita através da aplicação de _____, conforme modelo anexo.

A presente atividade é requisito para a conclusão do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Aberta do Brasil (UAB) mantida pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). As informações aqui prestadas não serão divulgadas sem a autorização final da Instituição campo de pesquisa.

Cidade _____ de _____ de _____.

Acadêmico

Prof. Orientador

Deferido ()

Indeferido ()

Assinatura e carimbo do gestor

ANEXO B



BREVE INTRODUCCIÓN A LA FICOFLORA DE CUATRO SITIOS CON LITORAL COSTERO EN EL CARIBE SUR DE COSTA RICA

Data de aceite: 02/05/2024

Ruben Cabrera

Gabinete de Arqueología, Oficina del Historiador de la Ciudad, Habana Vieja, Cuba
<https://orcid.org/0000-0003-0089-1125>

Jhoana Díaz-Larrea

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Hidrobiología Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0003-4290-0835>

Ricardo Cruz-Aviña

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) Tecamachalco, Puebla, México
<https://orcid.org/0000-0002-0905-9370>

Laura G. Núñez García

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Hidrobiología Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-9374-9445>

Gabriela Vázquez Silva

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Departamento El hombre y su ambiente. Calzada del hueso Delegación Coyoacán, Ciudad de México
<https://orcid.org/0000-0001-8250-6029>

RESUMEN: Las algas marinas en los sublitorales del Caribe Sur de Costa Rica son un componente focal, que a pesar de su importancia está muy poco estudiado. En la presente se exponen una breve reseña de los trabajos que sobre este ecosistema se realizan. Se determina que, aunque existe una tendencia que permiten interpretar información, son necesarios aun vincular un mayor número de datos para establecer criterios de manejo.

PALABRAS-CLAVES: algas marinas, mesolitoral rocoso, muestreos.

SHORT COMMUNICATION TO THE FICOFLORA OF FOUR COASTAL SITES OF THE SOUTHERN CARIBBEAN OF COSTA RICA

ABSTRACT: Seaweed in the sublittorals of the Southern Caribbean of Costa Rica are a focal component, which despite its importance is very little studied. Herein is a brief review of the work carried out on this ecosystem. It is determined that although there is a trend that allows information to be interpreted, it is still necessary to link a greater number of data to establish management criteria.

KEYWORDS: marine algae, rocky mesolittoral, sampling.

INTRODUCCIÓN

El intermareal rocoso se presenta como una de las zonas donde más cambios bruscos se producen, debido al movimiento de las mareas (JENSEN & DENNY, 2016). La zona cercana a la línea de bajamar, tiene más horas de cobertura de agua que la zona cercana a la línea de pleamar (**Fig. 1**). Es una región muy atractiva y dinámica, con una fauna y flora particular, que difieren de los organismos marinos y terrestres. Es ecotono, en el cual todos los organismos que lo habitan, lograron adaptarse tanto a procesos físicos y biológicos de los ambientes marinos y terrestres, tales como: desecación durante la bajamar (por exposición al viento y/o sol), cambios bruscos en la temperatura y concentración de sales en agua, tiempos reducidos para alimentación y/o reproducción, exposición al oleaje, por citar algunos.

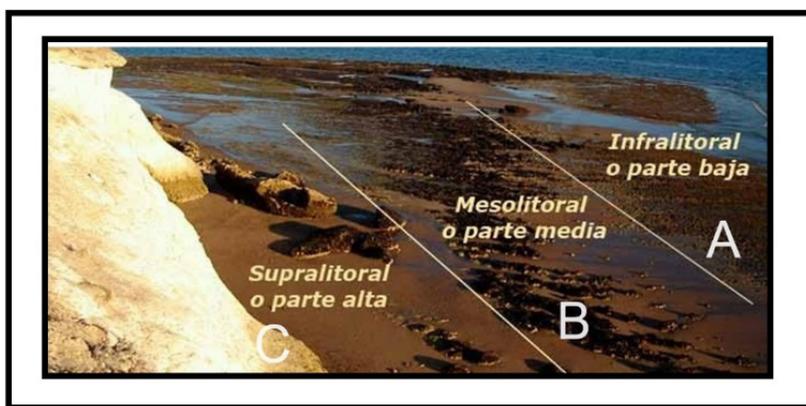


Figura 1. Representación de las diferentes zonas del litoral costero según su exposición a los niveles de marea. **A**, Infralitoral o parte baja. **B**, Mesolitoral o parte media. **C**, Supralitoral o parte alta. **Fuente:** SESSA (2013) modificado.

El Caribe Sur abarca una extensa línea de costa, donde sobresalen ambientes propicios para el asentamiento de la vegetación submarina. Dentro de esta región destaca la provincia de Limón, cuya ficoflora está muy subestimada (CABRERA *et al.*, 2019), a diferencia de la porción más al sur, donde los tramos costeros desde Cahuita hasta Manzanillo no solamente son las áreas más estudiadas sino también las más visitadas por su atractivo comercial.

METODOLOGÍA

En cada sitio se realizaron tres transectos perpendiculares a la línea de la costa separadas a una distancia de 50 a 100 m entre sí, incluyendo la zona supralitoral, intermareal y submareal somero

Para estimar composición específica de macroalgas en cada sitio, se realizaron colectas de macroalgas a lo largo de tres transectos, los que se separadas 100 m entre sí. Para cada transecto, se utilizó como superficie de muestreo un cuadrante de 25x25 cm. Estos fueron ubicados cada 5 m de distancia entre sí a lo largo de todos los transectos. Se tomaron muestras de macroalgas en un área definida de 2 m de radio alrededor de cada cuadrante, considerando distintos microhábitats y profundidades y detectando así el mayor número de especies posibles. Las muestras fueron guardadas en bolsas de plástico con agua de mar y se mantuvieron congeladas para su posterior análisis en laboratorio. Una vez en el laboratorio fueron ubicadas en pliegos de herbario para su catalogación, y se tomaron fragmentos de cada ejemplar y se conservaron en silica gel.

En los mismos sitios donde se ubicaron los cuadrantes se midieron variables abióticas del agua y se caracterizó el tipo de sustrato y microambiente (pozas, tipo de roca, arena). Se registraron otras características categóricas como distancia al mar, profundidad y zonificación (supralitoral, intermareal, o submareal). Las variables ambientales del agua se midieron con un multiparámetro, que incluyó temperatura, salinidad y turbidez.

Para analizar las relaciones entre las variables ambientales medidas en diferentes zonas en el litoral (supralitoral, intermareal y submareal) se realizaron mediante análisis de varianza.

PRINCIPALES AMBIENTES LITORALES. UNA BREVE RESEÑA DE SU COMPOSICIÓN ESPECÍFICA

Litoral de la ciudad capital de la Provincia Limón

El límite del infralitoral termina de forma abrupta, y es seguido de un talud de profundidad apreciable en algunas porciones de la franja litoral, presenta fuertes corrientes aun en la bajamar. Las especies componentes son fundamentalmente algas rojas de los géneros: *Gracilaria*, *Hypnea*, *Spyridia* y *Centroceras* (**Fig. 2**).

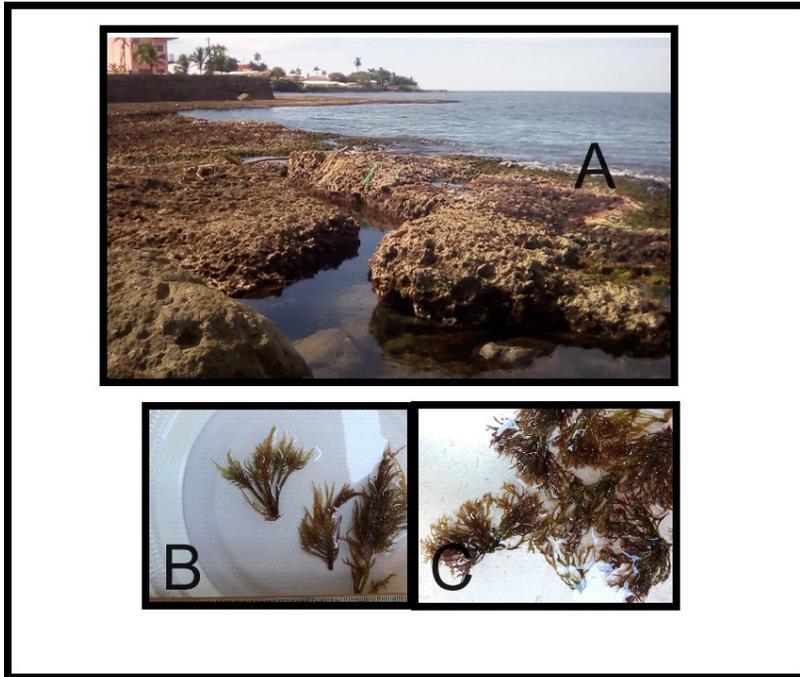


Figura 2. Mesolitoral de Limón. **A,** vista panorámica de baja mar. **B,** *Grateloupia* cf. *filicina*. **C,** *Gracilaria* spp. **Fuente:** fotografías CABRERA, R.

Litoral del poblado de Puerto Viejo

El intermareal es muy atenuado en cuanto a su pendiente, y en algunas partes se presentan pozas de marea o rocas aisladas, las que son colonizadas por rodófitas diminutas a manera de césped, donde el orden ceramiales alberga la mayor cantidad de entidades taxonómicas. En general, predominan algas verdes de los géneros: *Ulva*, *Bryopsis*, *Caulerpa* y *Anadyomene* en zona rocosa que, están por lo general solo visibles en bajamar (**Fig. 3**). Las pertenecientes a los órdenes Gelidiales y Dictyotales están muy presentes, junto a *Gracilaria* sobre todo en la región limítrofe del infralitoral.



Figura 3. Mesolitoral de Puerto Viejo. **A,** vista panorámica de baja mar. **B,** presencia de *Anadyomene stellata* (Wulfen) C. Agardh. (1) montículos monoespecíficos de la especie. **C,** *Bryopsis* spp., *Caulerpa* cf. *sertularioides*, y *Caulerpa fastigiata* Montagne. (2) montículos multispecíficos de las entidades colectadas. **Fuente:** fotografías CABRERA, R.

Litoral de Playa Punta Uva

Presentes en áreas poco accesibles por los bañistas, las zonas con mesolitoral son escarpadas y dificultan el asentamiento de ejemplares masivos, las mayores formaciones se ubican en los extremos de la playa, donde se entremezclan con los paisajes de montaña haciendo una combinación selva playa, principal atractivo de la región. Predominan varias especies de *Sargassum*, y varios miembros del orden Caulerpales. Varias especies de algas rojas adaptadas a las condiciones de desecación extrema colonizan intervalos por encima del límite de marea (**Fig. 4**).

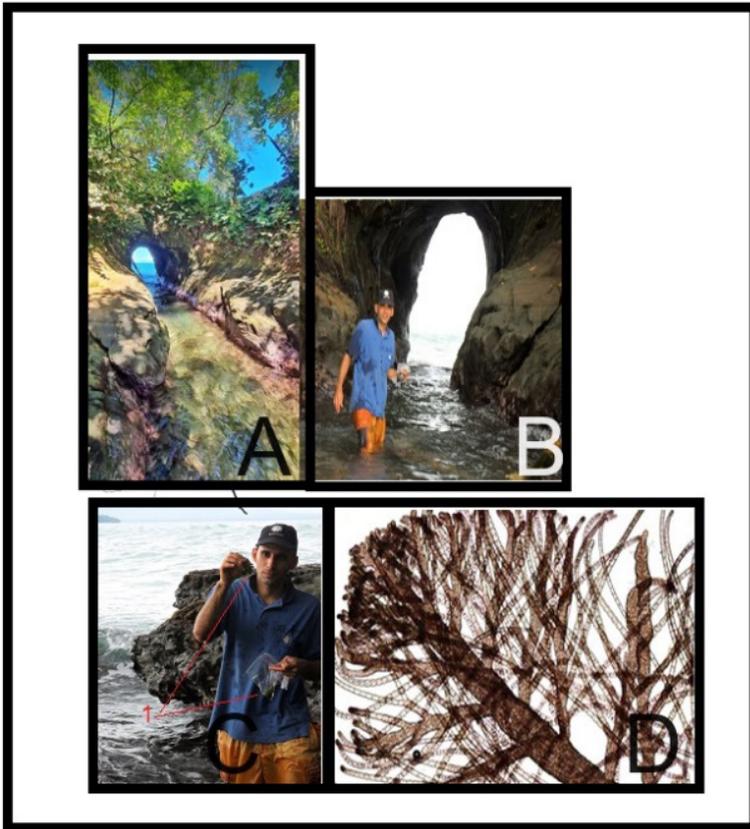


Figura 4. Mesolitoral de cueva de Punta Uva. **A**, vista panorámica de baja mar. **B**, vista panorámica de alta mar, proceso de colecta algas. **C**, (1) muestras de *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh. **D**, acercamiento de un espécimen de *Bostrychia* cf. *tenella*, colectado en la zona de salpicadura. **Fuente:** fotografías CABRERA, R.

Litoral de Playa Manzanillo

Es el más extenso, y el más diverso en cuanto a especies componentes, con un talud atenuado o abrupto en ciertas zonas del *continuum*, destaca por su exuberancia y aguas turquesa (**Fig. 5**). Existe el predominio de las algas pardas, lo que denota por un lado el grado de conservación, y por otro, corrobora su dominancia en este tipo de ecosistemas con aguas muy cristalinas (TEAGLE *et al.* 2017). Aunque, también se han encontrado especies del orden Ulvales (CABRERA *et al.*, 2020), corresponde al género *Codium*, junto a varias entidades de *Cladophora* tapizar áreas significativas de mesolitoral.

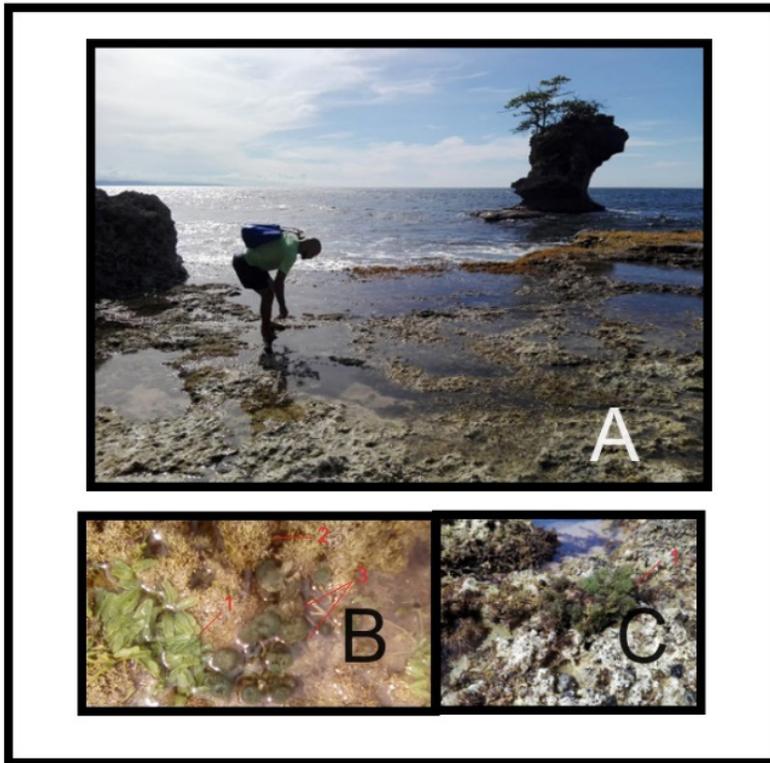


Figura 5. Mesolitoral de Playa Manzanillo. **A**, vista panorámica de baja mar. **B**, especímenes en el límite superior infralitoral: (1), *Caulerpa sertularioides* (SGGmelin) M. Howe (2), *Jania* sp. (3), *Penicillus capitatus* Lamarck. **C**, (1) *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux. **Fuente:** fotografías CABRERA, R.

PARÁMETROS ABIÓTICOS GENERALES DE LOS CUATRO SITIOS DE MUESTREO

De la totalidad de parámetros abióticos determinados para el agua, la mayor variabilidad corresponde en todos los casos, al área mesolitoral (**Fig. 6**), y si bien, se observaron algunas tendencias, como el incremento de la salinidad desde el supralitoral hacia el infralitoral, no se observaron diferencias significativas. Ello permite definir a las zonas del infra y mesolitoral, como las regiones más propicias para el establecimiento exitoso de las algas marinas, lo que es coherente con las generalidades del intermareal (ARECES, 2001). Relegando a la zona de salpicadura, ubicada detrás del supralitoral aquellos géneros que más soportan la desecación como *Bostrychia* (HUNT & DENNY, 2008).

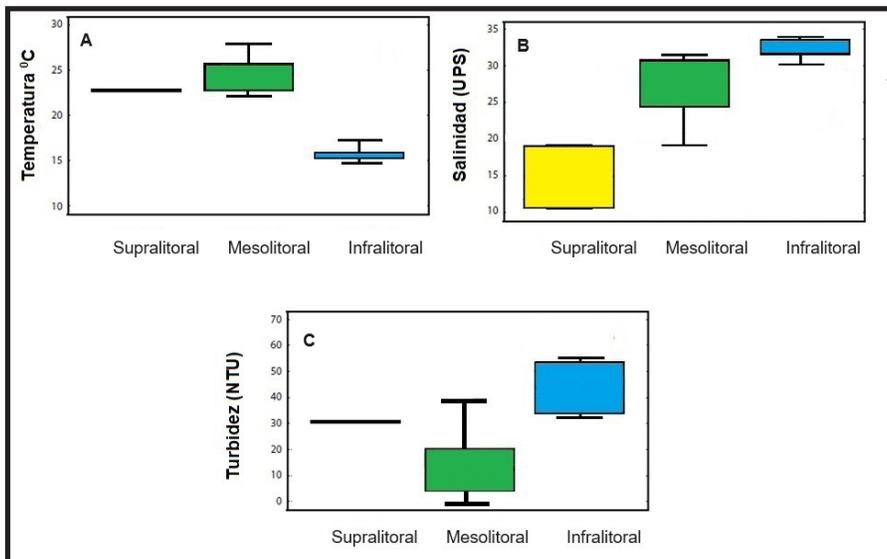


Figura 6. Diagrama general de las variables ambientales promediadas en los cuatro sitios. **A**, temperatura superficial del agua [Media =25.2; $p=0.24$. Varianza = 2.11; $p=0.15$]. **B**, salinidad [Media =13.05; $p=0.31$. Varianza =0.83; $p=0.75$]. **C**, turbidez [Media =0.56; $p=0.19$. Varianza = 0.81; $p=0,15$]. [°C= Grado Celsius, UPS= Unidades Prácticas de Salinidad, NTU= *Nephelometric Turbidity Unit*].
Fuente: CABRERA, R. (datos inéditos).

REFERENCIAS

ARECES, J. (2001). La ficoflora intermareal como bioindicadora de calidad ambiental. Estudio de caso: El litoral habanero (pp: 569-589). En: Sustentabilidad de la biodiversidad. Un problema actual, bases científico-técnicas, teorizaciones y perspectivas. (K. Alveal & T. Antezana, Eds.). Universidad de Concepción, Chile.

CABRERA, R., DÍAZ-LARREA, J., UMANZOR, S. (2019). New Records of Marine Macroalgae on the Caribbean on Coast of Costa Rica. *American Journal of Plant Sciences*, 10: 1708-1728.

CABRERA, R., DÍAZ-LARREA, J., ALFONSO, Y., NÚÑEZ-GARCIA L. G. (2020). New records of green algae (Chlorophyta) for the Caribbean coast of Costa Rica. *Merit Research Journal of Microbiology and Biological Sciences* 8: 001–009.

HUNT, L. J. H., DENNY, M. W. (2008). Desiccation protection and disruption: a trade-off for an intertidal marine alga. *J. Phycol.*, 44:1164–70.

JENSEN, M.M., DENNY, M.W. (2016). Life in an extreme environment: Characterizing wave-imposed forces in the rocky intertidal zone using high temporal resolution hydrodynamic measurements. *Limnol. Oceanogr.*, 61: 1750-1761.

SESSA, G. S. (2013). El ambiente intermareal y sus especies: cuadernillo para el aula. (G. S. SESSA, V. E. ESTANISLAO & M. S. MARTÍNEZ- GODOY, Eds.). 1a ed. Puerto Madryn, Patagonia Natural, Argentina.

TEAGLE, H., HAWKINS, S. J., MOORE, P. J., SMALE, D. A. (2017). The role of kelp species as biogenic habitat formers in coastal marine ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 492: 81–98.

PLANTAS MEDICINAIS: CONHECIMENTO ETNOBOTÂNICO DA COMUNIDADE BARREIROS, SALITRE-CE

Data de submissão: 24/04/2024

Data de aceite: 02/05/2024

Silvia Maria Batista

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Campos Sales, CE

Janete de Souza Bezerra

Universidade Estadual do Ceará – UECE,
Fortaleza – CE
<http://lattes.cnpq.br/4507177282414507>

Francisca Neciana Leite Cavalcante

Ivy Enber Christian University, Pompano
Beach, EUA
<https://lattes.cnpq.br/9529262074136198>

Maria Aparecida Barbosa Ferreira Gonçalo

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/5782987886301211>

Josefa Joélia Bernardo dos Santos

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Missão Velha, CE
<https://lattes.cnpq.br/9498056987827097>

Ademar Maia Filho

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/9570480278376163>

Maria Eliana Vieira Figueroa

Secretaria do Estado do Pernambuco, PE
<http://lattes.cnpq.br/9551086188725906>

Jailson Renato de Lima Silva

Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE, Recife, PE
<http://lattes.cnpq.br/5240688155251174>

Amanda Maria Tavares Moreira

Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE, Recife, PE
<http://lattes.cnpq.br/2371233987733428>

Damiana Gonçalves de Sousa Freitas

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Missão Velha, CE
<http://lattes.cnpq.br/2293832368179669>

José Weverton Almeida-Bezerra

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Química Biológica,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/5570296179611652>

Rafael Pereira da Cruz

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/3675589918865790>

RESUMO: A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de práticas medicinais da humanidade. Um conhecimento milenar cultural que passa de geração em geração, percebendo-se a importância da sabedoria popular a respeito das plantas medicinais e as tradições do uso de fitoterápicos. O objetivo geral dessa pesquisa foi investigar o conhecimento e o uso de plantas medicinais pelos moradores da comunidade Barreiros, município de Salitre, localizado no estado do Ceará, Brasil. O referido estudo se enquadra em uma abordagem qualitativa, por abordar, investigar e analisar os tipos de plantas medicinais utilizadas pela comunidade. O estudo foi realizado no período de junho a julho de 2023. Foram realizadas 20 entrevistas com moradores. No total foram registradas 90 citações de cerca de 27 espécies diferentes, pertencentes a 18 famílias botânicas utilizadas como recursos fitoterápicos. Destas, as famílias que apresentaram maior número de citações de espécies foram Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae, Astenaceae e Moraceae. A espécie mais citada pelos entrevistados foi a *Mentha spicata* “hortelã” (Linnaeus, 1753), pertencente à família das Lamiaceae. As partes das plantas mais utilizadas pelos entrevistados foram as folhas, sendo o chá como a forma de preparo mais consumido, em seguida foram citadas as sementes e frutos. A análise dos dados revela conclusões significativas: observa-se que o uso de plantas medicinais é uma prática amplamente difundida entre os habitantes da comunidade dos Barreiros. No entanto, é importante ressaltar que a falta de orientação adequada tem sido identificada como um desafio, levando a práticas incorretas relacionadas ao preparo, dosagem e continuidade no uso de plantas medicinais, o que merece atenção para promover uma utilização mais segura e eficaz desses recursos medicinais.

PALAVRAS-CHAVE: Sabedoria popular, Fitoterápicos, Remédio caseiro, *Mentha spicata*.

MEDICINAL PLANTS: ETHNOBOTANICAL KNOWLEDGE OF THE BARREIROS COMMUNITY, SALITRE-CE

ABSTRACT: The use of plants for medicinal purposes for the treatment, cure, and prevention of diseases is one of humanity's oldest forms of medical practice. It's an ancient cultural knowledge passed down from generation to generation, recognizing the importance of folk wisdom regarding medicinal plants and the traditions of herbal medicine. The general aim of this research was to investigate the knowledge and use of medicinal plants by residents of the Barreiros community, located in the municipality of Salitre, in the state of Ceará, Brazil. This study falls within a qualitative approach, as it addresses, investigates, and analyzes the types of medicinal plants used by the community. The study was conducted from June to July 2023. A total of 90 citations of around 27 different species, belonging to 18 botanical families used as phytotherapeutic resources, were recorded. Among these, the families with the highest number of species citations were Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Astenaceae, and Moraceae. The most cited species by the interviewees was *Mentha spicata* “spearmint”(Linnaeus, 1753), belonging to the Lamiaceae family. The plant parts most used by the interviewees were the leaves, with tea being the most consumed preparation method, followed by seeds and fruits. The data analysis reveals significant conclusions: it is observed that the use of medicinal plants is a widely practiced activity among the inhabitants of the Barreiros community. However, it is important to note that the lack of proper guidance has been identified as a challenge, leading to incorrect practices related to the preparation, dosage, and continuity in the use of medicinal

plants, which deserves attention to promote a safer and more effective utilization of these medicinal resources.

KEYWORDS: Popular knowledge, Phytotherapeutics, Homemade medicine, *Mentha spicata*.

INTRODUÇÃO

Existe no mundo aproximadamente 250 mil espécies botânicas, o Brasil abriga cerca de 20% da biodiversidade vegetal do planeta e possui uma rica flora e uma miscigenação de práticas de uso desta, por influência de diferentes culturas (Reifschneider et al., 2015; Calvacante, 2019). O uso de plantas com propriedades medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças remonta a uma das mais antigas formas de prática médica da humanidade. Estas propriedades medicinais são amplamente utilizadas e tradicionalmente transmitidas de geração em geração, refletindo a história dos povos através da prática da medicina popular (Perinazzo, 2022).

Desta forma, usuários de plantas de medicinais de todo o mundo mantêm a tradição em prática, tornando válidas algumas informações terapêuticas que foram acumulados durante séculos (Newall et al., 2002). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que em pleno século XXI, aproximadamente 80% da população mundial usa algum tipo de erva na busca de alívio de sintomas desagradáveis ou que causem dor, e desse total pelo menos 30% dão-se por indicação médica (Martins et al., 2000).

Com isso o uso de plantas medicinais é um dos principais recursos utilizados por moradores de comunidade rurais, pois os remédios naturais ainda são muito utilizados para o tratamento de doenças. Porém, é preocupante o uso indiscriminado que muitas pessoas fazem dessas plantas muitas vezes sem saber do alto risco que essas ervas podem apresentar, como por exemplo elevada toxicidade, podendo levar à morte (Nascimento, 2020).

Deste modo, saber utilizar e conservar cada tipo de planta medicinal é fundamental para garantir que o remédio caseiro funcione e não cause efeito adverso. De acordo com Oliveira et al. (2015) o aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto e um grande cuidado, ou seja, as plantas medicinais são utilizadas a fim de curar e aliviar diversos problemas de saúde, porém algumas podem provocar reações desagradáveis, dessa forma se faz necessário observar cada parte da planta, para então utilizá-las de maneira correta e segura.

As plantas medicinais são usadas há muito tempo e são conhecidas por terem um papel importante tanto para o conhecimento popular quanto para o conhecimento científico, que buscam realizar pesquisas que comprovem e tragam melhorias e segurança na eficácia dessas ervas medicinais sem menosprezar o senso comum, pois o uso de plantas medicinais está presente em diversas culturas. A utilização de plantas medicinais contribui para construção de saberes ambientais e territoriais que carregam conhecimentos de ancestralidade como através da convivência das matrizes étnicas, indígenas, africanas e europeias que compõem as bases do povo Brasileiro (Araújo, 2016).

Nota-se que em uma comunidade do município de Salitre, Ceará, chamada de Barreiros possui uma grande diversidade plantas com fins medicinais, com isso essa pesquisa surgiu da ideia de fazer um levantamento das plantas etnomedicinais utilizadas pela população que residem nessa comunidade. Diante disso, o objetivo geral dessa pesquisa foi investigar o conhecimento e as práticas no uso de plantas medicinais pelos moradores da comunidade Barreiros, município de Salitre-CE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

O referido estudo se enquadra em uma abordagem qualitativa, por abordar, investigar e analisar os tipos de plantas medicinais utilizadas pela comunidade. Assim como, quantitativa, uma vez que é quantificado as espécies de uso. Segundo Duarte (2002, p.141) para a realização da pesquisa quantitativa é necessário [...]:

De um modo geral, pesquisas de cunho qualitativo exigem a realização de entrevistas, quase sempre longas e semiestruturadas. Nesses casos, a definição de critérios segundo os quais serão selecionados os sujeitos que vão compor o universo de investigação é algo primordial, pois interfere diretamente na qualidade das informações a partir das quais será possível construir a análise e chegar à compreensão mais ampla do problema delimitado.

A pesquisa se dá por meio de questionário e outros tipos de coletas de dados enquadrando se como um estudo descritivo. Gil (2008, p.131) conceitua pesquisa descritiva como:

As pesquisas descritivas têm como objetivo primordial à descrição das características de determinada população ou fenômeno ou, então, o estabelecimento de relações entre variáveis. Serão inúmeros os estudos que podem ser classificados sob este título e uma de suas características mais significativas estão na utilização de técnicas padronizadas de coleta de dados, tais como o questionário e a observação sistemática.

Lócus do Estudo e Período de Coleta de Dados

A referida pesquisa foi realizada no município de Salitre, localizado no estado do Ceará, Brasil. O município se estende por 804,4 quilômetros quadrados e tem aproximadamente 16.554 habitantes, de acordo com o censo do IBGE (2022). O determinado estudo foi realizado em uma comunidade rural situada no município de Salitre-CE chamada de Barreiros, no período de junho a julho de 2023.

Universo da pesquisa

Esta pesquisa buscou fazer um levantamento etnobotânico com as pessoas que moram na comunidade dos Barreiros do município de Salitre-CE, em torno do conhecimento sobre plantas medicinais suas práticas e saberes. Participaram da pesquisa um total de 20 moradores da comunidade Barreiros, sendo que todos residem atualmente na localidade, são maiores de 18 anos e possuem conhecimentos acerca de plantas medicinais.

Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

A forma de recrutamento dos participantes se deu por meio de amostragem não probabilística: amostra por bola de neve (*snowball sampling*). Segundo Bockorni (2021, p. 107) “A amostragem em *snowball* ou bola de neve pode ser definida como um tipo de amostragem não probabilística, em que se utilizam cadeias de referência, além disso, é útil em pesquisas com grupos de difícil acesso.”

Essa pesquisa buscou pessoas detentoras do conhecimento relacionado a plantas medicinais, nesse caso alguns moradores da comunidade. Depois de repassadas todas as informações sobre os aspectos éticos, as entrevistas semiestruturadas foram realizadas com os moradores. A amostragem foi finalizada quando as indicações de novo participantes começaram a ficar repetitivas.

Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa

A pesquisa atendeu as exigências éticas e científicas fundamentadas na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2012). Os participantes foram esclarecidos sobre os riscos, benefícios e objetivos da pesquisa a partir do fornecimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido –TCLE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 20 entrevistas com moradores que residem na comunidade dos Barreiros, no município de Salitre, Ceará. Dos entrevistados, 07 foram homens (35%) e 13 foram mulheres (65%). Destes, 15% tinham idade entre 30 a 40 anos, 25% entre 41 a 50, 20% entre 51 a 60, 30% entre 61 a 70 e 10% com idades entre 71 a 80 anos.

A maioria dos entrevistados são do sexo feminino detentoras de conhecimento sobre a prática estudada, evidenciando assim a relação da mulher dentro do seio familiar com a saúde, fato que ocorre pelo fato da maioria das mulheres de regiões interioranas permanecerem em casa cuidando dos afazeres domésticos, conforme citado por Neto e Gomes (2018).

O maior número de informações e conhecimentos sobre as plantas medicinais concentrou-se na faixa etária de 61 a 70 anos (30%), sofrendo uma queda nas faixas anteriores e elevado nas posteriores. O maior número nesta faixa etária se justifica, em geral por pessoas que possuem principalmente os conhecimentos populares herdados de seus ancestrais (Oliveira; Lucena, 2015). De acordo com as entrevistas, os indivíduos nesta faixa etária possuem um conhecimento mais abrangente e vivenciado com os remédios caseiros, enquanto os mais jovens têm vivência com recursos industrializados.

Com relação ao nível de escolaridade, 30% dos entrevistados afirmaram não ter frequentado a escola, seguido por ensino fundamental incompleto (55%), ensino médio completo (5%) e ensino superior incompleto (5%) e finalmente com ensino superior completo (5%). Do ponto de vista social, é de conhecimento geral que as classes de menor renda da população brasileira possuem conhecimentos gerais básicos da medicina natural, sendo está de baixa escolaridade (Cruz et al., 2017).

No total foram registradas 90 citações de cerca de 27 espécies diferentes, pertencentes a 18 famílias botânicas conforme descrito na Tabela 1, utilizadas como recursos terapêuticos, com base no nome popular citados pelos membros da comunidade. Esses servem de remédios ou são matéria-prima para produtos com fins medicinais.

FAMÍLIAS	NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	PARTE UTILIZADA	FORMA DE USO	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA
Amaranthaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Mastruz	Folha	Chá	Inflamação
Anacardiaceae	<i>Spondias purpúrea</i>	Seriguela	Folha	Chá	Câncer
Apiaceae	<i>Pimpinella anisum</i>	erva-doce	Folha	Chá	Gases e náuseas;
Asphodelaceae	<i>Aloe vera</i>	Babosa	Folha/casca	Chá	Cicatrização
Asteraceae	<i>Achyrocline albicans</i>	Macela	Semente	Chá	Intestino
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	Folha	Chá	Calmante
Crassulaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Malva coirama	Folha	Chá	Útero
Fabaceae	<i>Amburana cearenses</i>	Amburana	Casca	Chá	Gripe
Fabaceae	<i>Bauhinia unguolata</i>	Mororó	Folha	Chá	Problemas digestivos, asma e tosse
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i>	erva-cidreira	Folha	Chá	Calmante
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i>	Hortelã	Folha	Chá	Dor
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Folha	Chá	Resfriado
Lamiaceae	<i>Plectranthus barbatus</i>	Boldo	Folha	Chá	Intestino
Lamiaceae	<i>Plectranthus amboinicus</i>	malva-do-reino	Folha	Chá	Inflamação e gripe
Lythraceae	<i>Punica granatum</i>	Romã	Casca	Chá	Gripe

Malvaceae	<i>Gossypium barbadense</i>	Algodão	Semente	Chá	Gripe
Moraceae	<i>Morus alba</i>	Amora	Folha	Chá	Menopausa
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Folha	Chá	Resfriado e febre
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	Folha	Chá	Problemas intestinais
Myrtaceae	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo	Semente	Chá	Cicatrização e inflamação
Olacaceae	<i>Ximenia americana</i>	Ameixa	Casca	Chá	Cicatrização
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i>	capim santo	Folha	Chá	Hipertensão
Poaceae	<i>Saccharum officinarum</i>	cana de açúcar	Folha	Chá	Tosse
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Folha	Chá	Nervosismo, irritabilidade e Hipertensão
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja	Folha/casca	Chá	Náusea
Rutaceae	<i>Citrus limon</i>	Limão	Folha/fruto	Chá	Gripe
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Açafrão	Raiz	Chá	Colesterol e dor de cabeça

Tabela 1 - Lista das espécies com aplicações terapêuticas utilizadas na comunidade Barreiros-Salitre, CE

Fonte: Autora (2023)

Destas, as famílias que apresentaram maior número de citações de espécies foram Lamiaceae (5), Myrtaceae (3) e Rutaceae, Astenaceae e Moraceae (2 cada). Nos estudos etnobotânicos e/ou etnofarmacológicos a representação dessas famílias é bastante frequente como pode ser observado nos trabalhos de Souza (2016) em Jataí-GO, Flor e Barbosa (2015) em Marudá-PA, Oliveira e Lucena (2015) em Quixadá-CE e Pereira e colaboradores (2015) em Picos-PI.

Dados na literatura indicam que Lamiaceae é uma família cosmopolita que se apresenta em forma de ervas e arbustos, o que facilita sua dispersão e adaptação em diversos ambientes, essa família vegetal apresenta uma característica marcante que é seu aroma, o qual agrega importância econômica. Dessa forma, a utilização de espécies da família Lamiaceae se torna relevante, seja na medicina popular ou na rede de cosméticos, principalmente devido a presença de compostos voláteis (óleos essenciais), justificando esta representatividade (Oliveira, Lucena 2015).

A espécie mais citada pelos entrevistados foi a *Mentha spicata* “hortelã” (Lamiaceae) com 11 citações, seguida pela *Kalanchoe pinnata* “malva coirama” (Crassulaceae), *Cymbopogon citratus* “capim santo” (Poaceae) e *Melissa officinalis* “ervacidreira” (Lamiaceae) com 08 citações, *Rosmarinus officinalis* “alecrim” (Lamiaceae) e *Plectranthus barbatus* “boldo” (Lamiaceae) citados 05 cinco vezes, com 04 citações a *Ruta graveolens* “arruda” (Rutaceae), *Eucalyptus globulus* “eucalipto” (Myrtaceae), *Achyrocline albicans* “macela” (Asteraceae) e *Citrus sinensis* “laranjeira” (Rutaceae), com 03 citações

Gossypium barbadense “algodão” (Malvaceae), *Plectranthus amboinicus* “malva-do-reino” (Lamiaceae), citada 02 vezes a *Psidium guajava* “goiabeira” (Myrtaceae), *Chenopodium ambrosioides* “mastruz” (Amaranthaceae), *Morus alba* “amora” (Moraceae), *Amburana cearensis* “amburana” (Fabaceae), *Saccharum officinarum* “cana-de-açúcar” (Poaceae) e *Ximenia americana* “ameixa” (Olacaceae), *Punica granatum* “romã” (Punicaceae), *Matricaria recutita* “camomila” (Asteraceae), *Aloe vera* “babosa” (Xanthorrhoeaceae), *Eugenia caryophyllata* “cravo” (Myrtaceae), *Spondias purpúrea* “seriguela” (Anacardiaceae), *Bauhinia unguolata* “mororó” (Fabaceae), *Citrus limon* “limão” (Rutaceae), *Curcuma longa* “açafrão” (Zingiberaceae) e *Pimpinella anisum* “erva-doce” (Apiaceae).

É importante ressaltar que a espécie mais citada nesse estudo *Mentha spicata* (hortelã), de acordo com dados na literatura, apresenta importantes compostos com atividades biológicas e farmacológicas, como por exemplo, a carvona e o ácido rosmarínico. Estes compostos têm sido reconhecidos por suas propriedades terapêuticas, como ação antioxidante e atividades imunossupressoras, tornando *Mentha spicata* (hortelã) uma fonte valiosa de compostos bioativos (Almeida et al., 2018; Carvalho et al., 2019).

As partes das plantas mais utilizadas pelos entrevistados foram as folhas, sendo o chá como a forma de preparo mais consumido, em seguida foram citadas as sementes e frutos. Isso pode ser justificado pelo fato de as folhas serem mais acessíveis, sendo facilmente coletadas, além disso possuem muitos grupos de metabolitos secundários. Dessa maneira, a utilização das folhas ao invés do caule ou raízes das plantas, é a opção mais viável de aproveitamento de recursos naturais garantindo assim a sua conservação conforme destacada por Carvalho (2019). Assim, a utilização das folhas como medicamento constitui uma prática sustentável na exploração de recursos naturais, pois implica na preservação das plantas para usos futuros, sem prejudicar seu crescimento e capacidade de reprodução (Oliveira, Lucena 2015).

É fundamental levar em consideração o método apropriado de preparação de plantas medicinais devido a existência de óleos essenciais voláteis presentes nas folhas e em outros órgãos das plantas, segundo Batista et al., (2019). Em relação ao uso dos chás, diante da pesquisa destaca-se que a maioria das pessoas da comunidade afirmaram fazer a utilização de chás casualmente. Conforme Sousa (2016), em trabalho realizado no município de Antonina do Norte, CE, ressalta que as partes vegetais na produção de chás como forma medicinal, possuem compostos químicos sendo esses, glicídios, flavonoides, naftoquinônicos e alcaloides, entre outros, porém estes quando não são utilizados da forma correta podem causar efeito colateral, tóxicos no organismo dos indivíduos.

As doenças comumente tratadas com as plantas medicinais citadas pelos entrevistados são, hipertensão, tosse, ansiedade, problemas no útero, diarreia, menopausa, dor de cabeça, gripe forte, dor de barriga, processo de cicatrização, dor de garganta e inflamações. Doenças também presentes nos trabalhos de Oliveira e Lucena (2015) em Quixadá-CE, Souza (2016) em Goiás, Szerwieski (2017) no Paraná.

A análise aponta para uma situação em que uma parcela considerável de pessoas (100% dos entrevistados) ainda mantém a prática de cultivar plantas medicinais em suas próprias residências. Esse dado sugere que, predominantemente, essas pessoas residem em locais que lhes permitem dispor de espaço para o cultivo das plantas medicinais que frequentemente consomem. Os resultados encontrados se alinham com as pesquisas de Ferreira et al., (2017); Pires et al., (2016), onde os dados revelam que a maioria (aproximadamente 55%) opta por cultivar essas plantas em seu próprio quintal. Essa preferência por manter um lugar pessoal de plantas medicinais é um fator determinante que incentiva o consumo regular e prolongado dessas ervas na forma de chá ou outras preparações medicinais. Essa prática de cultivo caseiro contribui para a disponibilidade constante das plantas, o que, por sua vez, promove o uso contínuo e sustentado ao longo do tempo e das gerações (Veloso et al., 2023).

Quando indagados sobre a fonte do conhecimento acerca das plantas medicinais e suas respectivas técnicas de preparo, a maioria expressiva respondeu que esse aprendizado é uma tradição transmitida de geração em geração, indicando uma valorização da sabedoria ancestral (Pires et al., 2016; Veloso et al., 2023). No que diz respeito à escolha entre plantas medicinais e medicamentos farmacêuticos, observou-se que 25% dos participantes manifestaram preferência pelo uso de remédios produzidos pela indústria farmacêutica, enquanto 75% tem preferência pelo uso de remédios naturais. Além disso, 5% mencionaram que adotam uma abordagem combinada, fazendo uso tanto de plantas medicinais quanto de medicamentos farmacêuticos em seus tratamentos, sinalizando uma diversidade de estratégias de cuidados com a saúde entre os entrevistados, dados similares ao encontrados por Oliveira e Lucena (2015).

CONCLUSÕES

A análise dos dados revela conclusões significativas: em primeiro lugar, observa-se que o uso de plantas medicinais é uma prática amplamente difundida entre os habitantes da comunidade dos Barreiros, localizada em Salitre, Ceará, denotando sua relevância na região. Além disso, chama a atenção o fato de que as mulheres são a maioria entre os consumidores dos preparos caseiros, sinalizando uma possível especificidade de gênero nesse contexto.

Outro ponto notável é a finalidade predominante do uso de chás, que se destaca como um meio frequentemente empregado para tratar doenças, sendo a espécie *Mentha spicata* (hortelã) utilizada para o tratamento de gripe, *Kalanchoe pinnata* (malva coraima) enfermidades relacionadas a problemas uterinos, a *Melissa officinalis* (erva cidreira) indicada como calmante e o capim santo no tratamento de hipertensão.

No entanto, é importante ressaltar que a falta de instrução adequada tem sido identificada como um desafio, levando a práticas incorretas relacionadas ao preparo, dosagem e continuidade no uso de plantas medicinais, o que merece atenção e consideração para promover uma utilização mais segura e eficaz desses recursos medicinais.

REFERENCIAS

ALMEIDA, A. P. G. et al. Óleos essenciais e Eugenol como anestésico para *Serrasalmus rhombeus*. **Boletim Do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 1, p. 44-50, 2018.

ARAÚJO, B. D. X. **Raízes da cura: os saberes e as experiências dos usos de plantas medicinais pelas Meizinheiras do Cariri cearense**. 2016.

BATISTA, L. A. et al. Levantamento de plantas medicinais utilizadas contra parasitoses e verminoses intestinais no município de Atalaia do Norte-AM. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 9, n. 2, p. 35-39, 2019.

BOCKORNI, B. R. S.; GOMES, A. F. A amostragem em snowball (bola de neve) em uma pesquisa qualitativa no campo da administração. **Revista de Ciências Empresariais da UNIPAR**, v. 22, n. 1, 2021.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2012.

CARVALHO, C. R. S. et al. **Potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos dos chás de hortelã (*Mentha picata*), camomila (*Matricaria chamomilla*) e capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*)**. 2019.

CARVALHO, C. S. et al. **Levantamento etnobotânico na comunidade rural de Santa Marta, Corrente-PI**. 2019.

CAVALCANTE, R. **As Plantas Na Odontologia**. Clube de Autores, 2019.

CRUZ, V. M. et al. Aspectos socioeconômicos e o cultivo de plantas medicinais em quintais agroflorestais urbanos (QAF) no município de Breu Branco, Pará, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017.

DUARTE, R. Pesquisa qualitativa: reflexões sobre o trabalho de campo. **Cadernos de pesquisa**, p. 139-154, 2002.

FERREIRA, L. B. et al. **Etnobotânica das plantas medicinais cultivadas nos quintais do bairro de Algodal em Abaetetuba/PA**. 2017.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá-PA. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, p. 757-768, 2015.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4 ed. São Paulo: Atlas, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Cidades e estados. 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ce/salitre.html>> Acesso: 15 de Dez. de 2023.

MARTINS, E. R., et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 220p.

NASCIMENTO, T. S. **Estudo etnobotânico na Fazenda Extrema e na Comunidade Val da Boa Esperança, Barreiras-BA**. 2020.

NETO, L. A. G.; GOMES, F. T. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população do município de Oliveira Fortes-MG. **Biológicas & Saúde**, v. 8, n. 27, 2018.

NEWALL, C. A et al. **Plantas Medicinas: Guia para profissional de saúde**. Ed. Premier, 2002.

OLIVEIRA, D.M. S; LUCENA, E. M. P. O uso de plantas medicinais por moradores de Quixadá–Ceará. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 407-412, 2015.

OLIVEIRA, V.; SANTOS, E. M. M.; MESQUITA, É. V. A. Prescrição, preparo e manipulação de plantas medicinais. **Saber Científico (1982-792X)**, v. 4, n. 1, p. 40-45, 2021.

PERINAZZO, D. V. **Etnoconhecimento popular no uso de plantas medicinais: um estudo de caso no bairro José Pereira Alvarez, São Borja-RS**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Gestão Ambiental), Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS, 2022.

PIRES, I. F. B. et al. Plantas medicinais: cultivo e transmissão de conhecimento em comunidade cadastrada na Estratégia Saúde da Família. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 18, n. 4, p. 37-45, 2016.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. et al. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. 2015.

SOUSA, F. F. S. **Plantas medicinais da Caatinga nas áreas urbana e rural no município de Antonina do Norte, CE**. 2016.

SOUZA, L. F. *et al.* Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 18, p. 451-461, 2016.

SZERWIESKI, L. L. D. et al. Uso de plantas medicinais por idosos da atenção primária. **Revista eletrônica de enfermagem**, v. 19, 2017.

VELOSO, A. R. et al. Cultivo e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 1, 2023.

DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR EXTRACTION AND PURIFICATION OF PLANT PROTEINS

Data de aceite: 02/05/2024

M.O. Hernández-Jiménez

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Querétaro, México

M.E. Guatemala-Cisneros

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Querétaro, México

J.D.A. Loa

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Querétaro, México

N.G. Rojas-Avelizapa

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Querétaro, México

ABSTRACT: Recently, diverse methods for plant protein extraction have been studied due to the potential applications that proteins have, either for obtaining food, or for the treatment and prevention of diseases. Various plant species and even agro-industrial wastes have been used, however, the extraction and purification of these compounds involve challenges including energetical and economical costs, environmental impact, etc., hence it is important to find new strategies to carry out this process. In recent years, deep eutectic solvents (DES) have been studied in order to substitute common solvents used for protein extraction and, besides they follow the green chemistry principles. DES are able to extract proteins at with high yields, nevertheless, in spite of their multiple advantages, some challenges need to be explored to improve extraction and purification of plant proteins. The aim of this chapter is to show the multiple advantages of DES as emerging mixtures in both extraction and purification of plant proteins, as well as the opportunity areas and the challenges, that actually, can limit their large-scale application.

PALABRAS-CLAVE: green solvents, eutectic mixture, large-scale

INTRODUCTION

In recent years, the extraction of plant proteins (isolates and concentrates) has received considerable attention due to their potential of applications in 1) food, such as the obtention of emulsifiers (by legume proteins), obtainment of dietary proteins and preparation of flours derived from plant protein (Sim et al., 2021; Kim et al., 2020), as well as, 2) treatment and prevention of diseases in human and animals, because several plant protein have shown antimicrobial, antioxidant, anticancer, neuro-modulatory activities, among others (Wani et al., 2020; Kianfar et al., 2021; Navaf et al., 2023; Münch et al., 2024). Proteins are commonly extracted by standardized processes from various plant species (Navaf et al., 2023; Münch et al., 2024). Plant proteins are known to have great benefits when are included in the human diet, not only because obtaining animal protein generates a major negative impact on the environment, but also because plant proteins can be extracted from numerous agro-industrial residues (Segatto et al., 2022). Due to the increased need of obtaining plant proteins, conventional methods that involve organic solvents (methanol, acetone, benzene, chloroform, hexane, etc.) have been used on a large scale but these solvents have the properties of being flammable, explosive, poorly biodegradable and toxic, so the use of these kind of chemicals cause damage to the environment and to the human health, for this reason, environmentally friendly solvents, such as the deep eutectic solvents (DES) represent an approach to protein extraction that seeks to reduce the disadvantages of traditional organic solvents (Vigier et al. , 2015; Benvenuti et al., 2019; Socas et al., 2021; Kumar et al., 2021).

The term “eutectic” is derived from the greek word meaning low melting point and can be applied for different systems like alloys and also in liquid medium (Liu et al., 2018). In recent decades, DES have been used as unconventional solvents and they can be defined as “Mixtures of two or more pure compounds for which the eutectic point temperature is lower than that of an ideal liquid mixture, presenting significant negative deviations from ideality” and, due to their multiple properties, they have been used for the extraction of bioactive compounds, stabilization of biomolecules, enhancers of drug delivery, as well as, for the treatment of food industry waste (Molnar et al., 2024). The advantage of DES consists in their simple and inexpensive preparation, which involves only mixing and stirring at temperature below 150°C (Botelho Junior et al., 2022). Some generalities of DES are shown in Figure 1.

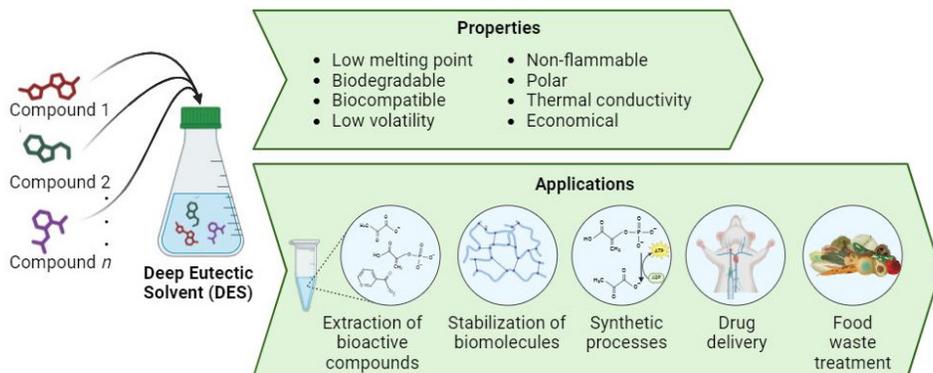


Figure 1. Properties of DES and their principal application areas

DES are formed by a mixture of quaternary ammonium salts that act as hydrogen bond acceptors (HBA) and a contra-compound, which acts as a hydrogen bond donor (HBD), these may consist of biomolecules such as sugars, carboxylic acids, amino acids, as well as some ionic molecules (Bowen et al., 2022). In Figure 2, we show examples of DES compounds as well as their classification. The properties of DES depend on the intermolecular interactions between their HBA and HBD components, as well as the nature of their hydrogen bonds, which are known to decrease their melting point, leading to the obtention of a liquid eutectic solvent mixture without requiring any additional processing or purification (Paul & Gotor-Fernandez, 2022).

DES have been classified into 5 groups: type 1 is formed by the combination of quaternary ammonium salt and metallic chloride; type 2, quaternary ammonium salt and metallic chloride hydrate; type 3, quaternary ammonium salt and HBD (organic acids, amides or polyols); type 4, metallic salts and HBD; and type 5, which consists of a new class of nonionic HBA and HBD (Figure 2). Other authors classify them according to the nature of their components into NADES (natural deep eutectic solvents), in other words, composed of natural components (biomolecules such as organic acids, amino acids, polyols, sugars or choline derivatives), THEDES (therapeutic deep eutectic solvents), those prepared of pharmaceutically active components, and TDES (ternary deep eutectic solvents), those prepared of three components (Kumar et al., 2017; Hansen et al., 2020; Sun et al., 2023).

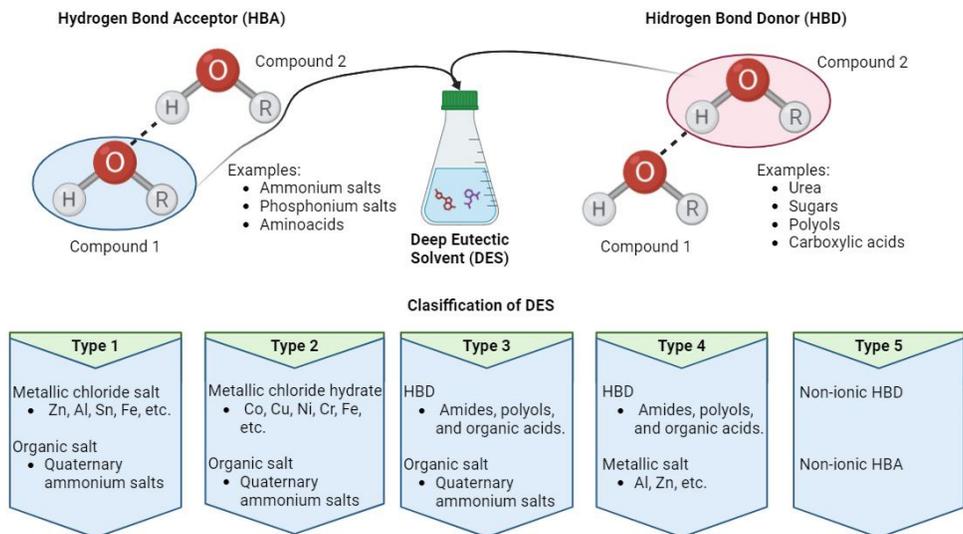


Figure 2. Composition of DES and their classification

Due to the use of DES for bioactive compounds extraction, some properties, such as viscosity, must be evaluated, since this property affects both hydrogen bonds and van der Waals interactions; at high viscosity values, the diffusion coefficients of analytes can be reduced causing low mass transfer and long term extraction (Hikmawanti et al., 2021), the viscosity depends on the composition of DES and its preparation temperature, then, it is important to carefully choose a suitable DES and evaluate the whole extraction conditions. Thus, the aim of the present chapter is to show the advantages of DES use for the extraction of plant proteins and expose some benefits in the purification of these biomolecules, as well as to argue the opportunity areas and challenges to overcome their large-scale application.

ADVANTAGES OF USING DES FOR PROTEIN EXTRACTION OVER CONVENTIONAL ORGANIC SOLVENTS

Ferreira & Sarraguça (2024) report that the selection of the ideal solvent for protein extraction not only has to be focused on obtaining the molecules of interest but also must be a sustainable, biodegradable, and innocuous compound with no negative impact on both the environment and human health. The only solvent that possesses these characteristics is water, however, it cannot be used for all types of extractions, since it does not dissolve hydrophobic compounds due to its high dielectric constant, hence the use of solvents that, at least decrease this environmental impact and are more biodegradable must follow some of the 12 principles of green chemistry (Ferreira & Sarraguça, 2024). It has been demonstrated that DES are more effective for protein extraction than classical organic solvents and, in addition the extraction efficiency is higher; DES have shown higher selectivity (Molnar et al.,

2024). At industrial scale, the most commonly methods used for protein extraction involve organic solvents, as well as alkaline and acid solutions or enzyme-based extraction (Figure 3). Previous procedures corrode the industrial equipment, generating massive industrial effluents of acid and alkaline solutions. Therefore, alternatives are being sought to find a more environmentally friendly and sustainable approach to replace existing protein extraction methods (Zhou et al., 2022; Patra et al., 2023). It has been reported that DES have been employed in a diverse range of industrial and commercial applications; on the other hand, they have also been employed in research in specific areas such as Chemistry and Biology sectors (Hansen et al., 2020). Such research has shown DES as promising candidates to be applied for the extraction of bioactive compounds, although these mixtures need to be evaluated for safety application (Mbous et al., 2017).

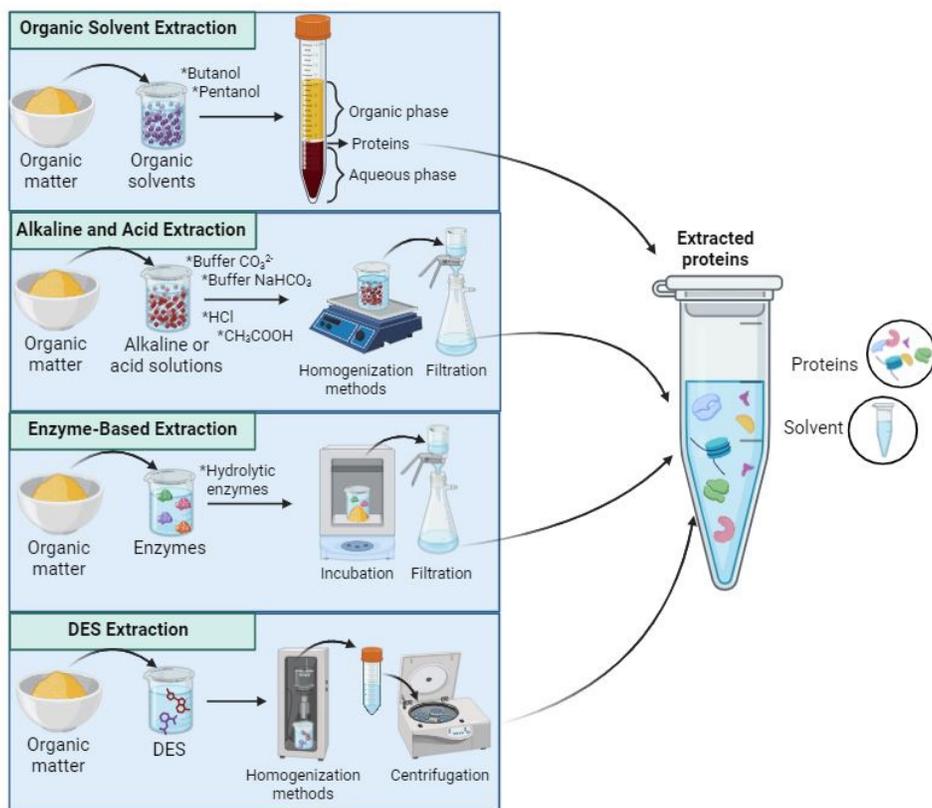


Figure 3. Most common methods for protein extraction

PROTEIN EXTRACTION AND PURIFICATION WITH DES

Regardless of the many advantages of DES, some recovery issues of the dissolved solutes after extraction have been reported such as solvent distillation but techniques are being explored: use of macroporous resins, solid phase extraction (SPE), antisolvent method and back extraction (Molnar et al., 2024), as shown in Figure 4, however, these methodologies still require the use of organic solvents such as ethanol and methanol (Palos-Hernández et al., 2022). However, the most recent techniques in protein extraction and purification involve the use of DES (Lin et al., 2022; Karimi et al., 2024); processes based on these solvents have reported higher extraction efficiencies up to 62-90% for plant proteins and aminoacids, higher results than other techniques, such as acid-based method (Li et al., 2021; Bowen et al., 2022; Zhou et al., 2022).

The purification of proteins extracted by DES can be carried out by precipitating them or by forming an insoluble layer using solvents such as ethanol, in this way, the elimination by evaporation of the EtOH components that dissolve the DES, allows the recovery of the initial compounds. Another option, is using a DES initially as an extraction medium and then use it as a formulation system, thus obviating the problem of solute recovery. Additionally, it is known that the addition of antisolvents (ethanol or water) is probably the best method for solute recovery, as it does not require specific equipment, additional costs and allows the development of sustainable processing (Ruesgas-Ramón et al., 2017).

The use of DES for the extraction and purification of plant proteins from agricultural and agro-industrial wastes has a great potential to be scalable due to the large amounts of raw materials that are generated (Bowen et al., 2022) and because DES are cheaper than common organic solvents. The advantages of using DES in protein extraction is based on the performance of the following three conditions: affinity, solubility, stability as well as the low costs (Landa-Castro et al., 2020; Hewage et al., 2024).

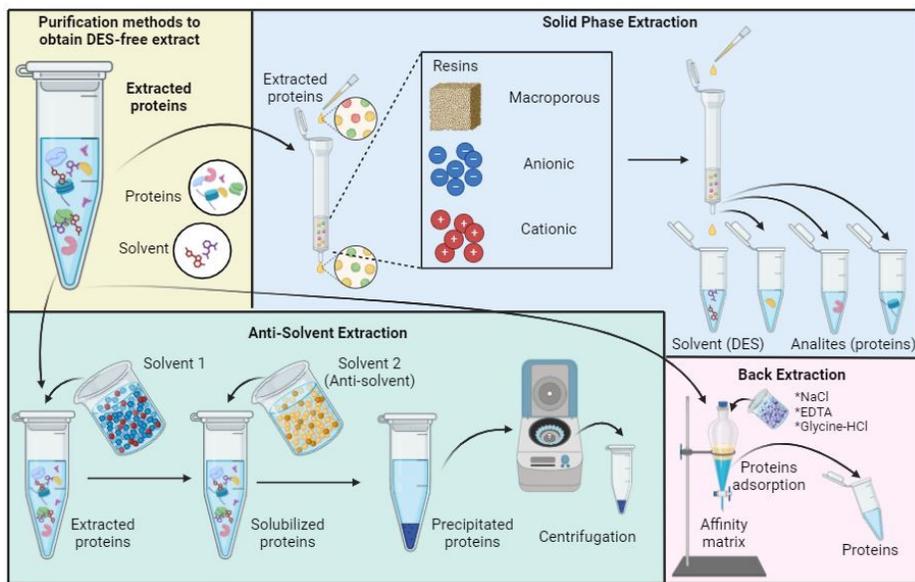


Figure 4. Purification methods for proteins extracted with DES

In general, in methods of solid-liquid extraction, water is used to reduce the viscosity of DES and, therefore, the efficiency of the extraction process is improved. It is known that higher viscosity in DES is related to the presence of a large amount of hydrogen bonds, which, in some cases, can avoid protein solubilization. However, it is necessary to use an acceptable volume of water that prevents disruption of hydrogen bond interactions between the components of DES since an excessive volume of water can negatively affect the beneficial properties of DES (Ruesgas-Ramón et al., 2017; Ling et al., 2020).

The purification process of proteins is fundamental for research as well as for industrial sectors i.e. in-depth study or to commercialize safe products. Generally, purification process of proteins include precipitation using water or aqueous buffers in combination with organic solvents (acetone), bases (ammonium sulfate) or salts such as ion exchange, also electrophoresis or affinity chromatography can be used (Adhikari et al., 2010; Gómez-García et al., 2022). But these methods have multiple disadvantages such as negative effects on proteins including denaturation or complexation and high costs. That is the reason why viable alternatives are being studied suggesting the use of DES for liquid-liquid extraction due to shorter separation time and enhanced extraction efficiency (Xu et al., 2015).

Some DES most commonly used for extraction and purification of proteins include betaine (HBA) and urea, glucose, sorbitol, and glycerol (HBD). Protein extraction can be done also by using aqueous two-phase systems (ATPS), i.e., mixtures of compounds such as betaine:urea, which has been demonstrated as one of the most outstanding DES, due to its capacity to purify bovine serum albumin (BSA) up to 99.82% (Li et al., 2016). On the other hand, DES mixtures with choline chloride:glycerol have also been used for BSA purification obtaining efficiently of, 98.71% (Xu et al., 2015).

OPPORTUNITIES AND CHALLENGES OF USING DES TO EXTRACT PLANT PROTEINS

Bellow we will mention some advantages and opportunities of using DES, as well as the challenges faced by its application for the extraction and purification of proteins at large scale.

Some of the advantages of using DES for the extraction of plant proteins is that solvents have been viewed as mixtures rather than pure compounds, hence, no chemical reaction occurs and there is no need to eliminate residues (Moldes et al., 2022). Additionally, the non-flammable property of DES makes synthesis safer at high temperature and ambient pressure with less energy costs (Ge et al., 2017).

The protein extraction principle by DES relies on the phenomenon of aggregation and envelopment, which is non-destructive of the protein structure, making it particularly suitable for the nondestructive extraction of bioactive compounds. Most studies have reported that DES present high efficiency of protein extraction (Zhou et al., 2022), then DES can be applied to multiple areas (electrochemistry, organic and inorganic chemistry) and their properties (phase behavior, melting temperature, density, conductivity, surface tension and polarity) can be modified based on the chemical nature of compounds and their molar ratio (Ling & Hadinoto, 2022).

It has been suggested that the use of DES for specific applications such as food and pharmaceutical approaches might not require purification steps (Ling & Hadinoto, 2022). Rico et al. (2021), reported that DES can be adapted for the extraction of several valuable compounds from diverse raw material sources exceeding, in many cases, the organic solvents efficiency but obviously depends on the target compound (Palos-Hernández et al., 2022). Due to the wide variety of DES, the selection of an ideal mixture for a given group of compounds is crucial, and even though this selection can influence in the extraction of the compounds, their evaluations are usually not complicated (Palos-Hernández et al., 2022).

However, some consideration should be taken for DES use because they can extract other compounds different of proteins such as peptides, polar lipids, sugar residues, etc. Most of the literature, do not consider their low selectivity, therefore, it is necessary a better understanding of the parameters that could affect or favor DES interactions with the proteins (Ruesgas-Ramón et al., 2017).

The low efficiency of back extraction methods is another weakness that can be highlighted about the use of DES (Zhou et al., 2022), as well as their volatilization and incompatibility with chromatographic and detection systems, in which, the reliable evaluation of the target compounds is usually complicated (Socas-Rodríguez et al., 2021).

An important challenge for protein extraction with DES is that their density and pH can affect the extraction efficiency; the selection of HBA and HBD components, as well as their molar ratio are also important due to their influence on solvation interactions (Abbasi

et al., 2022; Patra & Pandiselvam, 2023). Moreover, conditions as solvent recyclability and thermal stability of DES, is known to be involved in the protein purification and is often complex due to it can consume large amounts of energy making industrial scale-up difficult (Vigier et al., 2015). Furthermore, the inherent bioactivity of DES might be a limitation for assessing the activity associated with the extracted proteins as well as for other bioactive compounds (Ling & Hadinoto, 2022).

Despite the promising future of using biocompatible solvents, there is an urgent need to develop environmentally friendly, reliable, and simple methods that allow us to recover and purify proteins and that allow proper recycling and regeneration of the solvent used, so that the environmental impact is minimal or negligible. Nevertheless, the state of the art is still in its infancy; there are few studies that address protein purification or solvent recovery (Cannavacciuolo et al., 2022; Moldes et al., 2022) Specifically, by employing innovative extraction techniques that enhance the extraction process such as the ultrasonic sonication technique based on liquid-liquid extraction improves dispersion in viscous DES and enhances mass transfer. Similarly, microwave irradiation is also used in liquid-liquid extraction, improving the extraction of proteins and polar compounds. In the case of other methodologies that improve protein extraction with DES, the use of electrochemical techniques through magnetic composites of metallic nanoparticles in solid phase can be mentioned (Vigier et al., 2015; Kist et al., 2021).

CONCLUSION

The advantages to use deep eutectic solvents for plant proteins is noteworthy mainly because they are environmentally friendly, consist of low-cost components, present low toxicity and are biodegradable, characteristics that make them safe for food and pharmaceutical applications. It is important to consider that DES preparation must be a priority to facilitate the development of sustainable purification of proteins. Nevertheless, the selection of a solvent for a specific protein extraction is still a challenge, therefore, it is vitally important to carry out research to get them at industrial scale.

REFERENCES

- Abbasi, N. M., Farooq, M. Q., & Anderson, J. L. (2022). Investigating the effect of systematically modifying the molar ratio of hydrogen bond donor and acceptor on solvation characteristics of deep eutectic solvents formed using choline chloride salt and polyalcohols. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1667, p. 462871). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462871>
- Adhikari, S., Manthena, P. V., Sajwan, K., Kota, K. K., & Roy, R. (2010). A unified method for purification of basic proteins. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 400, Issue 2, pp. 203–206). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.011>
- Benvenuti, L., Zielinski, A. A. F., & Ferreira, S. R. S. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 90, pp. 133–146). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>
- Botelho Junior, A. B., Pavoski, G., Silva, M. D. C. R. da, da Silva, W. L., Bertuol, D. A., & Espinosa, D. C. R. (2022). Promising technologies under development for recycling, remanufacturing, and reusing batteries: an introduction. In *Nano Technology for Battery Recycling, Remanufacturing, and Reusing* (pp. 79–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91134-4.00006-6>
- Bowen, H., Durrani, R., Delavault, A., Durand, E., Chenyu, J., Yiyang, L., Lili, S., Jian, S., Weiwei, H., & Fei, G. (2022). Application of deep eutectic solvents in protein extraction and purification. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.912411>
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Frigerio, J., Giustra, C. M., Labra, M., & Campone, L. (2022). Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis. In *Foods* (Vol. 12, Issue 1, p. 56). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods12010056>
- Ferreira, C., & Sarraguça, M. (2024). A Comprehensive Review on Deep Eutectic Solvents and Its Use to Extract Bioactive Compounds of Pharmaceutical Interest. In *Pharmaceuticals* (Vol. 17, Issue 1, p. 124). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph17010124>
- Ge, X., Gu, C., Wang, X., & Tu, J. (2017). Deep eutectic solvents (DESs)-derived advanced functional materials for energy and environmental applications: challenges, opportunities, and future vision. In *Journal of Materials Chemistry A* (Vol. 5, Issue 18, pp. 8209–8229). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/c7ta01659j>
- Gómez-García, R., Vilas-Boas, A. A., Vilas-Boas, A. M., Campos, D. A., & Pintado, M. (2022). Polyelectrolyte Precipitation: A New Green Chemistry Approach to Recover Value-Added Proteins from Different Sources in a Circular Economy Context. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 16, p. 5115). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules27165115>
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F., & Sangoro, J. R. (2020). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. In *Chemical Reviews* (Vol. 121, Issue 3, pp. 1232–1285). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. In *Plants* (Vol. 10, Issue 10, p. 2091). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>

- Hewage, A., Olatunde, O. O., Nimalaratne, C., House, J. D., Aluko, R. E., & Bandara, N. (2024). Improved protein extraction technology using deep eutectic solvent system for producing high purity fava bean protein isolates at mild conditions. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 147, p. 109283). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109283>
- Jeevan Kumar, S. P., Vijay Kumar, G., Dash, A., Scholz, P., & Banerjee, R. (2017). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. In *Algal Research* (Vol. 21, pp. 138–147). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.014>
- Karimi, A., Bhowmik, P., Yang, T. C., Samaranyaka, A., & Chen, L. (2024). Extraction of canola protein via natural deep eutectic solvents compared to alkaline treatments: Isolate characteristics and protein structural and functional properties. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 152, p. 109922). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109922>
- Kianfar, E. (2021). Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 19, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00896-3>
- Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 105, pp. 261–272). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012>
- Kist, J. A., Zhao, H., Mitchell-Koch, K. R., & Baker, G. A. (2021). The study and application of biomolecules in deep eutectic solvents. In *Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 9, Issue 3, pp. 536–566). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/d0tb01656j>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M. K., Satankar, V., Bhoite, A. G., Amarowicz, R., Kaur, C., & Kennedy, J. F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 115, p. 106595). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>
- Landa-Castro, M., Sebastián, P., Giannotti, Marina. I., Serrà, A., & Gómez, E. (2020). Electrodeposition of nanostructured cobalt films from a deep eutectic solvent: Influence of the substrate and deposition potential range. In *Electrochimica Acta* (Vol. 359, p. 136928). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136928>
- Li, M., Liu, Y., Hu, F., Ren, H., & Duan, E. (2021). Amino Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Phenolic Compounds from Aqueous Environments. In *Processes* (Vol. 9, Issue 10, p. 1716). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pr9101716>
- Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., & Ding, X. (2016). Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. In *Talanta* (Vol. 152, pp. 23–32). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.042>
- Lin, J., Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Cui, C., & Wang, W. (2022). Deep eutectic solvents and alkaline extraction of protein from seabuckthorn seed meal: a comparison study. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 11, Issue 4, pp. 1028–1035). Tsinghua University Press. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.03.019>
- Ling, J. K. U., & Hadinoto, K. (2022). Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 6, p. 3381). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms23063381>

- Ling, J. K. U., Chan, Y. S., Nandong, J., Chin, S. F., & Ho, B. K. (2020). Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: Characterization, solubilization capacity and antioxidant property. In *LWT* (Vol. 133, p. 110096). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110096>
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. In *Journal of Natural Products* (Vol. 81, Issue 3, pp. 679–690). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., & Looi, C. Y. (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. In *Biotechnology Advances* (Vol. 35, Issue 2, pp. 105–134). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
- Moldes, D., Rojo, E. M., Bolado, S., García-Encina, P. A., & Comesaña-Gándara, B. (2022). Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae. In *Applied Sciences* (Vol. 12, Issue 5, p. 2391). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app12052391>
- Molnar, M., Gašo-Sokač, D., Komar, M., Jakovljević Kovač, M., & Bušić, V. (2024). Potential of Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Organic Compounds from Food Industry By-Products and Agro-Industrial Waste. In *Separations* (Vol. 11, Issue 1, p. 35). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/separations11010035>
- Münch, K., Schroën, K., & Berton-Carabin, C. (2024). Relevance of various components present in plant protein ingredients for lipid oxidation in emulsions. In *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/aocs.12790>
- Navaf, M., Sunooj, K. V., Aaliya, B., Sudheesh, C., Akhila, P. P., Mir, S. A., Nemtanu, M. R., George, J., Lackner, M., & Mousavi Khaneghah, A. (2023). Contemporary insights into the extraction, functional properties, and therapeutic applications of plant proteins. In *Journal of Agriculture and Food Research* (Vol. 14, p. 100861). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100861>
- Palos-Hernández, A., Gutiérrez Fernández, M. Y., Escuadra Burrieza, J., Pérez-Iglesias, J. L., & González-Paramás, A. M. (2022). Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. In *Sustainable Chemistry and Pharmacy* (Vol. 29, p. 100773). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100773>
- Patra, A., Arun Prasath, V., & Pandiselvam, R. (2023). Deep eutectic solvent: An emerging trend for extraction of plant proteins. In *Journal of Molecular Liquids* (Vol. 389, p. 122887). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122887>
- Paul, C. E., & Gotor-Fernández, V. (2022). Applied biocatalysis in deep eutectic solvents. In *Biocatalysis in Green Solvents* (pp. 467–510). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91306-5.00011-x>
- Rico, X., Nuutinen, E.-M., Gullón, B., Pihlajaniemi, V., & Yáñez, R. (2021). Application of an eco-friendly sodium acetate/urea deep eutectic solvent in the valorization of melon by-products. In *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 130, pp. 216–228). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.10.006>
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 65, Issue 18, pp. 3591–3601). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>

- Segatto, M. L., Stahl, A. M., Zanotti, K., & Zuin, V. G. (2022). Green and sustainable extraction of proteins from agro-industrial waste: An overview and a closer look to Latin America. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 37, p. 100661). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100661>
- Sim, S. Y. J., SRV, A., Chiang, J. H., & Henry, C. J. (2021). Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap. In *Foods* (Vol. 10, Issue 8, p. 1967). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10081967>
- Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. In *Applied Sciences* (Vol. 11, Issue 11, p. 4897). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app11114897>
- Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., & Mendiola, J. A. (2021). Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. In *Applied Sciences* (Vol. 11, Issue 11, p. 4897). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app11114897>
- Sun, L., Zhu, Z., & Sun, D.-W. (2023). Regulating ice formation for enhancing frozen food quality: Materials, mechanisms and challenges. In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 139, p. 104116). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.013>
- Vigier, K. D. O., Chatel, G., & Jérôme, F. (2015). Contribution of Deep Eutectic Solvents for Biomass Processing: Opportunities, Challenges, and Limitations. In *ChemCatChem* (Vol. 7, Issue 8, pp. 1250–1260). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500134>
- Wani, S. S., Dar, P. A., Zargar, S. M., & Dar, T. A. (2020). Therapeutic Potential of Medicinal Plant Proteins: Present Status and Future Perspectives. In *Current Protein & Peptide Science* (Vol. 21, Issue 5, pp. 443–487). Bentham Science Publishers Ltd. <https://doi.org/10.2174/1389203720666191119095624>
- Xu, K., Wang, Y., Huang, Y., Li, N., & Wen, Q. (2015). A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 864, pp. 9–20). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.026>
- Zhou, Y., Wu, W., Zhang, N., Soladoye, O. P., Zhang, Y., & Fu, Y. (2022). Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges. In *Food Research International* (Vol. 161, p. 111842). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111842>

EFECTO DE LAS ZONAS DE VIDA Y LA ALTURA RELATIVA EN LA DENSIDAD ANHIDRA DE *SWIETENIA MAHAGONI* ROXB Y *SWIETENIA MACROPHYLLA* JACQ. PLANTADAS EN LA SIERRA, REPÚBLICA DOMINICANA

Data de aceite: 02/05/2024

Santiago W. Bueno-López

Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra. Vice-rectory of Research and Innovation, Santiago de los Caballeros, Dominican Republic
<https://orcid.org/0000-0002-8508-9184>

Luis Rene Caraballo Rojas

Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra. Vice-rectory of Research and Innovation, Santiago de los Caballeros, Dominican Republic
<https://orcid.org/0000-0003-0812-1045>

Juan G. Torres

Consortio Forestal Serrano San José de las Matas, Santiago, Dominican Republic
<https://orcid.org/0000-0002-3392-9014>

RESUMEN: Este estudio ha proporcionado un análisis de factores que inciden en la variación en la densidad anhidra en árboles de *Swietenia macrophylla* Roxb y *Swietenia mahogani* Jacq., plantadas en tres zonas de vida (ZV) de la región La Sierra, República Dominicana. Ambas especies son muy importantes para los programas de reforestación en la zona de estudio, pero aún no está claro si las diferencias de las características de su madera pueden atribuirse a factores inter e intraespecíficos.

Nuestro objetivo fue estudiar la variación de la densidad (anhidra) de la madera de estas dos especies, basándonos en métodos estadísticos robustos, y densitometría convencional. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas mixto, utilizando como factores inter-sujetos la especie y ZV, y como factor intra-sujetos, la altura relativa (AR) en el fuste. El análisis de la varianza en términos del modelo de efectos de los factores fue expresado en términos de un modelo de regresión, apropiado cuando la estructura de la matriz de las variables independientes no es simple, como en este caso. Las interacciones de tres vías y bidireccionales, y los efectos principales son estadísticamente significativos. La densidad anhidra fue mayor para *S. mahagoni*, menor en la ZV “seca” y disminuyó a medida que aumento la AR. Los promedios menores de densidad anhidra para las especies *S. mahagoni* y *S. macrophylla* fueron 0,649 g/cm³ y 0,676 g/cm³, respectivamente, ambos observados en la ZV “seca” a AR de 0,8. Los promedios mayores correspondientes fueron 0,951 g/cm³ y 0,876 g/cm³, ambos observados en la ZV “húmeda” a AR de 0,1.

PALABRAS-CLAVE: maderas tropicales, altura relativa fuste, densitometría convencional, anova repetida mixta, regresión lineal.

EFFECT OF LIFE ZONES AND RELATIVE HEIGHT ON THE ANHYDROUS DENSITY OF *SWIETENIA MAHAGONI* ROXB AND *SWIETENIA MACROPHYLLA* JACQ. PLANTED IN LA SIERRA, DOMINICAN REPUBLIC

ABSTRACT: This study provides an analysis of factors affecting variation of the anhydrous density property within trees and between the species *Swietenia macrophylla* Roxb and *Swietenia mahagoni* Jacq., growing in three different life zones in La Sierra region, Dominican Republic. These species are very important for the reforestation programs that are carried out in the study area, although little is known about the difference in their wood characteristics within this region. Our objective was to study the anhydrous density of stem wood from these two species, based on robust statistical methods, and conventional densitometry. A mixed repeated measurement analysis (ANOVA) was employed using species and life zone as inter-subject factors, and relative height as an intra-subject factor. The analysis of variance in terms of the factor effects model was expressed in terms of a regression model that allows the assessment of multifactor analysis when the matrix structure of independent variables is not simple as in this case. Results show that three-way interactions, simple bidirectional, and simple main effects are statistically significant. When compare among species, anhydrous density was higher for *S. mahagoni* than for *S. macrophylla*; was lowest in the “dry” life zone; and diminished as relative height within the tree stem increased. Lowest average anhydrous density for *S. mahagoni* and *S. macrophylla* were, respectively, 0,649 g/cm³ and 6,76 g/cm³, both values observed in the “dry” live zone at 0,8 relative height. The respective corresponding highest averages were 0,951 and 0,876 g/cm³, both observed within the “humid” live zone at RH of 0,1.

KEYWORDS: tropical woods, stem wood, conventional densitometry, repeated mixed anova, lineal regression.

INTRODUCCIÓN

La percepción de la calidad de la madera varía, y es difícil definir en una sola declaración; posiblemente la definición más sucinta es que es “una medida de la adecuación de la madera para un uso determinado” (Schimleck *et al.*, 2018). Una de las propiedades físicas más importantes de la madera es su densidad, asociada directamente a las propiedades mecánicas y durabilidad de este material. Esta depende de componentes genéticos y ambientales y se correlaciona con otras propiedades como la rigidez y el rendimiento de la pulpa. (Kimberley *et al.*, 2015). La densidad de la madera es influenciada por el hábitat, los tratamientos silvícolas y la genética. Varía entre individuos en un rodal, entre especies y ambientes; desde el duramen hasta la corteza, dentro de los anillos anuales, y desde las raíces a la copa dentro del mismo árbol (Longi *et al.*, 2018; Kimberley *et al.*, 2017).

La densidad de la madera afecta su calidad y rendimiento. Con el fin de desarrollar estrategias para lograr productos finales, los administradores forestales y los procesadores de madera requieren conocer sobre la variación de la densidad de la madera en sitios diferentes. El conocimiento detallado de su variación es un requisito previo para el establecimiento de plantaciones comerciales de especies con alto potencial para diversos usos finales (Anoop *et al.*, 2014), y para optimizar el valor en su procesamiento (Auty *et al.*, 2014).

Las especies consideradas en este estudio son, *Swietenia macrophylla* Roxb (caoba de hoja grande) y *Swietenia mahogani* Jacq. (caoba de hojas pequeñas). Pertenecen a la familia Meliaceae, y su madera es una de las más valiosas del mundo. Las primeras plantaciones de *S. macrophylla* en República Dominicana fueron establecidas en el área de estudio en 1983, como parte de los programas de reforestación que realiza la ONG Plan Sierra, en sus esfuerzos por contrarrestar el deterioro ecológico de la región. *S. mahogani* es una especie nativa de la isla Hispaniola. Estas maderas tropicales han sido ampliamente utilizadas por más de 500 años en la construcción de componentes y muebles (De Almeida *et al.*, 2019) aunque la densidad de su madera como la de muchas especies de árboles tropicales, sigue siendo desconocida (Djomo *et al.*, 2017).

Los objetivos de este estudio fueron: caracterizar la densidad anhidra en muestras de madera de dos especies de caoba, *S. macrophylla* y *S. mahogani* en plantaciones establecidas en La Sierra, República Dominicana; comparar mediante análisis del modelo ANOVA mixto de tres vías los efectos de las dos especies, tres zonas de vida (ZV) y en cada árbol, tres AR (0,1; 0,5; y 0,8), en la variación de la densidad anhidra de la madera del fuste y construir un modelo de regresión equivalente al enfoque del análisis de varianza en términos del modelo de efectos, para predecir la densidad anhidra en cada combinación de los niveles del factor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Los datos colectados para este estudio observacional comparativo provienen de seis plantaciones de *S. mahogany* y *S. macrophylla*, localizadas dentro de la región conocida como La Sierra, República Dominicana (porción este de La Hispaniola. Dos plantaciones de cada especie fueron seleccionadas dentro de cada una de las siguientes zonas de vida (ZV) según la caracterización Holdridge (1987): Bosque Seco Subtropical, por simplicidad aquí designado como zona “seca”; Bosque Húmedo Subtropical, que desde aquí se designará como zona “intermedia”; y finalmente el Bosque Subtropical Muy Húmedo, que denominaremos zona “húmeda” (Figura 1). La región La Sierra se localiza específicamente entre las coordenadas UTM 251,748 m E - 325,795 m E y 2,116,888 m N - 2,156,996 m N. Las pendientes en esta zona varían entre cero y 70 por ciento. La elevación oscila entre 400 metros y más de 1000 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 24 °C, con una variación entre el máximo y el mínimo de menos de 10 °C (Figura 2) (Bueno-López 2009), y los suelos son en su mayoría poco profundos, bien drenados, con textura arenosa regular.

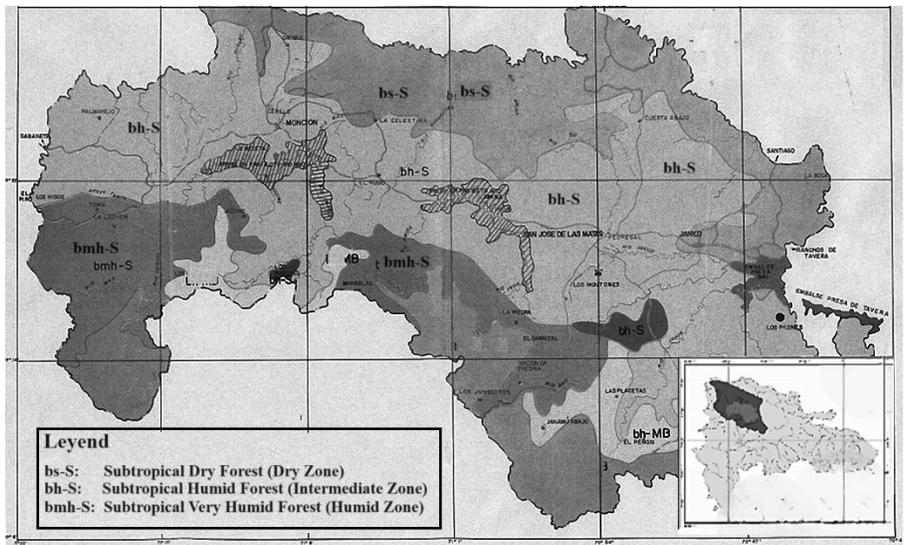


Figura 1. Zonas de vida según Holdridge (1987) en el área de estudio.

Se seleccionaron 36 árboles con edades entre 5 y 35 años para cada especie, 12 en cada plantación y ZV. Debido a problemas que se presentaron en el procesamiento de las muestras, se descartaron 6 árboles de *S. mahagony* y 9 árboles de *S. macrophylla*. La selección final fue la siguiente: De *S. mahagony* se consideraron finalmente 9 árboles en la zona “seca”, 10 en la “intermedia” y 11 en la “húmeda”. De *S. macrophylla* se seleccionaron 9 en cada zona.

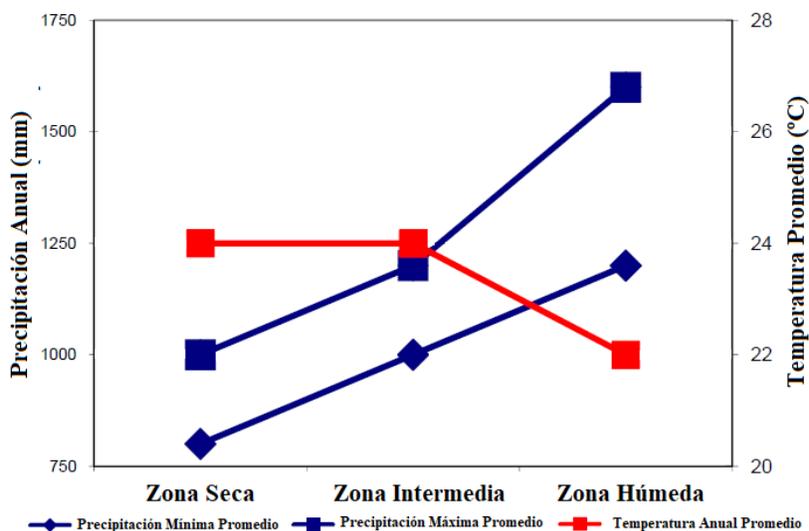


Figura 2. Precipitación anual mínima y máxima promedio y temperatura anual promedio en el área de estudio.

Proceso de selección de las muestras de madera

Para el muestreo de la madera del fuste a tres AR, se seleccionaron árboles que pertenecieran a la clase de diámetro cuadrático medio considerando clases de edad específicas (5-15, 16-25, 26-35). Para cada árbol, se obtuvieron mediante muestreo destructivo, discos de una pulgada de espesor a cada AR. En cada disco, tres submuestras de madera fueron disectadas, una porción del duramen y dos porciones de la albura.

El volumen anhidro (seco) de cada submuestra (cm^3) se midió inmediatamente después de estas ser secadas al horno a $110\text{ }^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 horas, utilizando un densitómetro (QMS Inc., Knoxville, TN, EE. UU.); el peso seco (g) se obtuvo mediante balanza de alta precisión; y la densidad anhidra (g/cm^3) se obtuvo como la relación entre masa y volumen de la madera completamente seca. La densidad anhidra (DA) de las submuestras a cada AR fue promediada para conformar una muestra compuesta. La DA de madera se reporta para cada muestra compuesta en cada AR (0,1; 0,5; 0,8), de cada árbol individual.

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA mixto de tres vías con el fin de comprender los efectos de *S. mahagoni* y *S. macrophylla*; tres zonas de vida (ZV), “seca”, “intermedia” y “húmeda”; y el factor inter-sujetos “AR” (AR) con tres niveles, 0,1; 0,5 y 0,8., en la densidad anhidra (DA) del fuste. Utilizamos el procedimiento GLM para medidas repetidas en SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. 2017), que permite investigar las interacciones entre factores, así como los efectos de los factores individuales. Además, proporciona análisis univariados y multivariados para los datos de las medidas repetidas.

Las pruebas post hoc para evaluar las diferencias entre promedios específicos se llevaron a cabo utilizando la corrección Bonferroni (1936) la cual ajusta el nivel de significación estadística considerado de 0,05; de acuerdo al número de comparaciones realizadas. Las medias marginales estimadas que proporcionan estimaciones de los valores promedios previstos para las celdas del modelo se reportan en un gráfico de perfil (gráfico de interacción). Las sumas de cuadrados Tipo III son las utilizadas por defecto por el proceso GLM, adecuadas a nuestro estudio, debido a que los grupos investigados no son homogéneos.

Abordamos el enfoque de regresión para el análisis de la varianza, en términos del modelo de efectos de los factores. El enfoque de regresión es útil para analizar estudios multifactoriales cuando la estructura de la matriz de las variables independientes no es simple (Kutner *et al.*, 2005). El modelo de efectos de los factores es (Ec. 1):

$$Y_{ijk} = \mu_{..} + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ikj} \quad [1]$$

donde,

Y_{ijk} = promedio para la densidad anhidra a AR independientes 0,1; 0,5 y 0,8.

μ = promedio general constante,

α_i = Los factores principales de la especie en el nivel i th, son constantes sujetos a la restricción $\sum \alpha_i = 0$.

β_j = Los factores principales de la ZV en el nivel j th, son constantes sujetos a la restricción $\sum \beta_j = 0$.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Los efectos de la interacción cuando el factor “especie” esta en el nivel i th y el factor “ZV” está en el nivel j th, son constantes y sujetos a las restricciones:

$$\sum_i (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad j = 1, \dots, b$$

$$\sum_j (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad i = 1, \dots, a$$

ε_{ijk} = son independientes $N(0, \sigma^2)$.

Las respuestas promedio del modelo [1] están dadas por (Ec. 2):

$$E [Y_{ijk}] = \mu. + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} \quad [2]$$

Debido a la restricción $\sum \alpha_i = 0$, solo se necesitan $a - 1$ parámetros α_i en el modelo de regresión. El factor inter-sujetos α_i denota la “especie” con dos niveles (*S. macrophylla* y *S. mahagony*), de manera que solo un parámetro lo representa. Además, debido a la restricción $\sum_j (\alpha\beta)_{ij} = 0$, solo se necesitan $b - 1$ parámetros β_j . El factor inter-sujetos β_j denota la “ZV” con tres niveles (“seca”, “intermedia” y “húmeda”) de manera que dos parámetros lo representan para el análisis de la varianza en términos del modelo de efectos de los factores inter-sujetos.

Para los parámetros de la interacción, debido a las interrelaciones entre las restricciones pertinentes, solo $(a - 1)(b - 1) = 2$ términos $(\alpha\beta)_{ij}$ son requeridos. El modelo “completo” ANOVA de los dos factores inter-sujetos para cada nivel de AR es (Ec. 3):

$$Y_{ijk} = \mu. + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad i = 1, 2; j = 1, 2, 3 \quad [3]$$

Para expresar este modelo en términos de regresión, utilizamos variables indicadoras que toman valores de 1, -1 o 0, como se explica a continuación. Específicamente, necesitamos $a - 1 = 2 - 1 = 1$ variable indicadora para los efectos principales del factor A, y $b - 1 = 3 - 1 = 2$ variables indicadoras para el efectos principales del factor B. Los términos de interacción corresponden a los productos cruzados de las variables indicadoras para los efectos principales del factor A y del factor B. Específicamente, el modelo “completo” de regresión equivalente al modelo ANOVA [3] es (Ec. 4):

$$Y_{ijk} = \mu. + \alpha_1 X_{ijk1} + \beta_1 X_{ijk2} + \beta_2 X_{ijk3} + (\alpha\beta)_{11} X_{ijk1} X_{ijk2} + (\alpha\beta)_{12} X_{ijk1} X_{ijk3} + \varepsilon_{ijk} \quad [4]$$

donde:

$X_{ijk1} =$	1	si la observación es del nivel 1 (<i>S. mahagoni</i>) para el factor A (Especie)
	-1	si la observación es del nivel 2 (<i>S. macrophylla</i>) para el factor A (Especie)
$X_{ijk2} =$	1	si la observación es del nivel 1 (ZV "seca") para el factor B (ZV)
	-1	si la observación es del nivel 3 (ZV "húmeda") para el factor B (ZV)
	0	Lo contrario
$X_{ijk3} =$	1	si la observación es del nivel 2 (ZV "intermedia") para el factor B (ZV)
	-1	si la observación es del nivel 3 (ZV "húmeda") para el factor B (ZV)
	0	Lo contrario

Los coeficientes de regresión en [4] son los parámetros del modelo ANOVA cuyos estimadores se presentan a continuación (Ec. 5):

$$\begin{aligned}
 \mu_{...} &= \bar{Y}_{...} \\
 \alpha_1 &= \mu_{1.} - \mu_{...} = \bar{Y}_{1..} - \bar{Y}_{...} \\
 \beta_1 &= \mu_{.1} - \mu_{...} = \bar{Y}_{.1.} - \bar{Y}_{...} \\
 \beta_2 &= \mu_{.2} - \mu_{...} = \bar{Y}_{.2.} - \bar{Y}_{...} \\
 (\alpha\beta)_{11} &= \mu_{11} - \mu_{1.} - \mu_{.1} + \mu_{...} = \bar{Y}_{11.} - \bar{Y}_{1..} - \bar{Y}_{.1.} + \bar{Y}_{...} \\
 (\alpha\beta)_{12} &= \mu_{12} - \mu_{1.} - \mu_{.2} + \mu_{...} = \bar{Y}_{12.} - \bar{Y}_{1..} - \bar{Y}_{.2.} + \bar{Y}_{...}
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

Los parámetros restantes del modelo ANOVA no son necesarios en el modelo de regresión debido a las restricciones. Debido a estas restricciones tendríamos que (Ec. 6):

$$\begin{aligned}
 \alpha_2 &= -\alpha_1 \\
 \beta_3 &= -\beta_1 - \beta_2 \\
 (\alpha\beta)_{13} &= -(\alpha\beta)_{11} - (\alpha\beta)_{12} \\
 (\alpha\beta)_{21} &= -(\alpha\beta)_{11}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Supuestos

Los supuestos; variable dependiente medida a nivel continuo, dos factores inter-sujetos (independientes) medidos a nivel categórico, y presencia de al menos un factor intra-sujetos (independiente), son inherentes a nuestros datos. Los valores atípicos fueron evaluados mediante diagramas de caja. El supuesto de normalidad fue evaluado utilizando la prueba de Shapiro y Wilk (1965) que es apropiada para cuando se tienen menos de 50 observaciones (Elliott y Woodward, 2007), para cada combinación de grupos de los tres factores; especie, ZV (intra-sujetos) y AR (inter-sujetos). El supuesto de homogeneidad de las varianzas fue evaluado utilizando la prueba de Levene (1960), y el de esfericidad mediante la prueba de Mauchly (1940).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de diferentes árboles hace las observaciones independientes. Las observaciones realizadas a diferentes AR dentro de un mismo árbol son inherentemente correlacionadas. La herramienta de análisis de medidas repetidas tiende a corregir esta violación al supuesto de independencia, utilizando sumas de cuadrados apropiadas. Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk (1965) indican que se cumplen el supuesto de normalidad en cada combinación de grupos de los tres factores, especie y ZV y AR (Tabla 1). La presencia de valores atípicos evaluados por la inspección de los gráficos de caja (no mostrados) no detecta su presencia.

ZV	AR	<i>S. macrophylla</i>			<i>S. mahagony</i>		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Seca	0.1	0.965	9	0.854	0.949	9	0.681
	0.5	0.956	9	0.756	0.918	9	0.377
	0.8	0.954	9	0.733	0.874	9	0.135
Intermedia	0.1	0.888	9	0.190	0.974	10	0.922
	0.5	0.954	9	0.731	0.948	10	0.643
	0.8	0.961	9	0.806	0.945	10	0.604
Húmeda	0.1	0.967	9	0.867	0.959	11	0.765
	0.5	0.926	9	0.444	0.895	11	0.159
	0.8	0.985	9	0.986	0.892	11	0.146

Tabla 1. Resultados de aplicar la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para las observaciones en cada especie del factor intra-sujetos. Se comprueba que en cada nivel de la variable AR y ZV, estas siguen una distribución normal multivariada.

La prueba de Levene (1960) para la homogeneidad de varianzas es estadísticamente significativa (Valor-P < 0,05) para los niveles 0,5 y 0,8 de la variable intra-sujetos, AR. No se cumple el supuesto de homogeneidad, din embargo, el ANOVA mixto de tres vías es robusto a la heterogeneidad de la varianza en estas circunstancias. Lo esencial de los diseños de medidas repetidas es que, en lugar de la homogeneidad de la varianza, se cumpla el supuesto de esfericidad evaluada por la prueba de Mauchly, que permite verificar si la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación orto-normalizada es proporcional a una matriz de identidad

En la “Tabla 2” se muestra el resultado de esta prueba. Indican que la hipótesis nula prevalece y que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación orto-normalizada es proporcional a una matriz de identidad. El nivel de significancia para 2 gl es 0,288, de manera que, para los análisis de la interacción entre factores, los efectos principales y simples podemos proceder asumiendo el supuesto de esfericidad, sin tener que ajustar los grados de libertad.

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon		
					Greenhouse Geisser	Huynh Feldt	Límite inferior
AR	0,951	2,488	2	0,288	0,954	1,000	0,500

Tabla 2. Resultado de la prueba de Mauchly que prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación orto-normalizada es proporcional a una matriz de identidad.

En la “Tabla 3” se muestran las estadísticas descriptivas relevantes para la relación entre el factor intra-sujetos, “AR” y los factores inter-sujetos “especie” y “ZV”, y la variable dependiente “DA”. Las estimaciones incluyen los estadísticos descriptivos promedios para las 18 combinaciones de los factores.

Especie	Zona	Altura Relativa	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
					Inferior	Superior
S. mahagony	Seca	1	0,813	0,010	0,793	0,833
		2	0,650	0,010	0,629	0,671
		3	0,649	0,011	0,628	0,671
	Intermedia	1	0,890	0,009	0,872	0,909
		2	0,795	0,010	0,775	0,815
		3	0,767	0,010	0,747	0,788
	Húmeda	1	0,951	0,009	0,933	0,969
		2	0,899	0,009	0,880	0,918
		3	0,676	0,010	0,656	0,695
S. macrophylla	Seca	1	0,807	0,010	0,788	0,827
		2	0,738	0,010	0,717	0,759
		3	0,676	0,011	0,655	0,698
	Intermedia	1	0,796	0,010	0,776	0,816
		2	0,761	0,010	0,740	0,782
		3	0,741	0,011	0,720	0,763
	Húmeda	1	0,876	0,010	0,856	0,896
		2	0,835	0,010	0,814	0,856
		3	0,767	0,011	0,745	0,788

Tabla 3. Estadísticos descriptivos generales de la relación entre factores intra-sujetos e inter-sujetos de la variación de la densidad anhidra en dos especies de caoba, *S. mahagony* y *S. macrophylla*, en tres zonas de vida de la región La Sierra, República Dominicana.

Los promedios menores de densidad anhidra para las especies *S. mahagony* y *S. macrophylla* fueron 0,649 g/cm³ y 0,676 g/cm³, respectivamente, ambos observados en la ZV “seca” a una AR de 0,8. Los promedios mayores correspondientes fueron 0,951 g/cm³ y 0,876 g/cm³, ambos observados en la ZV “húmeda” a una AR de 0,1. *S. macrophylla* exhibe una tasa de crecimiento más rápida en comparación con la de *S. mahagony*. Esta tasa de

crecimiento ha sido reportada como responsable de variaciones en la densidad promedio del fuste de especies maderables (Djomo *et al.*, 2017). Las especies de crecimiento lento suelen exhibir madera más densa (Lamy *et al.*, 2012; Piispanen *et al.*, 2014; Lego *et al.*, 2018). Todos los promedios de densidad anhidra se visualizan conspicuamente la gráfica de perfil (Figura 3), en la que se incluye un panel para cada ZV y el eje de la abscisa identifica los tres niveles del factor intra-sujetos, AR.

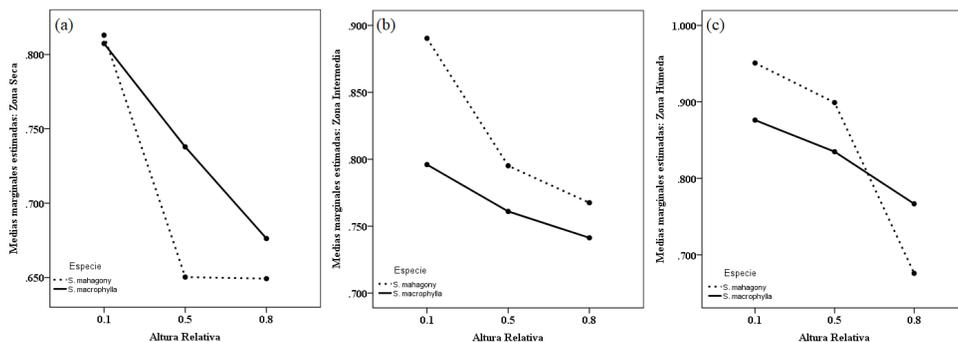


Figura 3. Promedios observados de la densidad anhidra para la combinación de los factores inter-sujetos, especie y ZV, y el factor intra-sujetos AR. Los paneles (a), (b) y (c) corresponden a las zonas de vida “seca”, “intermedia” y “húmeda”, respectivamente.

La interacción de tres vías definida por AR*Especie*ZV se puede visualizar mejor en el gráfico de promedios de los factores, como se muestra en la “Figura 3”. Para las tres zonas de vida, la densidad anhidra (DA) disminuye al aumentar la AR y las líneas que identifican a las especies no son paralelas. Esto sugiere un efecto de interacción. Para la ZV “seca” (panel a) las densidades de ambas especies son similares a AR 0,1. Sin embargo, a AR 0,5; la diferencia es sustancial y se nota que no hay diferencias para los promedios de densidad de *S. mahagoni* a AR 0,5 y 0,8. El panel (b) muestra diferencias sustanciales entre los promedios de densidad de ambas especies a AR 0,1 y porciones casi paralelas de las líneas entre AR 0,5 y 0,8. La DA es un factor que puede considerarse como ordenable en escala de medición y la especie es un factor cualitativo. Por lo tanto, la interacción en el panel (c) puede describirse como no ordinal porque las curvas de promedios se intersecan. La densidad es sensible a estímulos ambientales como el estrés por humedad (Auty *et al.*, 2014). Diferentes aspectos eco fisiológicos como las condiciones climáticas, bióticas, abióticas y edáficas son factores que interactúan afectando la densidad de la madera, y entre ellos, la humedad del suelo juega un papel importante controlándola (Nazarí *et al.*, 2020).

Los resultados bajo esfericidad asumida se presentan en la “Tabla 4”. Se incluye el factor intra-sujetos (AR) y sus interacciones con los factores inter-sujetos. Hay una interacción de tres vías estadísticamente significativa entre la AR, las especies y las zonas de vida, $F(2,102) = 15,419$, $Valor-P \leq 0,000$, $parcial n^2 = 0,377$. Las interacciones bidireccionales son estadísticamente significativas entre los factores inter-sujetos y el factor intra-sujetos.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
AR	0,579	2	0,289	301,067	0,000	0,855	602,134	1,000
AR * E	0,057	2	0,028	29,547	0,000	0,367	59,093	1,000
AR * ZV	0,111	4	0,028	28,916	0,000	0,531	115,662	1,000
AR * E * ZV	0,059	4	0,015	15,419	0,000	0,377	61,677	1,000
Error (AR)	0,098	102	0,001					

A: Origen; **B:** Suma de cuadrados Tipo III; **C:** grados de libertad; **D:** Cuadrático promedio; **E:** estadístico F; **F:** significancia estadística (nivel alfa = 0,05); **G:** Eta parcial al cuadrado; **H:** Parámetro de no centralidad; **I:** Potencia observada; AR = AR; E = Especie; ZV = ZV.

Tabla 4. Pruebas de efectos inter-sujetos para la variable dependiente densidad anhidra (DA) con esfericidad asumida. Se incluye el factor intra-sujetos (AR) y sus interacciones con los factores inter-sujetos.

Las interacciones bidireccionales simples de los factores inter-sujetos (Especie*ZV), evaluadas en los tres niveles del factor intra-sujetos (AR). fueron analizadas por separado mediante ANOVA de dos vías, considerando por separado los efectos de las interacciones inter-sujetos para cada uno de los tres niveles en AR. Debido a la corrección Bonferroni, la significancia estadística para estos tres efectos principales simples se declara con $Valor-P=0,05/3=0,016$.

A lo largo del árbol, la densidad promedio varió significativamente desde la base a la parte superior, mostrando una tendencia decreciente con la altura en el tallo, siendo este patrón previamente observado en estudios reportados por Auty *et al.* (2014); Djomo *et al.* (2017); y Lego *et al.* (2018). La madera juvenil se forma bajo la influencia de la corona viva y tiene menor resistencia y rigidez que la madera madura en la base del árbol (Auty *et al.*, 2014). Las porciones del tronco más recientes, como en la corona superior, tienen una densidad de madera más baja.

Hubo interacción bidireccional simple estadísticamente significativa entre los factores especie*ZV en los tres niveles de AR. En el nivel AR = 0,1, $F(2,51) = 11,512$; $Valor-P \leq 0,000$. En el nivel AR = 0,5, $F(2,51) = 30,890$; $Valor-P \leq 0,000$. En el nivel AR = 0,8, $F(2,51) = 16,229$; $Valor-P \leq 0,000$. Los términos de error para las tres interacciones bidireccionales simples son diferentes, (0,044; 0,049 y 0,052, respectivamente) al utilizar el error “restringido” en vez del “agrupado”. El término de error “restringido” es particularmente útil en esta situación al no cumplirse el supuesto de homogeneidad de las varianzas.

Procedimos a determinar si hay efectos principales simples estadísticamente significativos de la especie en cada nivel de ZV. Para la AR 0,1 hubo efectos principales simples estadísticamente significativos de las ZV “intermedia” y “húmeda” para las especies, con los resultados respectivos siguientes: $F(1,51) = 45,598$; $Valor-P \leq 0,000$; $F(1,51) = 37,791$; $Valor-P \leq 0,000$. y . Para la AR 0,5 hubo efectos principales simples estadísticamente significativos de las tres ZV, “seca”, “intermedia” y “húmeda” para las especies, con los resultados respectivos siguientes: $F(1,51) = 35558$; $Valor-P \leq 0,000$;

$F(1,51) = 5,679$; $Valor-P \leq 0,021$; y $F(1,51) = 21,077$; $Valor-P \leq 0,000$. Finalmente, para la AR 0,8 hubo un solo efecto principal simple estadísticamente significativo para la ZV, “húmeda”, con $F(1,51) = 39,834$; $Valor-P \leq 0,000$;

En la “Tabla 5” se reportan todas las comparaciones posibles (por pares) para efectos principales simples entre cada promedio de grupo. Las correcciones de Bonferroni se hicieron con comparaciones dentro de cada efecto principal simple. Se reportan los *Valores-P* ajustados.

AR	Zona	(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
							Límite inferior	Límite superior
0,1	Seca	mahagony	macrophylla	0,006	0,014	0,690	-0,022	0,033
	Intermedia	mahagony	macrophylla	0,094 [*]	0,014	0,000	0,067	0,122
	Húmeda	mahagony	macrophylla	0,075 [*]	0,013	0,000	0,048	0,101
0,5	Seca	mahagony	macrophylla	-0,088 [*]	0,015	0,000	-0,117	-0,058
	Intermedia	mahagony	macrophylla	0,034 [*]	0,014	0,021	0,005	0,063
	Húmeda	mahagony	macrophylla	0,064 [*]	0,014	0,000	0,036	0,092
0,8	Seca	mahagony	macrophylla	-0,027	0,015	0,080	-0,057	0,003
	Intermedia	mahagony	macrophylla	0,026	0,015	0,081	-0,003	0,056
	Húmeda	mahagony	macrophylla	-0,091 [*]	0,014	0,000	-0,120	-0,062

* = La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05; B = Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

Tabla 5. Reporte de todas las comparaciones posibles entre cada promedio de grupo, basadas en medias marginales estimadas.

La “Tabla 5” muestra que para la AR a 0,1 en los árboles, la densidad anhidra es estadísticamente significativa y mayor para *S. mahagony* en comparación con *S. macrophylla* en las ZV “intermedia” y “húmeda”. Las diferencias de promedios son respectivamente $(0,094 \pm 0,014) \text{ g/cm}^3$ y $(0,075 \pm 0,013) \text{ g/cm}^3$. El *Valor-P* correspondiente para cada una de estas diferencias de promedios es 0,000. Para el segundo nivel del factor inter-sujetos, AR a 0,5, la densidad anhidra es estadísticamente significativa y menor para *S. mahagony* en comparación con *S. macrophylla* en las ZV “seca”; y es estadísticamente significativa y mayor para las ZV “intermedia” y “húmeda”. Hay varias razones para esta variación, incluyendo las condiciones ambientales y los tratamientos silviculturales (Fernández y Cornejo, 2016). Las diferencias de medias son respectivamente $(-0,088 \pm 0,015) \text{ g/cm}^3$, $(0,034 \pm 0,014) \text{ g/cm}^3$ y $(0,064 \pm 0,014) \text{ g/cm}^3$. Los *Valores-P* correspondientes son, respectivamente, 0,000, 0,021 y 0,000. Finalmente, en el tercer nivel de la AR a 0,8, la densidad anhidra es estadísticamente significativa y menor para *S. mahagony* en comparación con *S. macrophylla* en la ZV “húmeda”, con una diferencia de medias de $(-0,91 \pm 0,014) \text{ g/cm}^3$, y un *Valor-P* de 0,000. Este patrón fue consistente con lo reportado

por Fajardo (2018) estudiando la especie *Nothofagus pumilio* en La Patagonia. El rango máximo en la gravedad específica que relaciona la masa anhidra de la madera y su volumen con humedad igual o mayor a 30%, reportada por Koehler (2017) para el género *Swietenia* de 0,344 a 0,903 g/cm³.

DESARROLLO DEL MODELO DE REGRESIÓN

La “Tabla 6” muestra los resultados del enfoque de análisis de regresión correspondiente al análisis de la varianza en términos del modelo de efectos de los factores. Para ilustrar, se incluyen los parámetros estimados para este enfoque que utiliza de manera independiente el factor intra-sujetos (AR) para predecir la densidad anhidra en cada uno de sus niveles para la especie *S. mahagony*, considerando la necesidad de discriminar por especie y ZV. La función de regresión ajustada para el modelo de regresión “completo”, cuando la AR es 0,5 es (Ec. 7):

$$Y_{ijk} = 0,780 + 0,002 X_{ijk1} - 0,086 X_{ijk2} - 0,002 X_{ijk3} - 0,046 X_{ijk1}X_{ijk2} + 0,015 X_{ijk1}X_{ijk3} \quad [7]$$

Los valores ajustados para el modelo “completo” son equivalente a los promedios estimados de la combinación de factores inter-sujetos. Las codificaciones para el primer árbol de la especie *S. mahagony* en la zona “seca” ($i = 1, j = 1, k = 1$) son: $X_1 = 1, X_2 = 1$ y $X_3 = 0$, de modo que los productos cruzados $X_1X_2 = 1$ y $X_1X_3 = 0$. La gran media en este caso es $\mu... = \bar{Y} = 0,835$ Las estimaciones de los coeficientes de regresión necesarios son:

$$\alpha_1 = 0,064; \beta_1 = -0,097; \beta_2 = -0,074; (\alpha\beta)_{11} = -0,152; \text{ y } (\alpha\beta)_{12} = 0,117.$$

Para la primera observación ($k = 1$) en los niveles $i = 1, j = 1$ de los factores A (Especie) y B (ZV), respectivamente tenemos la función de regresión ajustada (Ec. 8):

$$\hat{Y}_{111} = 0,835 + 0,064 (1) - 0,097 (1) - 0,074 (0) - 0,152 (1) + 0,117 (0) \quad [8]$$

En el caso de la observación (árbol) ($k = 4$) en los niveles $i = 2, j = 3$, las codificaciones para este árbol de la especie *S. macrophylla* en la zona “húmeda” son: $X_1 = -1, X_2 = -1$ y $X_3 = -1$, de modo que los productos cruzados $X_1X_2 = 1$ y $X_1X_3 = 1$. La función de regresión ajustada es (Ec. 9):

$$\hat{Y}_{234} = 0,835 + 0,064 (-1) - 0,097 (-1) - 0,074 (-1) - 0,152 (1) + 0,117 (1) \quad [9]$$

Parámetro	Efecto	DA a 0,1 AR				DA a 0,5 AR				DA a 0,8 AR			
		B	Error estándar	t	Sig.	B	Error estándar	t	Sig.	B	Error estándar	t	Sig.
Intercepción	$\mu...$	0,876	0,010	89,23	0,000	0,835	0,010	80,42	0,000	0,767	0,011	71,73	0,000
S. mahagoni	α_1	0,075	0,013	5,64	0,000	0,064	0,014	4,59	0,000	-0,091	0,014	-6,31	0,000
Zona Seca	β_1	-0,069	0,014	-4,95	0,000	-0,097	0,015	-6,61	0,000	-0,091	0,015	-5,99	0,000
Zona Intermedia	β_2	-0,080	0,014	-5,77	0,000	-0,074	0,015	-5,03	0,000	-0,025	0,015	-1,68	0,098
S. mahagoni * Zona Seca	$(\alpha\beta)_{11}$	-0,069	0,019	-3,60	0,001	-0,152	0,020	-7,48	0,000	0,064	0,021	3,06	0,004
S. mahagoni * Zona Intermedia	$(\alpha\beta)_{12}$	0,020	0,019	1,04	0,303	0,117	0,021	5,69	0,000	0,117	0,021	5,69	0,000

B = Coeficientes; t = estadístico; Sig. = significancia estadística.

Tabla 6. Parámetros estimados mediante el enfoque de regresión, para medidas repetidas de la ANOVA mixta de la variable dependiente densidad anhidra a AR 0,1; 0,5 y 0,8.

CONCLUSIONES

La densidad promedio de un tronco de árbol se ve afectada por muchos factores, como las especies de árboles, la ubicación geográfica y otros factores ambientales, la edad de los árboles, la tasa de crecimiento y los factores genéticos. El ANOVA mixto de tres vías muestra una interacción a tres vías estadísticamente significativa entre especie, ZV, y AR, $F(2,102) = 15,419$, $Valor-P \leq 0,000$; parcial $\eta^2 = 0,377$. La significación estadística de las tres interacciones bidireccionales simples fue aceptada en un nivel alfa ajustado por Bonferroni de 0,016. Hubo interacción bidireccional simple estadísticamente significativa entre los factores especie*ZV en los tres niveles de AR. En el nivel AR = 0,1; $F(2,51) = 11,512$, $Valor-P \leq 0,000$; . En el nivel AR = 0,5; $F(2,51) = 30,890$, $Valor-P \leq 0,000$; . En el nivel AR = 0,8; $F(2,51) = 16,229$, $Valor-P \leq 0,000$. Siete de los nueve efectos principales simples fueron estadísticamente significativos en las pruebas univariadas de los efectos inter-sujetos. Todas las comparaciones por pares se realizaron para efectos principales simples y 7 fueron estadísticamente significativas.

Las variaciones estadísticamente significativas pueden atribuirse a los factores inter-sujetos, “especies”, y “zonas de vida” son inmutables, mientras que el efecto de la AR puede cambiar en la medida que los árboles crezcan en altura. Los resultados del estadístico Eta Cuadrado Parcial indican que el efecto de la variable intra-sujetos AR en la variabilidad de la densidad anhidra de los árboles de caoba fue el mayor ($\eta^2 = 0,855$), seguido del efecto de la interacción AR*ZV ($\eta^2 = 0,531$). En tercer lugar, encontramos el efecto de la interacción de los tres factores ($\eta^2 = 0,377$) y por último el efecto de la interacción AR*Especie ($\eta^2 = 0,367$). Las reglas básicas generales son: Estos resultados son consistentes con lo reportado por Sarmiento *et al.* (2011) para árboles en Guayana Francesa en lo que respecta a las diferencias e interacciones a nivel de familia que en su estudio representaron más del 40% de la varianza total.

Entre las especies, la densidad anhidra fue mayor para *S. mahagoni* que para *S. macrophylla*, con una diferencia de promedios de $(0,010 \pm 0,005)$ g/cm³. La densidad anhidra fue menor en la ZV seca que en las demás zonas con una diferencia de medias con respecto a la ZV “intermedia” $(-0,070 \pm 0,006)$ g/cm³, y comparada a la ZV “húmeda” de $(-0,112 \pm 0,006)$ g/cm³. La diferencia de promedios entre la zona “intermedia” y la “húmeda” fue de $(-0,042 \pm 0,006)$ g/cm³. De manera que la densidad anhidra disminuyó con el aumento del contenido de humedad en las zonas. Para todos los árboles, la gravedad anhidra disminuyó a medidas que aumento la AR. Las diferencias de medias entre 0,1; 0,5 y 0,8 fueron $(0,076 \pm 0,005)$ g/cm³ y $(0,143 \pm 0,006)$ g/cm³, respectivamente. Las diferencia de medias entre 0,5 y 0,8 fue de $(0,067 \pm 0,006)$ g/cm³.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado financieramente por el Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología a través de su programa FONDOCyT, en la República Dominicana. La Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra (PUCMM) proporcionó acceso al laboratorio y apoyo administrativo. Plan Sierra, Inc. apoyó a través de la adquisición de materiales, la recopilación de datos y el personal de campo. Reconocemos el esfuerzo y aporte realizado por los departamentos de compras y el personal administrativo de la Vicerrectoría de Investigación e Innovación de la PUCMM.

REFERENCIAS

- Anoop, E.; Jijeesh, V.; Sindhumathi, C.M.; Jayasree, C.E. 2014. Wood physical, Anatomical and Mechanical properties of Big Leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* Roxb) a potential exotic for South India. *Res J Agric For Sci* 2(8), 7-13, http://www.isca.in/AGRI_FORESTRY/Archive/v2/i8/2.ISCA-RJAFS-2014-037.pdf.
- Auty, D.; Achim, A.; Macdonald, E.; Cameron, A.D.; Gardiner, B.A. 2014. Models for predicting wood density variation in Scots pine. *Forestry* 2014; 87, 449–458. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu005>.
- Bonferroni, C.E. 1936. *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità*, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. <https://dx.doi.org/10.4135/9781412961288.n455>.
- Bueno-López, S. W. 2009. *Understanding Growth and Yield of Pinus occidentalis in La Sierra, Dominican Republic*. State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. 286 pp. <https://www.proquest.com/openview/acf95dc01d6081728567d781349590c1/1.pdf?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>.
- De Almeida, T.H.; De Almeida, D.H.; Christoforo, A.L.; Panzera, T.H.; Oliveira P.R.; Lahr, F.A.R. 2019. New analytical approach for estimating density of Brazilian tropical woods based on fundamental concepts. *Sci For Piracicaba* 47, 686-695. <https://www.ipef.br/.../cap10.pdf>.
- Djomo, A.N.; Ngoukwa, G.; Zapfack, L.; Chimi, C.D. 2017. Variation of wood density in tropical rainforest trees. *J For* 4(2), 16-26. <https://doi.org/10.18488/journal.101.2017.42.16.26>.
- Elliott, A.C.; Woodward, W.A. 2007. *Statistical analysis quick reference guidebook with SPSS examples*. 1st ed. London: Sage Publications. <https://dx.doi.org/10.4135/9781412985949>.
- Fajardo, A. 2018. Insights into intraspecific wood density variation and its relationship to growth, height and elevation in a tree line species. *Plant Bio* 20(3), 456-464. <https://doi.org/10.1111/plb.12701>.
- Fernández, M.P.; Cornejo, B. 2016. Is the first flowering event and corresponding maturity phase in trees related to radial wood density changes? *Trees* 30:859–870. <https://www.proquest.com/openview/ad46ceb7695f26e6033d87ad74feb89b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=326291>.
- Holdridge, L.R. 1987. *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 415 pp. <https://repositorio.ica.int/handle/11324/7936>.

IBM Corp. (2017). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Released 2017. Armonk, NY: IBM Corp.

Kimberley, M.O.; Cown, D.J.; McKinley, R.B.; Moore, J.R.; Dowling, L.J. 2015. Modelling variation in wood density within and among trees in stands of New Zealand-grown radiata pine. *N Z J For Sci* 45:22. <https://nzjforestryscience.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s40490-015-0053-8.pdf>.

Kimberley, M.O.; McKinley, R.B.; Cown, D.J.; Moore, J.R. 2017. Modelling the variation in wood density of New Zealand-grown Douglas-fir. *N Z J For Sci* 47:15. <https://nzjforestryscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40490-017-0096-0>.

Koehler, A. 2017. *The identification of true mahogany, Certain So-Called Mahoganies, and Some Common Substitutes* (Classic Reprint). Bul. 1050. U.S. Department of Agriculture., Govt. Print. Off., Washington. 18 pp. <https://ccn.loc.gov/agr22000569>.

Kutner, M.H.; Nachtsheim, C.J.; Neter, J.K.; Li, W. 2005. *Applied Linear Regression Models*. 5th Edition. McGraw-Hill/Irwin, The McGraw-Hill Companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York, NY, 10020. ISBN 0-07-238688-6.

Lamy, J.B.; Lagane, F.; Plomion, C.; Cochard, H.; Delzon, S. 2012. Micro-evolutionary patterns of juvenile wood density in a pine species. *Plant Ecol* 213, 1781–1792. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11258-012-0133-2>.

Lego, K.; Sharma, C.L.; Sharma, M. 2018. Axial Variation of Wood Density in *Pinus merkusii* Jungh. y de Vriese. *J Tree Sci* 37(1), 1-10. <https://indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ts&volume=37&issue=1&article=001>.

Levene, H. 1960. *Robust tests for equality of variances*. In Ingram Olkin; Harold Hotelling (eds.). *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press. 278–292 pp. <https://www.jstor.org/stable/2285659>.

Longi, E.L.; Galao, A.T.D.; Rajput, K.S.; De Melo, A.C.G. 2018. Anatomical investigation of root, stem and branch wood in 10-year-old *Inga laurina* in the context of anatomical adaptation to hydraulic and mechanical stresses. *Ann Bio* 40, 31-39. <https://www.semanticscholar.org/paper/Anatomical-investigation-of-root%2C-stem-and-branch-Longui-Gal%C3%A3o/7e1e1cb9f5729ddbc2a9647378208e78c138e3c3>.

Mauchly, J. W. 1940. Significance Test for Sphericity of a Normal n-Variate Distribution. *The Ann Math Stat* 11(2), 204-209. <https://www.jstor.org/stable/2235878>.

Nazari, N.; Bahmani, M.; Kahyani, S.; Humar, M.; Koch, G. 2020. Geographic Variations of the Wood Density and Fiber Dimensions of the Persian Oak Wood. *Forests* 11(9), 1003. <https://doi.org/10.3390/f11091003>.

Piispanen, R.; Heinonen, J.; Valkonen, S.; Mäkinen, H.; Lundqvist, S.O.; Saranpää, P. 2014. Wood density of Norway spruce in uneven-aged stands. *Can J For Res* 44(2), 136-144. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2013-0201>.

Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.

Schimleck, L.; Antony, F.; Dahlen, J.; Moore, J. 2018. Wood and Fiber Quality of Plantation-Grown Conifers: A Summary of Research with an Emphasis on Loblolly and Radiata Pine. *Forests* 9, 298; <https://doi:10.3390/f9060298>.

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *PELTOPHORUM DUBIUM* ((SPRENG.) TAUB.) SOB ESTRESSE HÍDRICO

Data de aceite: 02/05/2024

Luiz Fernando Rodrigues de Almeida

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais,
IFNMG
Salinas - MG

Tiago Reis Dutra

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais,
IFNMG
Salinas - MG

Marília Dutra Massad

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais,
IFNMG
Salinas - MG

RESUMO: Para o sucesso na germinação de uma semente alguns fatores ambientais necessitam de condições favoráveis, por exemplo, luz, temperatura, oxigênio, dormência da semente e principalmente a disponibilidade de água. Uma das principais causas da diminuição da porcentagem de germinação das sementes é o estresse hídrico. Na fase inicial da germinação ocorre um processo chamado de embebição, onde acontece à captação da água, hidratação dos tecidos e estimulação das

atividades metabólicas, que são essenciais para retomada do crescimento do eixo embrionário, sendo crucial não somente na fase inicial, mas durante toda a vida da planta. Nesse contexto, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a germinação de sementes da espécie canafístula submetidas ao estresse hídrico por meio do uso do polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, sendo estudado o efeito do estresse hídrico por meio do PEG 6000 em sete níveis de potenciais osmóticos (0,0; -0,3; -0,6; -0,9; -1,2; -1,5 e -1,8 Mpa). Foram avaliadas a Taxa de Germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo Médio de Germinação (TMG). De modo geral, devido à diminuição no potencial osmótico do meio, a germinação de *Peltophorum dubium* foram afetadas negativamente. Em potenciais osmóticos superiores -0,6 MPa, o nível de dano foi severo de maneira que não houve germinação.

PALAVRAS-CHAVE: Canafístula, deficiência hídrica, PEG 6000, soluções osmóticas.

INTRODUÇÃO

O regime hídrico na natureza é estabelecido pela intensidade e distribuição das chuvas, apresentando interferência direta desde o crescimento e a produtividade das plantas até a distribuição das populações e a diversidade vegetal dos ecossistemas (FAN; NEUMANN, 2004).

Para o desenvolvimento da planta a água é extremamente importante, pois ela participa de diversos processos fisiológicos, entre eles, o processo fotoquímico da fotossíntese, no transporte e absorção de nutrientes, tornando-se extremamente necessária para o desenvolvimento dos vegetais. Composto cerca de 90 a 95% da biomassa verde das plantas ela é considerada algo fundamental para constituição vegetal, sendo importante para manutenção funcional dos tecidos e organismos (TAIZ; ZEIGER, 2009; CHAVARRIA; SANTOS, 2012).

Segundo Feng *et al.* (2016), plantas quando submetida à falta de água manifesta características únicas na sua forma de percepção desse fator de estresse, que são capazes de modular por meio das características de tolerância à seca pertencente a cada espécie. Quando em restrição hídrica, células individuais de um órgão apresentam mudanças no volume, seguido de variações na água e no potencial osmótico.

Um dos maiores estresses ambientais ocorre devido à deficiência hídrica, ficando evidente no crescimento e na produtividade vegetal, prejudicando em maiores proporções em relação a todos os outros estresses combinados no qual pode ser notado em diversos locais, até mesmos em regiões úmidas (RAMPIONO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2003).

O período em que o déficit hídrico é mais evidente e melhor observado é no período da seca, onde a água que se encontra no solo não consegue suprir a necessidade da planta, restringindo suas atividades fisiológicas resultando em plantas menos desenvolvidas e até mesmo levando a morte caso essa restrição seja de forma prolongada (CAVALCANTE *et al.*, 2009).

Na germinação existem duas fases consideradas as principais: a fase física que está ligada à embebição da água pelas sementes, e a segunda onde ocorre as atividades metabólicas que levam à protrusão da radícula (NONOGAKI *et al.*, 2010). No processo de embebição acontece a reativação de organelas e macromoléculas que já existem, e na sequência a fase de crescimento e divisão celular (ADEPOJU *et al.*, 2017).

Segundo Carvalho e Nakagawa (1983), a água assume um papel de suma importância na germinação, já que ela é responsável por diversas ativações metabólicas. Bewley e Black (1985) destacam ainda que diferentes etapas da germinação são definidas pelo sucesso ou insucesso no processo de embebição das sementes.

Soluções osmóticas vêm sendo utilizadas para simular ambientes com baixa quantidade de água, dependendo do soluto utilizado pode haver variação no efeito final. Dentre estes, o PEG 6000 (Polietilenoglicol 6000) tem resultados satisfatórios, pois simulam baixos potenciais hídrico, é inerte, atóxico para as sementes, reproduzindo a seca sem ter o risco de ser absorvido pelas sementes (VILLELA *et al.*, 1991).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico proporcionado pelo uso do polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), em diferentes potenciais, sob a germinação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes e Propagação de Espécies Florestais do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG) Campus Salinas.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, sendo estudado o efeito do estresse hídrico por meio do PEG 6000 em sete níveis de potenciais osmóticos (0,0; -0,3; -0,6; -0,9; -1,2; -1,5 e -1,8 Mpa), na germinação de sementes da espécie *Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert).

As sementes de canafístula foram coletadas em quatro árvores matrizes, localizadas no município de Salinas-MG.

As soluções de PEG 6000 (potenciais osmóticos: 0,0; -0,3; -0,6; 0,9; -1,2; -1,5 e -1,8 MPa) foram preparados de acordo com a fórmula de Vant' Hoff:

$$\Psi_{\text{osm}} = -RTC$$

Onde:

Ψ_{osm} - potencial osmótico (atmosfera);

R - constante geral dos gases = 0,082 atm L/mol/°k;

T - temperatura (°k);

C - concentração molal (mols de soluto/1000 g de água).

No sentido de superar a dormência tegumentar das sementes de canafístula, as mesmas foram imersas em água quente (95 °C) e em seguida deixadas em repouso afastadas do aquecimento, por um período de 24 horas, à temperatura de 25 °C (DUTRA *et al.*, 2013).

Posteriormente as sementes passaram por um processo de higienização em hipoclorito de sódio (2%) por três minutos, logo depois semeadas, seguindo um espaçamento equidistante, sobre três folhas de papel Germitest®, tendo duas como base e uma para cobrir, umedecidas com correspondente a 2,5 vezes o peso do papel seco com a solução de PEG 6000 relatada anteriormente. Logo em seguida, os papéis foram enrolados e embalados em sacos plásticos transparentes, onde os mesmos foram vedados a fim de minimizar a perda de umidade, e condicionados em incubadora do tipo BOD à temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas durante período de 28 dias.

Foram avaliados a percentagem de germinação (%); índice de velocidade germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG).

Avaliou-se diariamente, sempre no mesmo horário o número de sementes germinadas, empregando como critério de germinação as sementes que emitiram raiz primária (BRASIL, 2009). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi definido de acordo com o método apresentado por Maguire (1962), o tempo médio de germinação (TMG), segundo a fórmula proposta por Laboriau (1983), expressando os resultados em dias após a semeadura.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao ser constatada a significância pelo teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade por meio do pacote ExpDesp.pt versão 1.2.2 (FERREIRA *et al.*, 2021) do software livre R versão 4.1.2 (RCORE TEAM, 2021), com apoio da plataforma R Studio versão 1.1.463 (RSTUDIO, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a capacidade germinativa das sementes de canafístula foi afetada negativamente conforme submetidas a potenciais hídricos inferiores (Tabela 1).

Potencial Osmótico (MPa)	Germinação (%)		IVG		TMG (Dias)	
0,0	34	A	1,03	A	2,70	A
-0,3	29	A	0,80	A	2,26	A
-0,6	35	A	0,75	A	3,08	A
-0,9	0	B	0	B	0	B
-1,2	0	B	0	B	0	B
-1,5	0	B	0	B	0	B
-1,8	0	B	0	B	0	B

Tabela 1. Porcentagem de Germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Massa Seca Total.

Observando-se a influência dos potenciais osmóticos na taxa de germinação, notou-se que quando submetidas a potenciais osmóticos até -0,6 Mpa não houve interferência, ou seja, a germinação ocorreu normalmente sem maiores danos (Tabela 1), no entanto, quando submetidas a potenciais osmóticos inferiores ficou evidente o quanto são prejudiciais à espécie em estudo.

Conforme Bewley e Black (1994), nem todas as sementes mostram ter a qualidades fisiológicas iguais, isso implica em uma maior distribuição da germinação no tempo em resposta às condições de estresse hídrico. Com isso, em condições naturais, pode ocorrer um aumento da probabilidade das plântulas acharem condições mais adequadas para se estabelecer e desenvolver-se. Ainda segundo esses autores, a diminuição da atividade enzimática perante condições de umidade menor que o mínimo necessário, é uma das principais causas da redução da taxa de germinação e da velocidade em que acontece o processo.

Segundo Àvila *et al.* (2007) quando muito baixo o potencial hídrico, em especial na fase inicial, as sementes tem sua absorção de água prejudicada, sendo capaz de impossibilitar as fases de indução de crescimento e desenvolvimento do eixo embrionário.

As variáveis índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) apresentaram resposta semelhante aos potenciais osmóticos avaliados (Tabela 1). Os tratamentos 0,0; -0,3 e -0,6 MPa apresentaram médias estatísticas iguais e superiores aos demais.

Assim como foi observado para o percentual de germinação, as variáveis IVG e TMG obtiveram valores nulos nos potenciais osmóticos de -0,9; -1,2; -1,5 e -1,8 Mpa (Tabela 1).

Segundo Farooq *et al.*, (2009) o estresse hídrico em sementes pode ser percebido de diversas formas, sendo a redução da velocidade de germinação e da taxa de absorção da água um dos principais sinais, em consequência disso o processo germinativo é afetado, causando um aumento no tempo médio de germinação.

Inicialmente, devido ao aumento do estresse ambiental, acontece um decréscimo na velocidade de germinação e só posteriormente a porcentagem de germinação das sementes é afetada (HEYDECKER., 1977).

Quanto ao tempo médio de germinação, uma possível explicação para os valores nulos observados nos três menores potenciais osmóticos avaliados (Tabela 1) pode ser associado ao relatado por Bewley (1997). Segundo os autores, devido à diminuição do potencial osmótico, acontece a diminuição do grau de variação entre semente e substrato, fazendo com que a taxa de absorção de água diminua, onde dessa forma, eleva-se o tempo que a semente necessita para alcançar o nível crítico no processo germinativo, estendendo o mesmo.

CONCLUSÕES

A germinação de sementes de canafístula foi afetada negativamente pela diminuição do potencial osmótico do meio, sendo severamente afetada em potenciais osmóticos inferiores à -0,6 Mpa.

REFERÊNCIAS

ADEPOJU, A. F.; ADENUGA, O. O.; MAPAYI, E. F.; OLANIYI, O. O.; ADEPOJU, F. A. Café: botânica, distribuição, diversidade, composição química e sua gestão. **Journal Agriculture and Veterinary Science**, v. 10, p. 57-62, 2017.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 98-106, 2007.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell** 9: 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds – physiology of development and germination**. Plenum Press. New York. 275p., 1994.

BRASIL - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: RAS, 399p., 2009.

CARVALHO, M. N.; NAKAGAMA, J. **Sementes: tecnologia da produção**. 2. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 1983. 426 p.

CAVALCANTE, A. C. R., CAVALLINI, M. C.; Limar, N. R. C. B. Estresse por déficit hídrico em plantas forrageiras. **Documentos/Embrapa Caprinos, SobralCE**. 50p., 2009.

- CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P. Plant water relations: absorption, transport and control mechanisms. In: MONTANARO, G.; DICHIO, B. (Org.). **Advances in selected plant physiology aspects**. Rijeka: Intech, v. 1, p. 105-132, 2012.
- DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; SARMENTO, M.F.Q.; OLIVEIRA, J.C. Substratos alternativos e métodos de quebra de dormência para produção de mudas de canafístula. **Revista Cere s**, v. 60, n.1, p. 072-078, 2013.
- FAN, L.; NEUMANN, P. M. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. **Plant Physiology**, n. 135, p. 2291-2300, 2004.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, n. 1, p. 135– 212, 2009.
- FENG, W.; LINDNER, H.; ROBBINS, N. E.; DINNENYA, JR. Crescimento do Estresse: O papel do controle do crescimento celular e orgânico em respostas de estresse hídrico em plantas. **A Célula Vegetal**, v. 28, p. 1769-1782, 2016.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **Expdes.Pt: Experimental Designs Package R Package Version (1.2.2)**. 2021. Disponível Em: [Http://Cran.Rproject.Org/Web/Packages/Expdes/Index.Html](http://Cran.Rproject.Org/Web/Packages/Expdes/Index.Html).
- HEYDECKER, W. Stress and seed germination: an agronomic view. In: KHAN, A.A. **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. New York: North Holland Publishing, p. 237-282, 1977.
- LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983. 171 p.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germinação - Ainda é um mistério. **Plant Science**, v. 179, p. 574-581, 2010.
- RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant Cell Environ**, v. 29, n. 12, p. 2143–2152, 2006.
- R CORE TEAM (2021). R: A Language And Environment For Statistical Computing. **R Foundation For Statistical Computing**. Vienna, Austria. URL [Https://Www.R-Project.Org/](https://Www.R-Project.Org/).
- RSTUDIO TEAM (2019). **Rstudio: Integrated Development For R**. Rstudio, Inc., Boston, MA URL [Http://Www.Rstudio.com/](http://Www.Rstudio.com/).
- TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª Ed., Artmed, Porto Alegre, 848 p., 2009.
- VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 1957–1968, 1991.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 01, p. 1-14, 2003.

MÉTODO DE PROVAS BIOQUÍMICAS PARA BACTÉRIAS GRAM POSITIVO DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS* E *ENTEROCOCCUS*

Data de submissão: 07/03/2024

Data de aceite: 02/05/2024

Franky Willa Ferreira de Abreu

Centro Universitário Luterano de Palmas
Palmas-TO

Ernane Gerre Pereira Bastos

Centro Universitário Luterano de Palmas
Palmas-TO

RESUMO: Existem microrganismos com grande potencial infeccioso em todos os ambientes, hoje já sabemos que muitos deles compõem a microbiota humana, mas vivem em simbiose ou relação mútua. Por outro lado, a condição fisiológica do hospedeiro quando são comprometidas podem acarretar um desequilíbrio dessa relação, e os mesmos microrganismos podem levar a uma condição patológica. Diante disso, através de um projeto prático laboratorial esse trabalho tem como objetivo de desenvolver um método de prova bioquímica para bactérias Gram positiva do gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus* em microplacas. Usando como base as provas da Uréia, Lactose, Glicose, Maltose, Sarcrose e Frutose. O trabalho teve resultado relevante devido verificar resultados positivos na inoculação das cepas bacterianas dentro das microplacas, ocorrendo viragem de cor possibilitando uma possível identificação bacteriana. Concluindo

assim que a utilização desse método de prova bioquímica e de grande eficácia para bactérias Gram positiva, além de diminuir os gastos do laboratório, também auxilia na praticidade dentro do laboratório, vendo que em uma única placa pode se fazer várias provas e de vários pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias Gram-Negativas, Bactérias Gram-Positivas, Uréia, Reações Bioquímicas.

METHOD OF BIOCHEMICAL TESTS FOR GRAM POSITIVE BACTERIA OF THE GENUS *STAPHYLOCOCCUS* AND *ENTEROCOCCUS*

ABSTRACT: There are microorganisms with great infectious potential in all environments, today we already know that many of them make up the human microbiota, but they live in symbiosis or mutual relationship. On the other hand, the physiological condition of the host, when compromised, can lead to an imbalance in this relationship, and the same microorganisms can lead to a pathological condition. Therefore, through a practical laboratory project, this work aims to develop a biochemical test method for Gram positive bacteria of the genus *Staphylococcus* and *Enterococcus* in microplates. Using

as a basis the tests of Urea, Lactose, Glucose, Maltose, Sarcose and Fructose. The work had a relevant result due to the verification of positive results in the inoculation of bacterial strains inside the microplates, with a color change allowing a possible bacterial identification. Concluding that the use of this highly effective biochemical test method for Gram positive bacteria, in addition to reducing laboratory costs, also helps in practicality within the laboratory, seeing that a single plate can be used for several tests and for several patients.

KEYWORDS: Gram-Negative Bacteria, Gram-Positive Bacteria, Urea, Biochemical Reactions.

Os microrganismos estão presentes em todos os lugares, interna e externamente no corpo, no meio ambiente, nos objetos etc. Algumas bactérias são benéficas para seu hospedeiro, outras são patogênicas causando graves doenças. As infecções bacterianas ocupam lugar de destaque nas patologias humanas, as do trato urinário surgem em segundo lugar logo após as infecções respiratórias (ROCHA et al., 2018).

A maioria dos laboratórios utiliza, como rotina para identificação desses microrganismos, o método manual, baseado em compostos bioquímicos como glicose, lactose, sacarose, citrato, ornitina, lisina, sulfato de hidrogênio, ureia, fenilalanina, entre outros, incorporados a meios contendo ágar (NETO et al., 2012).

A identificação bacteriana baseia-se nas características morfológicas das células da bactéria, nas características culturais, fisiológicas, sorológicas, ação patogênica e características moleculares. A forma da bactéria, observada ao microscópio após coloração diferencial, a forma da colônia obtida após cultura em meio sólido apropriado, a capacidade de metabolização de substratos particulares, são alguns dos indicadores utilizados na identificação de uma bactéria (ROCHA et al., 2018)

O isolamento e a identificação dessas bactérias nos pacientes auxiliam no tratamento uma vez que doenças infecciosas causadas por bactérias apresentam diferentes cursos e consequências. Testar a susceptibilidade de isolados clínicos a antibióticos, ou seja, estabelecer a concentração inibitória mínima pode ajudar na seleção de antibióticos para a terapia.

Do ponto de vista epidemiológico, os cocos Gram-positivos têm emergido como os principais agentes infecciosos, estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras biológicas humanas em laboratórios de microbiologia. Destacando-se os *Staphylococcus aureus*, os estafilococos coagulase-negativos (ECN) e os enterococos. A detecção de patógenos bacterianos é considerada um indicador da disseminação de um processo infeccioso e tem sido reconhecida como um importante recurso diagnóstico. Conhecer as bactérias mais frequentes e o seu perfil de suscetibilidade são essenciais ao direcionamento apropriado da terapia antimicrobiana nos pacientes (LEÃO et al., 2007).

Como método auxiliar de identificação pode ser empregado a prova da catalase, sendo este um não produtor da enzima. A ausência da produção de catalase é uma importante forma de diferenciar gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Onde também são empregados as provas da coagulase, que serve para diferenciar *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus coagulase negativa*. E também o Teste de Sensibilização à Novobiocina (CASTRO et al., 2019).

Trazendo como base a metodologia de provas bioquímicas em microplacas, esse

estudo visa um método de provas bioquímicas para bactérias Gram positivas que ainda não é utilizado no Brasil. Sendo assim, visando melhorar a identificação dessas bactérias e o tratamento bacteriano do paciente, diminuindo os gastos e aumentando o fluxo, possibilitando uma maior análise de pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O inóculo inicial foi feito nos meios Ágar Cled e Manitol para dar início ao crescimento das bactérias que serão usadas no estudo, onde após o seu preparo utilizando uma alça de 10ul, os meios foram semeados e levados à estufa por 24 horas a $35 \pm 2 \text{ C}^\circ$.

Teve início ao preparo inicial de solução a base de Uréia, Lactose, Glicose, Maltose, Sacarose e Frutose, onde após o seu preparo tiveram que passar por um controle qualidade para verificar se não houve contaminação, e se as provas estão propícias para prosseguir com o projeto.

Foi iniciado o preparo da solução base, onde foram utilizados 150 ml de água deionizada, 50 ml de cloreto de sódio e 3,2g de caldo de vermelho de fenol. Em seguida foi acrescentado os açúcares; 5ml Uréia 40%; 2,6g Lactose; 5g Glicose; 5g Frutose; 5g Maltose; 5g Sacarose, que foram aquecidos no agitador magnético por 15 minutos, ou até verificar fervura. Logo após os meios tiveram que ser autoclavados por 15 minutos a $120 \text{ }^\circ \text{C}$. Que por sua vez foram distribuídos em tubos de ensaio e ficaram em temperatura ambiente.

Após o preparo das provas, foi adicionado 200 ul de cada solução dentro dos poços da microplaca, tanto para as bactérias, quanto para o controle, onde em seguida foram devidamente identificados. Em seguida, foi acrescentado em cada poço 5 ul de solução da bactéria do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

Seguindo o esquema abaixo, a placa foi incubada por 24h a $35 \pm 2 \text{ C}^\circ$. Sendo assim, é possível verificar se houve reação positiva ou negativa das bactérias dentro das provas preparadas.

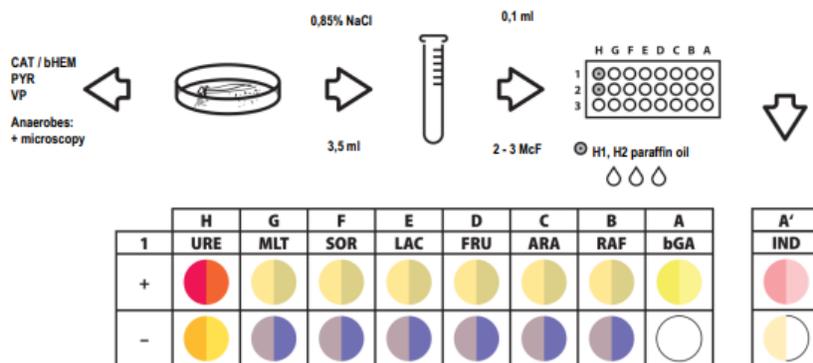


Imagem 1: Esquema do preparo do inóculo dentro da microplaca

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas inicialmente classificadas no gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram submetidas às análises fisiológicas e bioquímicas para a confirmação das bactérias utilizadas, compreendido pelos testes de catalase, coagulase e sensibilidade à novobiocina.

A glicólise é o conjunto de reações iniciais da degradação da glicose, semelhante em todos os tipos de fermentação e na respiração. Fermentação é um processo anaeróbio utilizado pelas bactérias e por leveduras para obter energia. Neste processo não há uso de O₂ ou outro aceptor final de elétrons inorgânico, descritos na respiração aeróbia e anaeróbia, respectivamente. Ao se analisar essa prova bioquímica, verificamos se houve fermentação da glicose, o que traz consigo uma viragem de cor para o amarelo, demonstrando que a bactéria metaboliza o açúcar. (CARDOSO et al., 2016).

A fermentação láctica é realizada de maneira exclusiva por bactérias, especificamente por lactobacilos, ocorre quando a glicólise tem como principal mediador a glicose ou a galactose, obtida a partir da quebra de uma molécula de lactose (açúcar presente no leite). Semelhante à prova da Glicólise, a fermentação da Lactose se dá positivo através da viragem de cor para o amarelo (CAMARGO, Stefanie 2020).

A frutose pode ser anaeróbicamente fermentada por fungos ou por bactérias. As enzimas de bactérias convertem açúcar (glicose ou frutose) a etanol e dióxido de carbono. O dióxido de carbono liberado durante a fermentação permanece dissolvido na água, onde alcançará o equilíbrio com o ácido carbônico, a não ser que a câmara de fermentação seja deixada aberta (CAMARGO, Stefanie 2020).

A Maltose é um carboidrato (glicídio ou açúcar), molécula orgânica formada por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A sua reação é verificada através da viragem de cor como os demais açúcares (CARDOSO et al., 2016).

A prova da Uréia determina a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease. Em caso de reação positiva irá ocorrer a alcalinização do meio para um rosa pink (MARCOS, João. 2016).

Seguindo modelo de Sistema de identificação para bactérias Gram positivas, Sistema de Identificação de *Corynebacterium*, Sistema de Identificação para bactérias anaeróbicas da Diagnostics s.r.o (2020). De início as reações foram feitas em tubos de ensaio, contendo as soluções base de Glicose, Lactose, para verificar se há reação metabólica.

Após os primeiros resultados sendo favoráveis para a pesquisa, e sendo possível analisar as reações metabólicas, como podemos ver na imagem a baixo, deu-se continuidade acrescentando a Maltose e Frutose na solução base, onde além das bactérias do estudo, foi utilizado o tubo controle, para comparar as reações.

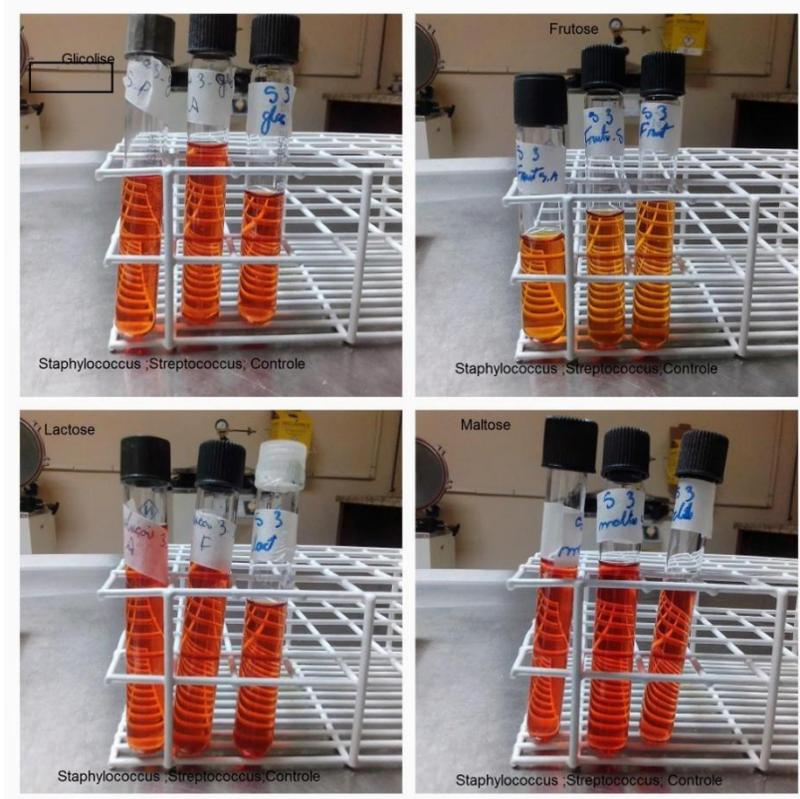


Imagem 2: Foto do segundo experimento contendo os açúcares, as bactérias e o controle.

Com os resultados obtidos nos tubos de ensaio, deu-se início a aplicação das provas dentro da microplaca, utilizando os demais açúcares e uma bactéria Gram negativa para fazer o comparativo. Onde na imagem a seguir foi possível verificar que houve reação metabólica das bactérias, fazendo com que houvesse viragem de cor.

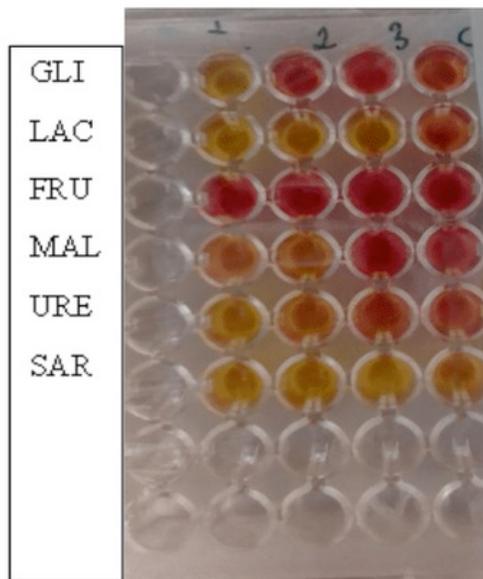


Imagem 3: Foto da reação dentro da microplaca. 1 Streptococcus; 2 Staphylococcus ; 3 Bactéria Gram negativa; Controle

Sendo um método de prova bioquímica que não é utilizado no país, e ainda não tem pesquisas semelhantes que focam no diagnóstico clínico. Mas em comparação com o método da PROBAC BRASIL KIT NF III(2021), que é utilizada para identificação de Gram negativos em microplacas, e que visa outros tipos de reações, os resultados obtidos no projeto são relevantes, visto que com as reações obtidas é possível analisar e fazer a identificação bacteriana.

Com a ECOPLATE (Teste de assimilação de carbono) que também utiliza as reações em microplacas, podemos analisar que as reações de viragem de cor dentro das placas são de grande facilidade para identificação do microorganismo.

Sendo o único laboratório que utiliza o método de prova bioquímica para Gram positivo a Diagnostics s.r.o (2020), traz a relação dos resultados obtidos com as bactérias que foram encontradas, fazendo com que em comparação deste estudo, as reações obtidas na solução preparada estejam dentro das bactérias que foram selecionadas.

Com os resultados obtidos através dos açúcares utilizados na solução base, e em comparação com os métodos atuais utilizados, é possível determinar a sua eficácia dentro da identificação bacteriana, facilitando o diagnóstico dos pacientes, e aumentando o fluxo de realização das provas bioquímicas.

CONCLUSÃO

A detecção de patógenos bacterianos e a avaliação de seu perfil de suscetibilidade fornecem dados importantes para a racionalização da terapia antimicrobiana e redução das taxas de mortalidade. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir a eficácia do método de prova bioquímica para bactérias Gram positivas em microplacas, tem em vista que houve reação metabólica dentro das soluções, fazendo com que seja possível a identificação das bactérias, e que pode ser semelhante ao método de prova bioquímica para Gram negativa.

Mesmo tendo reações semelhantes em algumas provas bioquímicas, é possível verificar diferenças entre as bactérias, onde junto com as demais provas para Gram positivas facilita uma possível identificação.

Sendo um método que ainda não é utilizado no país, as provas para Gram positivas em microplacas tendem a ser de grande praticidade, visto que segue o método de análise de viragem de cor, onde facilita a análise na placa, trazendo flexibilidade dentro do laboratório de microbiologia fazendo com que seja possível a realização de vários pacientes dentro da mesma microplaca.

REFERÊNCIA

CASTRO, Barbara *et al.* Prevalência de bactérias Gram-positivas em infecção do trato urinário. **Artigo Original/Original Article**, [S. l.], p. 322-327, 6 set. 2019.

DIAGNOSTICS s.r.o. kit de identificação universal com alta eficiência para a identificação de cocos Gram-positivos. 2020. <http://www.diagnostics.sk/produkty/diagnosticke-supravy/gp-24-2>.

LEÃO, Lara *et al.* Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], p. 537-540, 15 out. 2007.

MAMONA, Bruna *et al.* DETECTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADESINAS DAS AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BEZERRO COM DIARRÉIA EM CRUZ DAS ALMAS, BAHIAS. **Universidade Estadual de Feira de Santana**, [S. l.], p. 1-4, 15 fev. 2018.

NETO, Adelino *et al.* Flora Microbiana de Telefones Públicos Localizados no Campus de Uma Universidade em Cuiabá, MT. **Revista Eletrônica de Biologia**, [S. l.], p. 56-72, 15 out. 2012.

BRASIL, PROBAC. PAINEL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DE GLICOSE PROBAC KIT NF III, 2021 <https://site6771.wixsite.com/probac-do-brasil>

ROCHA, Carlos *et al.* Identificação de bactérias presentes em biofilmes de superfícies metálicas. **Rev. Investig. Bioméd.**, [S. l.], p. 172-180, 15 fev. 2018.

SOUZA, Leandro *et al.* Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesq. agropec. bras**, [S. l.], p. 269-276, 15 fev. 2012.

PERFIL ANTIOXIDANTE DA LUTEÍNA E ANÁLISE DE VISUALIZAÇÃO

Data de submissão: 16/04/2024

Data de aceite: 02/05/2024

Antonia Joana Darque Silva Campos

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/6327385561234405>

Carlos Alonso Leite dos Santos

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/6096221607515189>

Luciene Ferreira de Lima

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/8238587720435802>

José Weverton Almeida-Bezerra

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Química Biológica,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/5570296179611652>

Jácia Santos Oliveira Ramos

Faculdade de Juazeiro do Norte, Juazeiro
do Norte, CE
<http://lattes.cnpq.br/0120693704062820>

Janaína Esmeraldo Rocha

Universidade Estadual do Ceará,
Fortaleza, CE
<http://lattes.cnpq.br/4919818595808096>

Marcos Aurélio Figueirêdo dos Santos

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/8643818710205791>

Ademar Maia Filho

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/9570480278376163>

Murilo Felipe Felício

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/0285588115722707>

Adrielle Rodrigues Costa

Universidade Federal do Cariri, Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/1260333044819626>

Antônia Eliene Duarte

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/0724941739025687>

Luiz Marivando Barros

Universidade Regional do Cariri,
Departamento de Ciências Biológicas,
Crato, CE
<http://lattes.cnpq.br/7040134412713009>

RESUMO: A luteína, carotenoide dihidroxilado pertencente à classe das xantofilas de coloração amarela, atua como antioxidante protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o stress oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças. O trabalho objetivou avaliar o perfil antioxidante da luteína e análise de visualização onde foram feitos teste DPPH e ORTOFENANTROLINA (quelação e redução de ferro) que teve como resultado evidenciado a ação antioxidantes da luteína sobre a oxidação causado por radicais livres, de modo que, o grupo luteína demonstrou um IC₅₀ de 0,2 µg/mL, semelhante ao IC₅₀ do ácido ascórbico de 0,2 µg/mL, mostrando ser um potente antioxidante natural o aumento na concentração do Fe²⁺ e Fe³⁺ mostrou a inibição na redução dos estresses oxidativos. Para a validação desses resultados foi feito um estudo cientométrico e as análises de visualização de redes de descritores como uma estratégia de pesquisa e teve também testes de DPPH, avaliação quelante de ferro e seu poder redutor no composto luteína e como citado, um estudo cientométrico e análise de dados que teve quelação e antioxidante e estresse oxidativo como referências e foram pesquisados nos campos de pesquisa na Plataforma scopus (Elsevier) contendo um grande número de estudo publicado entre os ano de 2011 a 2021 a avaliação cientométrica, foi possível observar a evolução das publicações ao longo dos últimos 10 anos e com destaque dos anos que mais tiveram estudos publicados.

PALAVRAS-CHAVE: Quelação, antioxidante, estresse oxidativo.

LUTEIN ANTIOXIDANT PROFILE AND VISUALIZATION ANALYSIS

ABSTRACT: Lutein, a dihydroxylated carotenoid belonging to the class of yellow-colored xanthophylls, acts as an antioxidant, protecting cells from oxidative damage and, consequently, reduces the risk of developing some chronic degenerative diseases, since oxidative stress and the action of free radicals are the major factors associated with the initiation and spread of the development of these diseases. The work aimed to evaluate the antioxidant profile of lutein and visualization analysis where DPPH and ORTHOPHENANTHROLINE (chelation and iron redaction) tests were carried out, which resulted in evidence of the antioxidant action of lutein on oxidation caused by free radicals, so that the lutein group demonstrated an IC₅₀ of 0.2 µg/mL, similar to the IC₅₀ of ascorbic acid of 0.2 µg/mL, showing that it is a potent natural antioxidant. The increase in the concentration of Fe²⁺ and Fe³⁺ showed inhibition in the reduction of oxidative stress. To validate these results, a scientometric study and visualization analyzes of descriptor networks were carried out as a research strategy and there were also DPPH tests, iron chelating evaluation and its reducing power in the compound lutein and, as mentioned, a scientometric study and data analysis that had chelation and antioxidant and oxidative stress as references and were researched in the research fields on the Scopus Platform (Elsevier) containing a large number of studies published between the years 2011 and 2021. scientometric evaluation, it was possible to observe the evolution of publications over the last 10 years and highlighting the years that had the most studies published.

KEYWORDS: Chelation, antioxidant, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A luteína é um carotenoide a qual desenvolve um papel de grande relevância por atuar protegendo as células de danos oxidativos e, conseqüentemente, reduzir o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o estresse oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças. (ALVES-RODRIGUES, 2004; LEERMAKERS et al., 2016;).

Portanto, sendo a luteína uma macular de pigmentação amarela, a qual é considerada um dos principais carotenóides dihidroxilados pertencente à família das xantofilas, atua como um potente antioxidante que previne danos causados por radicais livres nos tecidos. A correlação entre altos níveis de carotenóides e benefícios à saúde apareceu na década de 70 (FRASER, 2004; TEXEIRA, 2022).

Dessa forma, de acordo com Bakó et al. (2002), a luteína além de atuar como precursores de vitaminas, a mesma também desempenha funções fisiológicas, tais como prevenção de doenças degenerativas como câncer e outras infecções de pele. A luteína apresenta a capacidade de proteger moléculas de lípidos, proteínas, lipoproteínas de baixa densidade, membrana plasmática e DNA contra o ataque de radicais, tendo um papel essencial na proteção de doenças, notadamente na redução do risco de a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), cataratas e diabetes (STRINGHETA, 2006).

Por conseguinte, compostos naturais contendo duplas ligações conjugadas, atuam por seu efeito antioxidante na eliminação de radicais livres (ALVES-RODRIGUES, 2004). Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências da redução do risco de desenvolvimento da DMRI, destacam-se os efeitos benéficos na proteção e contra outras doenças degenerativas. Estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada com o consumo de alimentos ricos neste carotenoide (STRINGHETA, 2006; PEREIRA, 2021).

Estudos toxicológicos têm confirmado que a luteína não oferece riscos à saúde, e que o enriquecimento de alimento pode ser realizado com êxito sem que ocorram mudanças nos demais ingredientes e sem nenhum impacto às propriedades sensoriais do produto final. Assim a ingestão de alimento enriquecido com luteína pode elevar o consumo diário de luteína a níveis suficientes para redução das doenças degenerativas (KRUGER et al., 2002)

Tendo-se conhecimento da importância da luteína na defesa do organismo contra doenças degenerativas e que sua capacidade protetora está intimamente relacionada ao seu consumo, esse trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antioxidante da luteína e análise de visualização, compilar informações da literatura, por meio de análises centimétricas e visualizações de rede, no banco de dados da “Scopus”, de forma a fornecer dados sobre o perfil da luteína. Assim como também foi analisada a eficácia da cafeína com estudos *in vitro* utilizando os métodos de DPPH e ortofenantrolina (quelação e redução de ferro).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

O composto luteína foi adquirido na farmácia de manipulação Ecofarma (Juazeiro do norte-CE, Brasil), para preparação das soluções usadas nos ensaios antioxidantes foi utilizado 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 1,10-fenantrolina, ácido ascórbico, álcool etílico, cloreto férrico, sulfato de ferro, salina, TRIS (hidroximetil) e ácido ascórbico.

Teste de DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres do composto da luteína foi medida com o radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), seguindo o método de Kamdem et al. (2012), com algumas modificações. Resumidamente, 50 μL do composto da luteína em diferentes concentrações (30-480 $\mu\text{g/mL}$) foram misturadas com 100 μL de solução DPPH recém-preparada (0,3 mM em etanol). Em seguida, a placa foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 30 min. A redução do radical DPPH foi medida monitorando a diminuição da absorção em 517 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax, Sunnyvale, CA, EUA). Ácido ascórbico foi usado como o composto padrão (isto é, controle positivo). A eliminação do radical DPPH a capacidade foi medida usando a seguinte equação:

$$\text{Cálculo: \% inibição} = 100 - \frac{[(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})]}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Atividade quelante de ferro

A capacidade quelante do composto da luteína foi determinada de acordo com o método modificado de Kamdem et al. (2013). A mistura de reação contendo 58 μL de solução salina (0,9%, p/v), 45 μL de Tris-HCl (0,1 μM , pH, 7,5), 27 μL de extratos (64-1024 $\mu\text{g/mL}$) e 36 μL de 110 μM FeSO_4 foi incubado por 10 min a 37 °C. Em seguida, 34 μL de 1,10-fenantrolina (0,25%, p/v) foram adicionados e a absorbância do complexo de cor laranja formado foi medida em 0, 10, 20 e 30 min a 510 nm (contra soluções em branco das amostras) usando o leitor de microplacas (SpectraMax).

O mesmo procedimento foi realizado para o controle (ou seja, Fe^{2+}), mas sem o extrato. Para determinar o potencial quelante da luteína, determinamos a redução potencial de qualquer Fe^{3+} (que pode ser formado durante os períodos de incubação) adicionando após os 20 min da última leitura o agente redutor, ácido ascórbico (concentração final de 5 mM) à mistura de reação. A absorbância foi então determinada após 10, 20, 30 minutos após a adição de ácido ascórbico. Isso ocorre porque os extratos podem estar oxidando Fe^{2+} a Fe^{3+} , levando a uma diminuição na absorbância que não estava relacionada à quelação de Fe^{2+} .

Fe³⁺ Poder redutor do composto luteína

A propriedade redutora de Fe³⁺ da luteína foi determinada usando um método modificado de Kamdem et al. (2013). Uma mistura de reação contendo solução salina (58 µL, 0,9%, p/v), Tris-HCl (45 µL, 0,1 M, pH, 7,5), a luteína (27 µL, 64-1024 µg/mL), e FeCl (36 µg/mL, 110 µM) foi incubado por 10 min a 37 °C. Subsequentemente, 1,10-fenantrolina (34 µL, 0,25%, p/v) foi adicionada e a absorbância do complexo laranja formado foi medida em 0, 10, 20 e 30, min a 510 nm (contra soluções em branco das amostras) usando o leitor de microplacas SpectraMax (Molecular Devices, Orleans Drive Sunnyvale CA, EUA). Após os 30 minutos da última leitura, o agente redutor ácido ascórbico (concentração final de 5 mM) foi adicionado à mistura de reação. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (ou seja, Fe³⁺).

Estudo Cientométrico e Análise de Dados

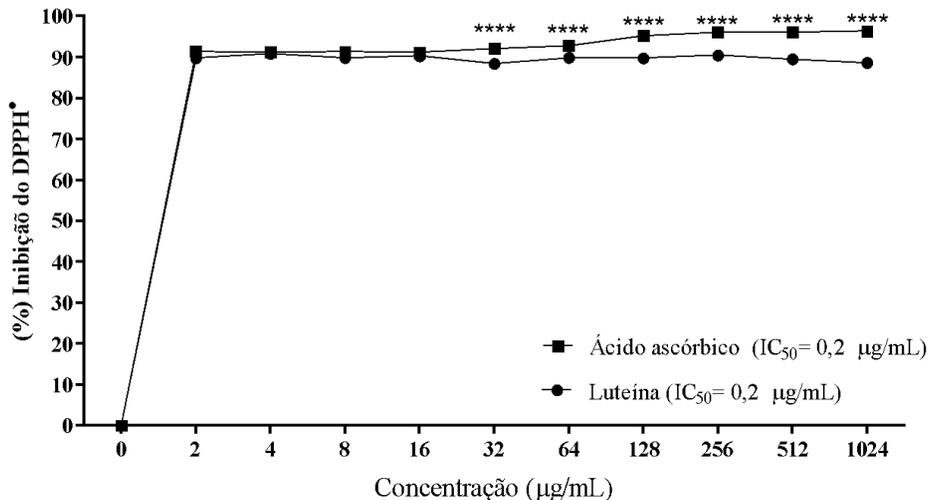
Um estudo cientométrico tem uma abordagem qualitativa onde foi utilizado como base de dados a “Elsevier Scopus”, o que possibilitou uma abordagem de cunho multidisciplinar e relevante para a elaboração de estudos cientométricos. Como descritores foram utilizados os seguintes termos aplicados na língua inglesa: lutein e chelation, (Luteína e Quelação) antioxidante e oxidative stress (antioxidante e estresse oxidativo). Inseridos aos campos de pesquisa de título, foram encontrados um total de mais de 200 publicações entre os anos de 2011 a 2021 sendo relacionados a artigos. Palavras-chave separadas pelo operador booleano AND. Nesta pesquisa buscou-se evidenciar a síntese anual de artigos publicados na base de dados, assim como as áreas de conhecimento a qual estão inseridas. As pesquisas foram realizadas e em seguida encaminhadas para o programa GraphPad Prism onde foram construídos gráficos para a organização dos dados obtidos para melhor entendimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos da Luteína nos Radicais DPPH

Como demonstrado na figura 1, o efeito da luteína nos radicais de DPPH nas concentrações (32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL), apresentaram resultados significativos ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle (ácido ascórbico), de modo que, o grupo luteína demonstrou um IC₅₀ de 0,2 µg/mL, semelhante ao IC₅₀ do ácido ascórbico de 0,2 µg/mL, mostrando ser um potente antioxidante natural (Figura 1).

O composto Luteína acompanhou o controle de vitamina C no qual sabemos que é um antioxidante natural, evidenciando assim uma potente atividade quando comparada a vit. C. A vitamina C é um componente hidrossolúvel capaz de reduzir a maioria das ROS/RNS fisiologicamente relevantes (HALLIWELL, 1999), além disto regenera o alfa-tocoferol participando também no mecanismo protetor contra lipoperoxidação (AMES, 2001).

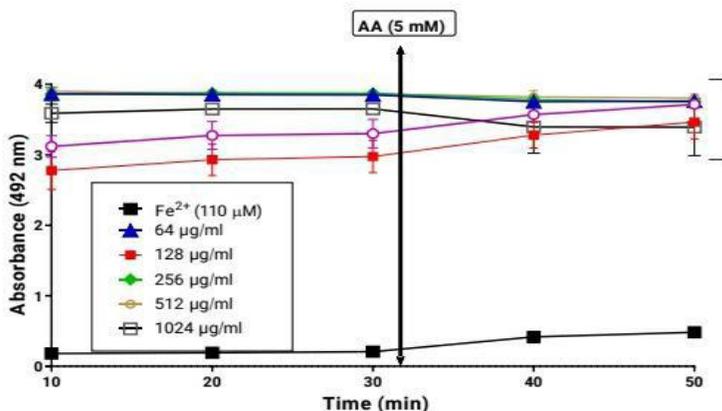


Legenda - Os valores representam a média ± SEM de três experimentos que foram realizados em triplicata. **** $p < 0.0001$, quando comparado ao grupo controle (+).

Figura 01- Efeitos antioxidantes da luteína e do ácido ascórbico (controle positivo) nas diferentes concentrações testadas (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL), demonstrado pela inibição do radical DPPH.

Potencial Quelante e Redutor de Ferro (Ortofenantrolina)

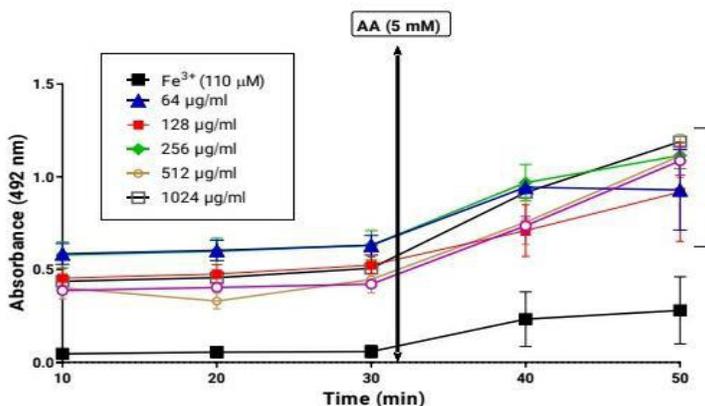
Conforme demonstrado na Figura 2, é possível demonstrar que a luteína causou redução da quantidade de Fe^{2+} e Fe^{3+} . O ferro é essencial para maioria dos sistemas biológicos, por ter uma variedade de funcionalidades fisiológicas importantes, como participação em processos metabólicos que incluem transporte de oxigênio, produção de energia, entre outras (ZHANG et al., 2018). No entanto, a sobrecarga de ferro provoca o estresse oxidativo, levando a oxidação de elementos celulares importantes ao bom funcionamento do organismo, provocando alterações na conformação de proteínas e neurodegeneração (FERNANDEZ, 2007).



Legenda - Os valores representam a média ± SEM de três experimentos que foram realizados em triplicata.

Figura 2 - Capacidade quelante/oxidante Fe²⁺ da luteína nas diferentes concentrações testadas (64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL) e controle (Fe²⁺ 110 µM), demonstrados pela absorvância do complexo orto-fenantrolina-Fe²⁺.

Como mostra a Figura 3, a redução de Fe²⁺ e Fe³⁺ foram semelhantes, mais em concentrações diferente, podendo assim observar a oxidação foi um pouco mais resistente nos respectivos tempos de verificação (10, 20, 30, 50 min), apresentando valores de absorvância maiores que os observados na curva de controle (Fe³⁺). As concentrações do composto demonstram alto poder redutor em todos os momentos analisados.



Legenda - Os valores representam a média ± SEM de três experimentos que foram realizados em triplicata.

Figura 3- Potencial redutor de Fe³⁺ a Fe²⁺ da luteína nas diferentes concentrações testadas (64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL) e controle (Fe³⁺ 110 µM), demonstrados pela absorvância do complexo orto-fenantrolina-Fe²⁺.

Segundo Dagnelie *et al.* (2000), a luteína apresenta propriedades anti-apoptoses “*in vitro*”, que auxiliam na prevenção de câncer de fígado, cólon entre outros. De acordo com Fraser & Bramley, (2004) os carotenóides *in vitro* inibem a proliferação e a transformação celular, a formação de micronúcleos, bem como a modulação da expressão de certos genes. A luteína e a zeaxantina protegem as células contra danos no DNA, estimulam a comunicação das células gap e reduzem o risco de câncer.

El-Agamey *et al.*, (2004), afirmam que as propriedades antioxidantes dos carotenóides são atribuídas à sua estrutura, pela presença de elevado número de duplas ligações alternadas. Estas permitem a absorção da energia das espécies reativas do oxigênio (EROs), canalizando-a através da longa cadeia de duplas ligações que se encontram em ressonância. A energia é finalmente liberada na forma de calor, regenerando a molécula de carotenóide ao seu estado inicial (SOUTHON, 2003).

Análise Centimétrica e Visualização de Redes (Vosviewer)

Apoiando esses resultados antioxidantes *in vitro* foi feito nos campos de pesquisa na web Scopus (Elsevier) um estudo cientométrico entre os anos de 2011 a 2021 onde tivemos um grande número de artigos encontrados relacionados a nossa pesquisa, usamos como referências palavras-chaves, lutein, chelation, antioxidante e oxidative stress.

As análises de visualização de redes de descritores como uma estratégia de pesquisa dos descritores de luteína Quelação e antioxidante e estresse oxidativo foram pesquisados nos campos de pesquisa na Plataforma Scopus (Elsevier). Onde nessa perspectiva um universo de mais de 200 documentos foram encontrados entre o ano de 2011 a 2021 destes os resultados das palavras-chave citadas no mesmo trabalho foram extraídos da Scopus e analisada nos VOSviewer que é um software importante para o estudo cientométrico, permitindo assim a criação de redes de visualizações baseadas em metadados nesse caso o método de visualização de similaridade do VOSviewer foi usado para analisar a ocorrência dos descritores que serão representadas nas Figuras 4 e 5.

Na Figura 4, foram pesquisadas palavras como Luteína atividade antioxidante e toxicidade onde no mostrou uma grande diversidade de estudo envolvendo as mesmas. O sistema identifica os clusters onde podemos observar que, embora cada cluster tenha seu tamanho, ele complementa as conexões de trabalhos com o mesmo objetivo de estudos.

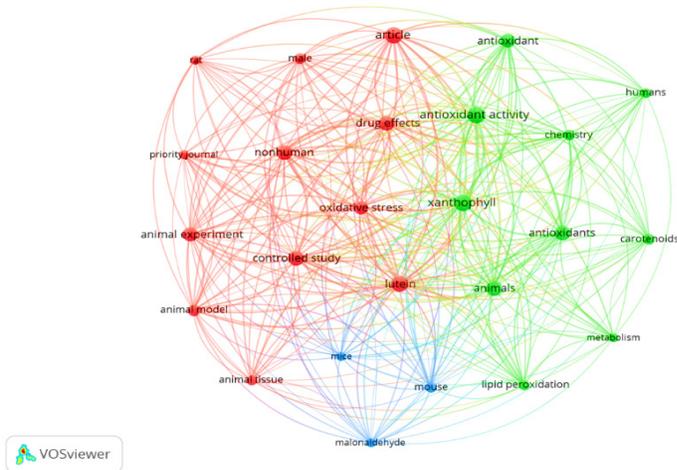


Figura 4 – Análise de palavras-chaves de ocorrência Luteína atividade antioxidante e toxicidade ocorrência de termos foi extraída de 2011–2021.

O tamanho do círculo ou nó de um termo é proporcional ao número de ocorrência desse termo, quanto mais finas as linhas de ligação, menos forte é a ligação, quanto maiores os nós, mais relevância eles possuem e os clusters são grupos que se formam por afinidade (KAMDEM, 2019). Na figura 5, foram usadas como descritores Luteína e quelatação onde se identifica três clusters que vão ao número de ocorrências do descritor sobre palavras chave encontradas nas pesquisas.

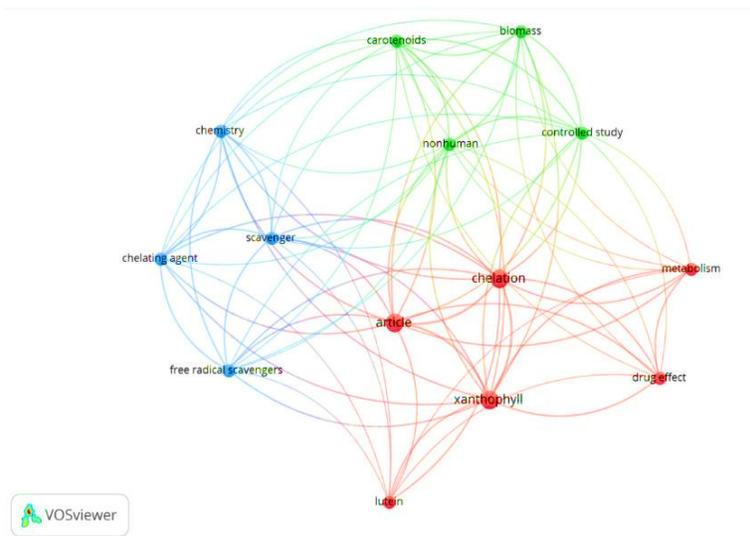


Figura 5 – Análise de palavras-chaves de ocorrência Luteína e quelatação. ocorrência de termos foi extraída de 2011–2021.

Avaliação cientométrica

A avaliação cientométrica foi realizada ao longo dos últimos 10 anos: 2011-2021 com dados obtidos em uma pesquisa bibliográfica, utilizando bancos de dados de acesso a documentos da ciência. “Elsevier Scopus”. A produtividade científica sobre a espécie foi avaliada por meio da avaliação de todos os documentos publicados e do número de publicações no período 2016 a 2021, o qual foram os anos que mais tiveram uma evolução de estudo produzidos. As palavras chave abordadas nessa busca envolvem a fórmula do composto C₄₀H₅₆O₂ luteína.

Nessa figura 6, podemos ver no gráfico os documentos por ano que vai identificar o crescimento que teve entre os anos 2016 a 2019 que foi de 1 documento para 7 Evidenciando assim que a luteína teve uma grande valorização tanto em estudos como em experimentos.

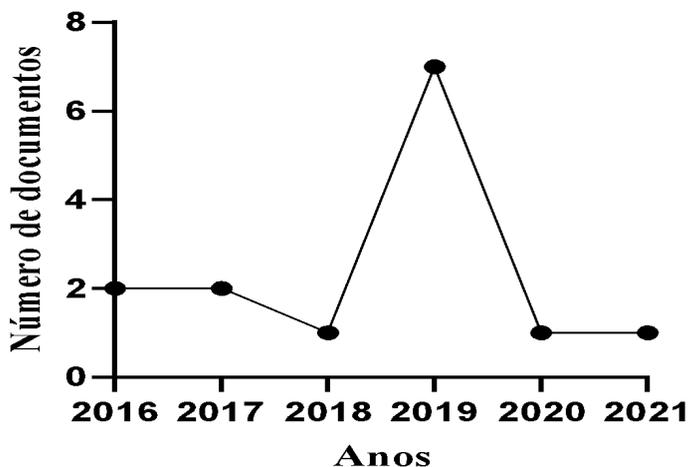


Figura 6 - Evolução das publicações ao longo dos anos: 2016-2021

Os documentos por áreas informam as áreas que estudam e usaram a luteína como antioxidante e suas porcentagens e colocações onde a luteína teve uma porcentagem maior na área agrícola com, 25.9% seguido nas áreas de química e medicina que tem 18.5%. A análise de publicações por países, indicam que os países que mais estudam e tem documentos com esse composto e sua ação antioxidante é a Polônia seguida do Brasil e México.

CONCLUSÕES

Resultados adquiridos de testes e estudos bibliográficos realizados fica evidenciado a ação antioxidantes da luteína sobre a oxidação causado por radicais livres, o aumento na concentração do Fe^{2+} e Fe^{3+} demonstra a inibição na redução dos estresses oxidativos. Estudos já publicados nos confirmam que a luteína tem a capacidade de combater o estresse oxidativo e a oxidação causado por Fe^{2+} e Fe^{3+} e de proteger as células contra doenças degenerativas.

Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da DMRI, destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças. Nesse contexto, é importante que mais estudos sejam realizados para que possam ter mais resultados sobre esse antioxidante natural Luteína para a área da saúde e pesquisa.

REFERENCIAS

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology letters**, v. 150, n.1, p. 57-83, 2004.

AMES, Bruce N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 475, n. 1-2, p. 7-20, 2001.

BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of calendula products. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 53, n. 1-3, p. 242-250, 2002.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T. M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, v. 71, p. 147-164, 2000.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 430, n. 1, p. 37-48, 2004.

FERNANDEZ, L. L., FORNARI, L. H. T., BARBOSA, M. V., SCHRODER, N. A. D. J. A. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 218-24, 2007.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?. **Trends in biochemical sciences**, v. 24, n. 7, p. 255-259, 1999.

KAMDEM, J. P., ADENIRAN, A., BOLIGON, A. A., KLIMACZEWSKI, C. V., ELEKOFEHINTI, O. O., HASSAN, W., ATHAYDE, M. L. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26-34, 2013.

KAMDEM, J. P., DUARTE, A. E., LIMA, K. R. R., ROCHA, J. B. T., HASSAN, W., BARROS, L. M., TSOPMO, A. Research trends in food chemistry: A bibliometric review of its 40 years anniversary (1976–2016). **Food chemistry**, v. 294, p. 448-457, 2019.

KAMDEM, J. P., STEFANELLO, S. T., BOLIGON, A. A., WAGNER, C., KADE, I. J., PEREIRA, R. P., TEIXEIRA ROCHA, J. B. *In vitro* antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

KRUGER, C. L., MURPHY, M., DEFREITAS, Z., PFANNKUCH, F., HEIMBACH, J. An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: case study using a crystalline lutein product. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1535-1549, 2002.

LEERMAKERS, E. T.; DARWEEESH, S. K.; BAENA, C. P.; MOREIRA, E. M.; MELO VAN LENT, D.; TIELEMANS, M. J.; FRANCO, O. H. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis, 2. **The American journal of clinical nutrition**, v. 103, n. 2, p. 481-494, 2016.

PEREIRA, K. I. **Consumo de Carotenoides Segundo Inquéritos Nacionais e Associados aos Índices de Gini e de Desenvolvimento Humano**. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) - Instituto de Saúde e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2021.

SOUTHON, S.; FAULKS, R. Carotenoids in food: bioavailability and functional benefits. In: SOUTHON, S.; FAULKS, R. **Phytochemical functional foods**. Chicago: Woodhead CRC LLC, 2003.

STRINGHETA, P., NACHTIGALL, A., OLIVEIRA, T., RAMOS, A. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alim. Nutr.**, v. 17, p. 229-238, 2006.

TEIXEIRA, G. A. B. **Desenvolvimento de sorvete de maracujá enriquecido com luteína nanoencapsulada**. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo, 2022.

ZHANG, H.; ZHABYEYEV, P.; WANG, S.; OUDIT, G. Y. Role of iron metabolism in heart failure: From iron deficiency to iron overload. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 7, p. 1925-1937, 2019.

JOSÉ WEVERTON ALMEIDA-BEZERRA: Graduado em Licenciatura plena em Ciências Biológicas pela Universidade Regional do Cariri - URCA (2017), Especialista em Microbiologia, pela Faculdade de Venda Nova do Imigrante FAVENI (2020), Mestre (2020) e Doutor (2023) em Biologia Vegetal pela Universidade Federal do Pernambuco - UFPE na linha de Botânica Aplicada e Etnobotânica. Atualmente, Pesquisador bolsista de Pós-doutorado do Departamento de Química Biológica (PPQB), pela Universidade Regional do Cariri - URCA. Foi listado no ranking da *AD Scientific Index* (2024) como sendo um dos principais pesquisadores (25º lugar) da Universidade Regional do Cariri. Foi professor do curso de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri - URCA, Campus Missão Velha. Tendo sido responsável pelas disciplinas de Microbiologia, Parasitologia, TCC I, TCC II e Entomologia. Além disso, atuou como Docente do Núcleo de Ciências Biológicas do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde Coletiva da URCA. É membro do grupo de pesquisadores do Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri - LMAC e do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, ambos da URCA. Tem experiência na investigação de atividades biológicas de produtos naturais e sintéticos frente a agentes etiológicos de doenças infecciosas e parasitárias. Além disso, é revisor *Ad hoc* de diversos periódicos, tais como *Antibiotics-Basel* (ISSN: 2079-6382; FI:5,222) e *Applied Sciences* (ISSN: 2076-3417; FI:2,835).

KAROLINE PETRICIO MARTINS: Mestre em Práticas do Cuidado em Saúde Universidade Federal do Paraná. 2018-2020 Tutora do Método Canguru/Atenção Hospitalar 2022- 2023 via Ministério da Saúde-. Esp. Preceptoria em Saúde UFRN. Esp. Humanização e Cuidados Paliativos SOBASP. Membro do Grupo de Pesquisa em Tecnologia e Inovação em Saúde (TIS) UFPR (2018-2020). Especialização em Gestão da Saúde (PNAP/UAB/ UFPR). Especialização. Enfermagem PED e Cuidados Intensivos Neonatais pela FPP/ Curitiba/Pr. Especialização. PSF UGF/ RJ. Bacharel em enfermagem Uniandrade Curitiba. Enfermeira Assistencial em CHC-UFPR na UTI Neonatal. Membro da Comissão Iniciativa Hospital Amigo da Criança-IHAC (2021-atual), Comisae (2018-2023), Comitê de Humanização (2015-2023), Cipa (2020-2023). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1251-5701>

A

Abelha 17, 18

Algas marinhas 53, 59

Altura relativa fuste 85

Amazônia legal 17, 19

Anova repetida mixta 85

Antioxidante 68, 70, 115, 116, 117, 119, 122, 123, 124, 125

Apis melífera 22

Aplicativo 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32

Aprendizagem 23, 24, 25, 33, 34, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47

Atividade lúdica 34, 45

B

Bactérias gram-negativas 108

Bactérias gram-positivas 108

Biologia 34, 35, 41, 46, 47, 114, 127

C

Canafístula 102, 104, 105, 106, 107

Cerrado 17, 18, 20, 21, 22, 114

D

Deficiência hídrica 102, 103

Densitometria convencional 85

E

Ensino 23, 24, 25, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 66

Estresse oxidativo 116, 117, 119, 120, 122, 125

Eutectic mixture 72

F

Fitoterápicos 62, 71

G

Geleia real 17, 18, 19, 20, 21, 22

Genética 20, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 86, 114

Green solvents 72, 82, 83

Guia prático 23, 24, 25

H

Hematologia 23, 24, 25, 26, 32

Hereditariedade 34, 35, 36, 46, 47

Histológicos 2

L

Large-scale 72, 75

Luteína 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126

M

Maderas tropicales 85, 87

Mentha spicata 62, 63, 66, 67, 68, 69

Mesolitoral rocoso 53

Muestreos 53

O

Oligômeros 2

P

Parkinson 1, 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16

PEG 6000 102, 103, 104

Permeabilización 1, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 14

Plantas 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 103, 106, 107

Q

Quelação 116, 117, 118, 119, 122, 123

R

Reações bioquímicas 108

Regresión lineal 85

Remédio caseiro 62, 63

S

Sabedoria popular 62, 70

Soluções osmóticas 102, 103

T

Tecnologia 20, 24, 32, 102, 104, 106, 127

U

Ureia 109

V

Variables ambientales 55, 60

Vegetación submarina 54

EXPLORANDO A VIDA

UMA JORNADA
PELAS CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

EXPLORANDO A VIDA

UMA JORNADA
PELAS CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br